İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADAÇAYININ (*SALVIA OFFICINALIS*) ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİ ROSMARİNİK VE KARNOSİK ASİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimyager Selda BAŞKAN
509031217

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 9 Mayıs 2005
Tezin Savunulduğu Tarih : 1 Haziran 2005

Tez Danışmanı : Prof.Dr. F. Bedia Erim Berker
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Süleyman Akman (İ.T.Ü.)
Prof.Dr. Gülaçtı Topçu (İ.Ü.)

HAZİRAN 2005

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve akademik görevlerimde her türlü eleştirisi ve kıymetli fikirleri ile bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER'e teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nevin Öztekin'e teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne gelmem için her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan aileme, özellikle beni daima motive ettiği için annem Sema Başkan'a en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK TBAG-2312 (103T053) numaralı araştırma projesi ve İTÜ araştırma fonu 31168 numaralı proje desteği ile tamamlanmıştır. İlgili kuruluşlara destekleri teşekkür ederim.

HAZİRAN, 2005 Selda BAŞKAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ii
KISALTMALAR v
TABLO LİSTESİ vı
ŞEKİL LİSTESİ vıı
SEMBOL LİSTESİ vıı
ÖZET ıx
SUMMARY x

BÖLÜM 1-GİRİŞ 1

BÖLÜM 2-KAPİLER ELEKTROFOREZ 3
2.1. Kapiler elektroforezin Prensipleri 3
2.2. Elektroforetik Göç 4
2.3. Elektroosmotik Akış 5
2.3.1. Elektroosmotik Akışa Etki Eden faktörler 6
2.4. Band Genişlemesi 6
2.5. Kapiler Elektroforez Cihazının Bölümleri 8
2.5.1. Voltaj Kaynağı 8
2.5.2. Kapiler 8
2.5.3. İnjeksiyon 9
2.5.4. Dedeksiyon 10

BÖLÜM 3- ADADAÇAYI 11
3.1. Adaçayının Yayılışı 11
3.2. İklim ve Toprak Özellikleri 11
3.3. Botanik Özellikleri 11
3.4. Tıbbi Değeri 12
3.5. Adaçayının Kimyasal Bileşenleri 12
3.5.1. Fenolik Asitler 12
3.5.2. Flavonoidler 13
3.5.3. Antisiyaninler 14
3.5.4. Terpenler ve Terpenoidler 14

BÖLÜM 4-ROSMARİNİK ve KARNOSİK ASİT 16
4.1. Karnosik Asit 16
4.2. Rosmarinik Asit 16
4.3. Antioksidanlar 17

4.4. Antioksidanların Tıbbi Etkileri 17
4.5. Antioksidanların Kaynağı 18

BÖLÜM 5-DENEYSEL KISIM 19
5.1. Kullanılan Cihazlar 19
5.2. Kimyasallar 19
5.3. Adaçayı Örneklerinin Hazırlanması 19
5.4. Uygun Çözücünün Seçilmesi 20
5.5. Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi 20
5.6. Ekstraksiyon Zamanının Seçilmesi 21
5.7. Tampon Konsanrasyonunun Seçilmesi 22
5.8. Karnosik Asidin Karnosola Bozunması 22
5.9. Karnosik ve Rosmarinik Asidin UV Spektrumu 23

BÖLÜM 6-SONUÇLAR 25
6.1. Adaçayı Örneklerindeki Karnosik Ve Rosmarinik Asit Piklerinin Saptanması 25
6.2. Adaçaylarındaki Rosmarinik Ve Karnosik Asit Miktar Tayini 26
6.2.1. Kalibrasyon Grafikleri 26
6.2.2. Pik Alanı ve Pik Geliş Süresi Tekrarlanabilirlik Değerleri 27
6.2.3. Doğruluk Analizleri 28
6.2.4. Yöntemin Minumum Dedeksiyon Sınırı(LOD) 28
6.2.5. Adaçayı Ekstrelerindeki Karnosik ve Rosmarinik Asir Miktarları 28
6.3. Sonuç 29

KAYNAKLAR 30

ÖZGEÇMİŞ 34

KISALTMALAR

CE	: Kapiler Elektroforez
CZE	: Kapiler Zone Elektroforez
CGE	: Kapiler Jel Elektroforez
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografi
ITP	: İzotakoforez
EOF	: Elektroosmotik akış

TABLO LİSTESİ

		Sayfa No
Tablo 2.1.	EOF'e etki eden faktörler ……..	6
Tablo 2.2.	Band genişlemesine neden olan diğer etkenler …….	8
Tablo 2.3.	CE'de kullanılan dedeksiyon yöntemleri …….	10
Tablo 3.1.	Terpenlerin Alt Sınıfları……	15
Tablo 4.1.	Doğal Antioksidanlar ….....	18
Tablo 6.1.	Rosmarinik ve Karnosik Asitin Tekrarlanabilirlik değerleri … …….	28
Tablo 6.2.	Geri Kazanım…….	28
Tablo 6.3.	Adaçayı ekstrelerindeki karnosik ve rosmarinik asit miktarları……	29

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 2.1	**:** EOF'nin şematik gösterimi……	5
Şekil 2.2	**:** CE'nin şematik görüntüsü…….....	8
Şekil 3.1	**:** Kafeik Asit……	13
Şekil 3.2	**:** Flavonoidlerin genel formülü…….	13
Şekil 3.3	**:** Flavon ve Flavonolların Genel Molekül Formülü…….….....	14
Şekil 3.4	**:** Antisiyaninlerin Genel Formülü…….…...	14
Şekil 3.5	**:** İzoprenin molekül formülü…… …....	15
Şekil 4.1	**:** Karnosik Asit……	16
Şekil 4.2	**:** Rosmarinik Asit……	17
Şekil 5.1	**:** Rosmarinik ve Karnosik Asidin Farklı Çözücülerdeki Pik Alanları..	20
Şekil 5.2	**:** Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması……	21
Şekil 5.3	**:** Karnosik Asidin Pik Alanlarının Ekstraksiyon Zamanıyla değişimi	21
Şekil 5.4	**:** Rosmarinik Asidin Pik Alanlarının Ekstraksiyon Zamanıyla değişimi…..	22
Şekil 5.5	**:** Karnosik Asidin Karnosola Bozulması…….....	23
Şekil 5.6	**:** Rosmarinik Asitin UV spektrumu…….....	24
Şekil 5.7	**:** Karnosik Asitin UV Spektrumu…….....	24
Şekil 5.8	**:** Karnosolun UV Spektrumu……	24
Şekil 6.1	**:** A) Standart maddelerin elektrofreogramı……..	26
	B) Adaçayı Örneğinin Elektroferogramı……...	26
Şekil 6.2	**:** Karnosik Asit Kalibrasyon Eğrisi…….....	27
Şekil 6.3	**:** Rosmarinik Asidin Kalibrasyon Eğrisi…….....	27

SEMBOL LİSTESİ

$\mathbf{F_E}$	: Elektrik Kuvveti
$\mathbf{F_F}$	: Sürtünme Kuvveti
v	: İyonun hızı
$\boldsymbol{\mu_e}$	: Elektroforetik mobilite
E	: Elektrik Alan
V	: Uygulana Voltaj
Q	: İyonun yükü
Ŋ	: Çözeltinin vizkositesi
r	: İyonun yarıçapı
$\mathbf{v_+}$	: Pozitif yüklü iyonun hızı
$\mathbf{v_0}$	: Nötral maddenin hızı
$\mathbf{v_-}$	: Negatif yüklü iyonun hızı
t	:Geliş süresi
L	: Kapilerin tam boyu
L	: Kapilerin etkin boyu
$\mathbf{w_b}$	: Pikin taban genişliği
σ	: Pikin standart sapması
N	: Teorik plato sayısı
$\mathbf{w_{1/2}}$	: Yarı yükseklikteki pik genişliği
D	: Analitin difüzyon katsayısı
ΔP	: Kapiler boyunca basınç farkı
R	: Kapilerin iç çapı
ρ	: Örneğin yoğunluğu
g	: Yerçekimi ivmesi katsayısı
Δh	: Örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı

ADAÇAYININ (SA*LVIA OFFICINALIS*) ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİ ROSMARİNİK VE KARNOSİK ASİTİN KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE TAYİNİ

ÖZET

Adaçayı (*Salvia officinalis*) içeriğindeki fenolik antioksidanlar nedeniyle ekonomik önemi olan bitkilerden biridir.Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri temelde serbest radikalleri nötralize etmekte önemli bir rol oynayan redoks özelliklerine dayanmaktadır.Antioksidanlar lipitlerin ve diğer moleküllerin oksidasyonunu geciktiren ya da engelleyen bileşiklerdir. Adaçayı ekstresinin temel aktif bileşikleri rosmarinik asit ve karnosik asittir. Her iki bileşiğin ham bitkideki miktarları genetik faktörlere ve çevre koşullarına bağlıdır. Bu nedenlerle adaçayının ham madde veya ticari ekstre olarak kalite kontrolu için basit ve güvenilir bir analitik yöntem geliştirilmesi önemlidir.

Son yıllarda kapiler elektroforezin tıbbi bitkilerin analizlerine uygulandığı görülmektedir. Kapiler elektroforetik yöntemlerin klasik kromatografik yöntemlere göre avantajı reaktif tüketiminde, örnek hazırlama ve analiz süresinde belirgin azalmadır.Tüketilen örnek hacmi her injeksiyonda birkaç nanolitre olduğu için azami miktardadır. CE yüksek ayırma gücü nedeniyle özellikle kompleks yapıda tabii matriksler içinde analiz için uygun bir yöntemdir.

Bu çalışmada, adaçayı içeriğindeki rosmarinik ve karnosik asidin aynı anda tayini için kapiler elektroforez ile hızlı ve basit bir yöntem geliştirdik. Rosmarinik ve karnosik asidin aynı anda tayini için 210 nm'de direkt UV dedeksiyon kullanıldı. Dedeksiyon sınırları (sinyal/gürültü :3) rosmarinik ve karnosik asit için sırasıyla 2,79 µg/ml ve 3,18 µg/ml olarak bulunmuştur.Zaman tekrarlanırlığı rosmarinik ve karnosik asitler için sırasıyla 1,03 ve 0,09 dır. Analiz yöntemi ticari adaçaylarındaki karnosik ve rosmarinik asit tayini için uygulanmıştır.

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNS, ROSMARINIC ACID AND CARNOSIC ACID IN SAGE (*SALVIA OFFICINALIS*) BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

SUMMARY

Sage (*Salvia officinalis*) is one of the economically important plant because of its phenolic antioxidants.The antioxidants activity of phenolic compounds is mainly due to redox properties, which can play an important role in neutralizing free radicals. Antioxidants are compounds that can delay or inhibit the oxidation of lipids or other molecules. The activity of sage extract is mainly due to rosmarinic acid and carnosic acid. The level of both compounds in raw plant varies widely depending on genetic factors and environmental conditions. It is therefore important to develop a simple and reliable analytical method for the active components due to the quality control of sage leaves as raw material or commercial extracts.

More recently, capillary electrophoresis (CE) has been employed for the analysis of medicinal plants. The advantage of the capillary electrophoretic methods is the considerable diminuation in the sample preparation and analysis times, as well as in the reagent consumption.The sample volume consumptionis minimal because each injection needs only nanoliters. CE is particularly suitable in the analysis of complex natural matrices, owing to its higher resolving power.

In the present study, we developed a simple and rapid method for the simultaneous determination of rosmarinic and carnosic acid by capillary electrophoresis. Determination of rosmarinic and carnosic acid was performed by direct UV detection at 210nm. Detection limits (signal-to-noise-ratio=3) are 2,79 µg/ml and 3,18 µg/ml for rosmarinic and carnosic acid respectively.The migration time repeability 1,03 and 0,09 for rosmarinic and carnosic acids respectively. The analysis method was applied to the determination of rosmarinic and carnosic acid in the commercial sage teas.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kapiler Elektroforez (CE), yüklü bileşiklerin ve fenolik bileşikler gibi yüksek pH'larda kısmen yüklenen organik bileşiklerin ayırımı için etkili bir yöntemdir. Yöntemin avantajı az madde tüketimi ve hızlı ayırım süresidir. Yöntemin ayırım gücünün yüksek oluşu ve pek çok doğal ürün için ön saflaştırma gerektirmeden analizin mümkün olması nedeniyle diğer pek çok alanda olduğu gibi son yıllarda bitki metabolitlerinin analizinde de HPLC ye alternatif olarak kullanılmaktadır. CE ile bitki analizleri için literatürde değişik derleme makaleler (review) mevcuttur [1,2].

Adaçayı (*Salvia*), 900 kadar bitki cinsini içine alan Lamiaceae (ballıbabagiller) familyasının önemli bir üyesidir. *Salvia* bitkisinin adı, latincedeki anlamı tedavi olan 'Salvare' den gelmektedir [3]. *Salvia* türleri yüzyıllardır halk arasında tedavi edici özelliği ile ve pek çok ülkede gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. *Salvia* cinsi bitkilerde en yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler genel olarak fenolik asitler, fenolik diterpenler ve flavonoidlerdir. Bitkinin yaygın kullanımı nedeniyle, bitki içeriğindeki bu maddelerin tanımlanması ve izolasyonu konusunda çok sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu konudaki çalışmalar devam etmektedir. *Salvia* fenolik asitleri ve flavonoidleri konusunda 1992 yılında yayınlanan bir tanıtım makalesinde, bu türden izole edilip yapısı tanımlanan 162 adet *Salvia* fenolik asidi ve flavonoidi rapor edilmiştir. Bu çalışmaya terpenoidler dahil değildir. Son yıllarda, *Salvia* bileşenlerinin araştırılmasında ağırlık diterpenoidler üzerinde toplanmaktadır. Türkiyede yetişen Salvia türlerinin kimyasal içeriklerinin aydınlatılması konusunda İ.Ü. Eczacılık Fakültesinden bir grubun çok kapsamlı çalışmaları mevcuttur (Ulubelen, Topçu). Bu grup Türkiyede yetişen 86 Salvia türünün 46 sını incelemiş ve toplam 282 adet bileşik (fenolik, flavonoid ve terpenoid) izole edilerek tanımlanmıştır.

Rosmarinik asit, *Salvia* cinsi bitkilerde en sık rastlanan ve antioksidan aktivitesi yüksek olan fenolik bir bileşiktir. Rosmarinik asit *Salvia officinalis, Salvia cavaleriei*, *Salvia chinensis*, *Salvia flava*, *Salvia lavandulifolia*, *Salvia miltiorrhiza*'türlerinde teşhis edilmiştir [4]. *Salvia* türlerinde bulunan diğer güçlü bir antioksidan karnosik asittir. Karnosik asit fenolik yapıda abietan diterpenoiddir.

Bir cinste teşhis edilen kimyasal bileşenlerin kantitatif miktarı, cinsin türlerine, yetişme bölgelerine, genetik faktörlere göre değişim göstermektedir. Bitki aktif bileşenlerinin analizi ağırlıklı olarak HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Ancak bitki analizlerinde saf standart temin etmenin güçlüğü ve bazı bitki metabolitlerinin zamanla bozunması bunların kantitatif analizinin yapılmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle birçok analiz raporu toplam pik yüzdesine göre karşılaştırmalı olarak verilmektedir.

Rosmarinik asit ve karnosik asidin HPLC ile tayinine dayanan çalışmalar daha çok adaçayı ile aynı aileden olan biberiye (*Rosmarinus officinalis*) içeriğindeki bu iki aktif bileşenin analizi üzerinde yoğunlaşmıştır [5,6,7,8,9]. Adaçayının rosmarinik veya karnosik asit içeriği de biberiyeye oranla daha az olmasına rağmen HPLC ile çalışılmıştır [4,5,6,9,10,11].

Son yıllarda CE ile bitki analizleri konusunda çok sayıda makale çıkmaktadır. CE ile karnosik ve rosmarinik asit analizi konusunda biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ile ilgili üç çalışmaya raslanmıştır. Bunlardan biri bir MEKC çalışmasıdır. Üç çalışmadan sadece birinde standart temin edilerek kantitatif değerler bulunmuştur. [12,13,14]. Literatürde şimdiye kadar *Salvia* cinsi bitkilerle CE çalışmasına raslanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, *Salvia officinalis* türü bitkide bulunan rosmarinik ve karnosik asitlerin birarada kalitatif ve kantitatif analizi için kapiler elektroforezde bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem marketlerden temin edilen poşet adaçayları içindeki bu iki aktif antioksidan maddenin kantitatif tayinine uygulanmıştır

BÖLÜM 2

KAPİLER ELEKTROFOREZ

Kapiler Elektroforez (CE) hızlı ve güvenilir bir analitik ayırma yöntemidir. CE yöntemi, klasik elektroforezin ayırma tekniği ile kromatografik yöntemlerin aletsel tasarımının birleşmesinden oluşmaktadır. Bu yöntem ile inorganik katyon ve anyonlar gibi en küçük iyonlardan, DNA gibi büyük molekül ağırlığına sahip moleküllere kadar çeşitli maddelerin kantitatif ve kalitatif olarak tayini mümkündür.

2.1. KAPİLER ELEKTROFOREZİN PRENSİPLERİ

Kapiler elektroforezin en sık kullanılan şekli "Kapiler Zone Elektroforez"dir (CZE). CZE'de ayrım, elektrolit çözeltisi ile dolu olan kapilerde maddelerin farklı göç zamanlarına sahip olmasına dayanır. Kapilerin bir polimer veya jel çözeltisi ile dolu olduğu CE şekli ise "Kapiler Jel Elektroforez"dir (CGE). CGE'de ayrım makromoleküllerin moleküler büyüklüklerine göre gerçekleşmektedir. Yüksüz maddelerin ayrımı için kullanılan CE türlerinden biri "Misel Elektrokinetik Kromatografi"dir (MECK). MEKC'de ayrımın esası elektrolit çözeltisine katılan yüzey aktif maddenin oluşturduğu misel adı verilen kümeler ile çözücü arasında yüksüz maddelerin paylaşım farklılıklarına dayanır. İzoelektrik odaklanma kapiler elektroforez yöntemi proteinlerin ayrımında kullanılır. Bu yöntemde ayrım, proteinlerin farklı pH'larda izolelektrik noktaya sahip olmalarından yararlanarak yapılır. Kapiler Elektrokromatografi tam bir kromatografidir. Kapilerin içi yaklaşık 1μm çaplı sabit fazla doldurulur. Analitler uygulanan elektrik voltaj altında sabit fazda tutunmalarına göre ayrılırlar. Bir diğer CE yöntemi izotakoforezdir (ITP). ITP'de örnek farklı iyon mobilitesine sahip iki elektrolit çözeltisi arasında injekte edilir.

2.2. ELEKTROFORETİK GÖÇ

İyonlar elektrik alan altında sabit bir hızla hareket ederler. Elektrik alan kuvvetini arttırmak her zaman iyonların göç hızlarını da arttırır, dolayısıyla daha hızlı ayrım sağlanır. Elektroforetik mobilite ve elektrik alan arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikteki gibidir:

$$v = \mu_e . E \qquad \textbf{(2.1)}$$

v= İyonun hızı

μ_e= Elektroforetik mobilite

E= Elektrik Alan

Elektrik alan kullanılan kapiler ve uygulanan voltaja göre değişir.

$$E=V/L \text{ (Volt/cm)} \qquad \textbf{(2.2)}$$

İyonların sahip oldukları elektroforetik mobilite, elektrik kuvveti (F_E) ile doğru orantılı iken ortamdaki sürtünme kuvvetiyle (F_F) ters orantılıdır.

Elektrik kuvvet

$$F_E=q.E \qquad \textbf{(2.3)}$$

Küresel olduğu varsayılan bir iyonun sürtünme kuvveti

F_F= -6Πŋrv eşitlikleri ile verilir. **(2.4)**

q=iyonun yükü

ŋ=çözeltinin vizkositesi

r=iyonun yarıçapı

v=iyonun hızı

Elektroforetik göç boyunca bu iki kuvvet birbirine eşit fakat zıttır.

$F_E= F_F$

$$q.E=-6\Pi\eta rv \qquad \textbf{(2.5)}$$

Denklem 2.1 ve 2.5 ile elektroforetik mobilite aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

$$\mu_e= q / 6\Pi\eta r \qquad \textbf{(2.6)}$$

Bu eşitlikten görüldüğü gibi maddenin elektroforetik mobilitesi sabit viskoziteli ortamda yük/büyük oranına bağlıdır. Kısaca küçük ve yükü fazla olan maddeler daha hızlı hareket ederler.

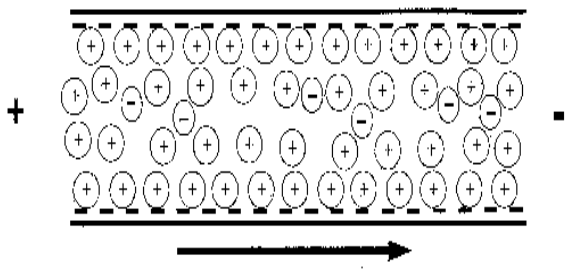
2.3 ELEKTROOSMOTİK AKIŞ

Elektrik alan altında tampon çözeltisi kapilerin içinde bir elektrosmotik akış oluşmasını sağlar. pH 2'nin üzerinde olduğu zaman silika kapilerin duvarı negatif yüklenir. Bunun nedeni silanol gruplarının disosiye olmasıdır.

$SiOH\ (k) \leftrightarrow SiO^{-}(k) + H^{+}(aq)$

Tampon çözeltisindeki pozitif yükler elektrostatik çekimle duvarın negatif yüküyle bir çift tabaka oluşturur ve zeta potansiyeli denilen bir potansiyel farkı oluşur.

Bu sisteme yüksek voltaj uygulanması ile çift tabakanın pozitif iyonları hızla negatif elektroda doğru hareket ederler. İyonlar sulu çözeltide hidratize halde olduklarından çözücüyü de sürüklerler ve kapiler içinde bir elektroosmotik akış (EOF) oluşur. EOF hızı genel olarak injekte edilen analitlerin elektroforetik mobilitelerinden büyüktür. Bu sebeple EOF ile bütün maddeler katoda doğru sürüklenirler. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1: EOF'nin şematik gösterimi

Pozitif ve negatif iyonların hızları elektroforetik mobilitelerine, ortamdaki elektroosmotik mobiliteye ve uygulanan elektrik alana bağlı olarak aşağıdaki eşitlikteki gibi değişir.

$v_{+} = (\mu_o + \mu_{+}).E$

$v_0 = \mu_o.E$ **(2.7)**

$v_{-} = (\mu_o - \mu_{-}).E$

v_+= Pozitif yüklü iyonun hızı

v_0= Nötral maddenin hızı

v_-= Negatif yüklü iyonun hızı

Maddelerin göç zamanları sadece elektroforetik mobiliteleri ile değişmez. Aşağıdaki eşitlikde de görüldüğü gibi göç zamanları, kapilerin boyu ve uygulanan voltaj ile de alakalıdır. Kapilerin etkin boyu, injeksiyon noktasından dedektöre kadar olan kısmının uzunluğudur.

$$t = lL / ((\mu_{eof} \pm \mu_i)V \quad \textbf{(2.8)}$$

t = geliş süresi

L = Kapilerin tam boyu

l = Kapilerin etkin boyu

V = voltaj

2.3.1 Elektroosmotik Akışa Etki Eden Faktörler

EOF'e etki eden faktörler aşağıdaki tabloda verilmiştir

Tablo 2.1: EOF'e etki eden faktörler [15]

Ayırma sistemindeki değişiklik	**EOF'e etkisi**
Tamponun pH değeri arttığında	EOF ↑
Tampon konsantrasyonu arttığında	EOF↓
Sıcaklık arttığında	EOF ↑ (ŋ değişimi nedeniyle)
Organik çözücü ilavesi ile	EOF↓↑
Pozitif yüklü yüzey aktif ilavesi ile	EOF terse çevrilir
Elektrik alan arttığında	EOF ↑

2.4. BAND GENİŞLEMESİ

Ayırma etkinliği (rezolüsyon) HPLC de olduğu gibi CE'de de teorik plato sayısıyla gösterilir.Aşağıdaki denklem Gaussian pikleri için kullanılır.

$$w_b = 4\sigma \quad \textbf{(2.9)}$$

w_b= Pikin taban genişliği

σ= Pikin standart sapması

$$N = 5{,}54.(t / w_{1/2})^2 \quad \textbf{(2.10)}$$

N= Teorik plato sayısı

t= Pikin geliş zamanı

$w_{1/2}$= Yarı yükseklikteki pik genişliği

Eşitlik 2.10'dan da görüldüğü gibi band genişliğinin artması ayırma etkinliğini düşürür. Band genişlemesine neden olan etkenlerden en önemlisi difüzyondur. Kapilerin çapı küçük olduğu için, kapiler çapı boyunca difuzyon ihmal edilebilir ancak kapiler boyunca difüzyon oluşabilir. Difüzyon ve N arasındaki eşitlik şöyledir:

$$\sigma^2 = 2Dt = 2DlL / \mu_e.V \quad \textbf{(2.11)}$$

D=Analitin difüzyon katsayısı

Eştilik 2.10 ve 2.11 yardımıyla teorik plato sayısı ve difuzyon arasında bir eşitlik verilebilir.

$$N = \mu_e.V.l / 2DL = \mu_e.E.L / 2D \quad \textbf{(2.12)}$$

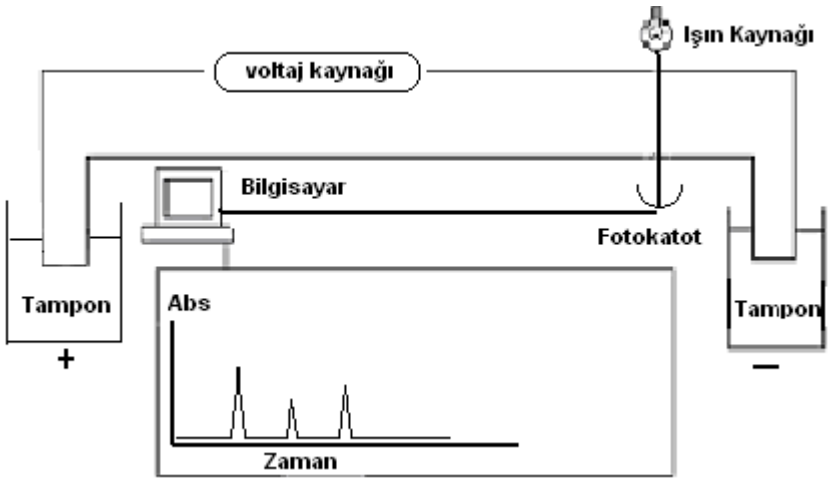
Bu denklemden de görüleceği gibi teorik plato sayısı difüzyon katsayısı arttıkça azalır. Büyük molekül ağırlığına sahip maddeler daha küçük difüzyon katsayılarına sahip oldukları için daha yüksek plato sayıları ile ayrılabilirler. Ayrıca denklem 2.11'de görüldüğü gibi analiz süresi kısaldıkça difüzyon nedeniyle pik genişlemesi azalacaktır. Kapiler elektroforezde yüksek voltaj altında ayırmalar genellikle çok kısa sürede tamamlandığından pikler dik ve simetriktir. Band genişlemesine neden olan diğer parametreler Tablo 2.2'de verilmektedir.

Tablo 2.2: Band genişlemesine neden olan diğer etkenler [15]

Termal Etkiler	Tampon vizkositesinde lokal değişimlerin yarattığı konveksiyon
İnjeksiyon Hacmi	Büyük hacimlerde Difüzyon
Örneklerin duvara adsorpsiyonu	Pik şekillerinde kuyruklanma, zaman ve alanda tekrarlanırlığın düşmesi
Elektrodispersiyon (iletkenlik farklılıkları)	Pik şekillerinin üçgen halinde görülmesi
Tampon seviyelerindeki fark	Göç zamanlarının ve rezolüsyonun düşmesi

2.5 KAPİLER ELEKTROFOREZ CİHAZININ BÖLÜMLERİ

Kapiler Elektroforez cihazının şematik gösterimi Şekil 2.5 de verilmiştir.



Şekil 2.2: CE'nin şematik görüntüsü [16]

2.5.1. Voltaj Kaynağı

Tipik bir CE sisteminde uygulanan voltaj en fazla 30kV'dur. Yapılan çalışmanın güvenilirliği uygulanan voltajın kararlılığıyla yakından alakalıdır. Denklem 2.2'den de görülebileceği gibi voltaj değişimiyle elektrik alan da değişir. Elektrik alanın değişimi göç zamanından alan tekrarlanırlığına bir çok önemli parametrenin değişmesine neden olur.

2.5.2. Kapiler

CE'de kullanılan kapilerlerin iç çapı 25-100 μm; dış çapı 150-520 μm arasında değişir. Kapilerin etkin boyu 50-75 cm arasında, tam boyu ise 5-20 cm daha uzun olarak kullanılır. Kapilerin iç çapının ve boyunun değişmesi göç zamanı, sıcaklık, adsorsiyon, dedeksiyon limiti, injeksiyon hacmi, ayırma etkinliğinin değişmesine neden olur. Genelde silika kapiler kullanılmakla beraber cam veya plastik kapiler kullanılabilir. Fakat cam ve plastik kapilerin UV geçirgenlikleri silika kapilere göre daha düşüktür. Poliimid ile kaplanarak esnek bir yapıya kavuşan silika kapilerde dedeksiyon penceresi polimer tabakası yakılarak açılabilir. İlk defa kullanılacak bir silika kapiler ilk önce 1M NaOH ile 10-30 dk ardından su ve çalışma tamponuyla da yıkanarak şartlandırılır.

2.5.3. İnjeksiyon

İnjeksiyon hacmi 2-20 nL arasında değişir. Aşırı hacimlerde çalışmak pik şeklinin bozulmasına, band genişlemesine, rezolüsyonun azalmasına sebep olur. 2 tip injeksiyon şekli vardır.

1-Hidrodinamik İnjeksiyon :

Bu tür injeksiyon en yaygın kullanılan injeksiyon türüdür. Kendi arasında 3 değişik şekilde gerçekleştirilebilir. Kapilerin dedektör tarafına vakum uygulanarak, kapilerin injeksiyon kısmına basınç uygulanarak ya da injeksiyon kabının yükseltilmesiyle bir sifon etkisi yaratılarak injeksiyon yapılabilir. Hidrodinamik injeksiyon için Poiseuille'nin denkleminden injeksiyon hacmi hesaplanabilir.

$$V=\Delta P \Pi r^4/8\eta L \qquad \textbf{(2.13)}$$

ΔP= kapiler boyunca basınç farkı (dyn.cm^{-2})
r = kapilerin iç çapı (cm)
t= injeksiyon süresi (s)
η = tamponun vizkositesi (dyn.s.cm^{-2})
L= kapilerin toplam boyu

Sifonik injeksiyon için ΔP aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir:

$$\Delta P=\rho g \Delta h \qquad \textbf{(2.14)}$$

ρ = örneğin yoğunluğu (kg.m^{-3})
g= yerçekimi ivmesi katsayısı (9,82 N.kg^{-1})
Δh= örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı (m)

2-Elektrokinetik İnjeksiyon:

Elektrokinetik injeksiyon, örnek kabı ile çıkış tampon kabı arasına çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanarak yapılır. Elektrokinetik injeksiyonun tekrarlanırlığı hidrodinamik injeksiyona göre daha azdır. İnjekte edilen madde miktarı analitlerin elektroforetik mobilitelerine bağlıdır.[17]

2.5.4. Dedeksiyon

CE'de en sık kullanılan dedektörler UV-VIS ve floresans dedektörlerdir. Diğer dedeksiyon yöntemleri ve uygulamaları Tablo 2.3 de verilmiştir.

Tablo 2.3: CE'de kullanılan dedeksiyon yöntemleri [18]

Dedeksiyon Türü	**LOD (mol/L)**	**Tipik Uygulamaları**
UV absorbsiyon	10^{-5}-10^{-8}	Aromatik bileşikler, proteinler, nükleik asitler
İndirek UV	10-100 kat<UV	Aminler, şekerler, org. , inorganik iyonlar
Floresans	10^{-7}-10^{-9}	Aminoasitler, DNA, peptidler
Amperometri	10^{-10}-10^{-11}	Kolay indirgenebilen ve yükseltgenebilen maddeler
Kütle spektrometrisi	10^{-8}-10^{-9}	Protein, peptid, ilaç
Alev Fotometrisi	10^{-3} -10^{-5}	iyonik organik bileşikler

BÖLÜM 3

ADAÇAYI (*SALVİA*)

Adaçayı (*Salvia*), 900 kadar bitki cinsini içine alan Lamiaceae (ballıbabagiller) familyasının önemli bir üyesidir. Bu familyada kekik, nane, lavanta, fesleğen ve mercanköşk gibi hoş kokulu bitki cinsleri de yer almaktadır.

3.1.ADAÇAYININ YAYILIŞI

Adaçayı özellikle Akdeniz Bölgesinin dağlık yamaçlarında ve orman diplerinde yetişmektedir. Ancak, dünyanın ılıman iklimli her yerinde 100 den fazla çeşidine rastlanmaktadır. Tıbbi adaçayının (S. officinallis) anayurdu Güney Avrupadır ve sıcak, kuru bölgelerde kendiliğinden yetişmektedir. Türkiyede yarısı endemik olan 86 tür adaçayının yetiştiği saptanmıştır.

3.2. İKLİM VE TOPRAK ÖZELLİKLERİ

Adaçayı sıcağı seven bir bitkidir ama genç gelişme devresinde yüksek oranda rutubete gereksinim duyar. Ancak daha sonraki büyüme devresinde kuraklığa çok dayanıklı bir bitki halini alır. Kireçce zengin kumlu-tınlı ve tınlı-kumlu topraklarda iyi bir şekilde kültürü yapılabilir.

3.3. BOTANİK ÖZELLİKLERİ

Adaçayı 60, nadiren 100 cm boyunda, yarı çalımsı, saçak köklü bir bitkidir. Sık tüylü ve gri-yeşil yaprakları oval biçimli, kırışık yüzeyli; çiçekleri ise pembe, mor, beyaz ya da kırmızı renklidir. Bu bitkiler yapraklarında bulunan uçucu yağlardan dolayı keskin kokuya sahiptirler. *Salvia triloba* adaçayının yapraklarının su buharı distilasyonu ile damıtılmasından elde edilen adaçayı uçucu yağına **"Acı elma yağı"** da denilmektedir. Bu yağ koku vermek için sabun ve şekerlerde kullanılmaktadır.

3.4.TIBBİ DEĞERİ

Adaçayı, yüzyıllardan beri akla gelen hemen her sağlık sorununda güvenle başvurulan doğal ilaçlardan birisi olmuştur. Tüm ruh ve sinir hastalıklarının tedavisinde sakinleştirici, spazm çözücü, hormonal bozuklukları düzene sokucu, beyin kılcal damarlarını açıcı özellikleri saptanmıştır. Sindirim sistemi hastalıklarında, karaciğer yağlanmalarında, beyin ve kalp damarları tıkanıklıkları, damar sertliklerinde ve daralmalarında, felçlerde, epilepside, parkinsonda, hipertansiyonda, kadınlardaki hormonal bozukluklar ve kısırlıklarda, sivilce, sedef, vitiligo gibi cilt rahatsızlıklarında, bağışıklık sistemi hastalıklarında ve hipertiroid sorununda düzenli kullanıldığında olumlu etkisi saptanmıştır. Ayrıca çeşitli ülkelerde taze ve kuru yaprakları yiyecek olarak da kullanılmaktadır [19,20].

3.5. ADAÇAYININ KİMYASAL BİLEŞENLERİ

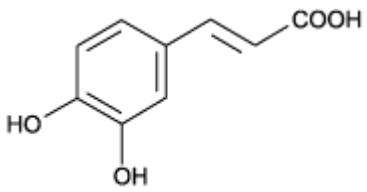
Yaygın kullanımı ve tıbbi özellikleri nedeniyle *Salvia* türlerindeki aktif kimyasalların izolasyonu ve tanımlaması uzun yıllardır çok sayıda yayınla literatüre katılmakta ve bu konuda çalışmalar halen sürmektedir. *Salvia* türlerinde şimdiye kadar saptanan kimyasalları esas olarak üç grup altında toplayabiliriz. 1: Fenolik asitler, 2: Flavonoidler, 3:Terpenler ve terpenoidler.

Salvia türlerinin fenolik asit ve flavonoid içerikleri üzerine kapsamlı bir yayın (review) Lu ve Foo tarafından 2002 yılında yayınlanmıştır [21]. Sadece bu yayında 2002 yılına dek tanımlanan, *Salvia*lardan elde edilen toplam 162 adet fenolik asit ve flavonoid verilmiştir. Salvia aktif kimyasalları konusunda çalışmalar ağırlıklı olarak diterpenoidler üzerinde toplanmaktadır. Bu konuda tanıtım makaleleri yayınlanmaktadır [22-29].

Türkiyede yetişen *Salvia* türlerinin kimyasal içeriklerinin aydınlatılması konusunda İ.Ü.Eczacılık Fakültesinden bir grubun çok kapsamlı çalışmaları mevcuttur. (Ulubelen, Topçu). Bu grup Türkiyede yetişen 86 *Salvia* türünün 46 sını incelemiş ve toplam 282 adet bileşik izole edilerek tanımlanmıştır.

3.5.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler *Salvia* bitkisinin suda çözünen bileşenleridir. *Salvia* türlerindeki fenolik asitlerin hemen büyük bir kısmı monomerinden oligomerlerine kadar uzanan bir aralıkta kafeik asit türevleridir. Kafeik asidin formülü Şekil 3.1.de verilmektedir.



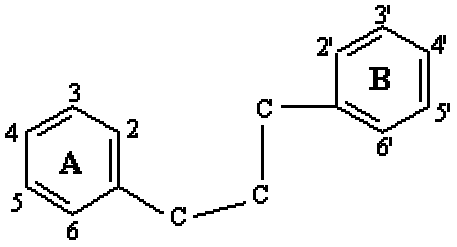
Şekil 3.1: Kafeik asit

Kafeik asidin bir dimeri olan rosmarinik asit en önemli miktar olarak da en çok bulunanıdır. Lu ve Foo nun derleme makalesinde *Salvia* türlerinde tanımlanan 55 adet fenolik asit bileşeni verilmiştir. Fenolik asitlerin bir kısmı ise bitkide glikozidleri halinde bulunmaktadırlar.

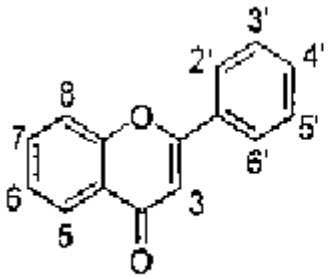
3.5.2. Flavonoidler

Flavonoidler *Salvia*larda ve pek çok bitkide bol miktarda bulunan kimyasallardır. Flavonoidler, lineer üçlü karbon zincirinin iki ucuna benzen halkası katılması ile oluşan polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin genel molekül formülü Şekil 3.2'de görülmektedir.

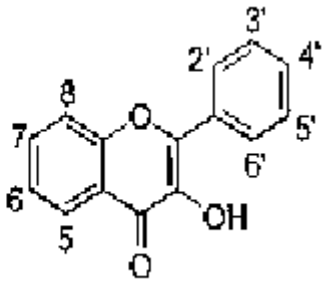
Lu ve Foo makalesinde 46 adet tanımlanmış *Salvia* flavonoidinini ve 39 adet flavonoid glikozidini literatürde taramışlardır. *Salvia* flavonoidleri genel olarak flavon, flavonol ve bunların glikozidleri olarak bulunurlar. Şekil 3.3 de flavon ve flavonol yapısı verilmektedir.



Şekil 3.2: Flavonoidlerin genel formülü



FLAVON



FLAVONOL

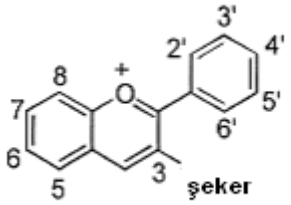
Apigenin 5=7=4'=OH
Luteolin 5=7=3'=4'=OH
Diosmetin 5=7=3'=OH,4'=OCH_3
Trisin 5=7=4'=OH, 3'=5'=OCH_3
Sinensetin 5=6=7=3'=4'= OCH_3
Tangeretin 5=6=7=8=4'= OCH_3
Nobiletin 5=6=7=8=3'=4'= OCH_3
İzoviteksin 5=7=4'=OH, 6=Glukoz

Fisetin 7=3'=4'=OH
Kaempfreol 5=7=4'=OH
Morin 5=7=2'=4'=OH
Herbasetin 5=7=8=4'=OH
Kuarsetin 5=7=3'=4'=OH
Robinetin 7=3'=4'=5'=OH
İzoramnetin 5=7=4'=OH,3'=OCH_3
Mirisetin 5=7=3'=4'=5'=OH
Gosipetin 5=7=8=3'=4'=OH

Şekil 3.3: Flavon ve Flavonolların Genel Molekül Formülü

3.5.3. Antisiyaninler

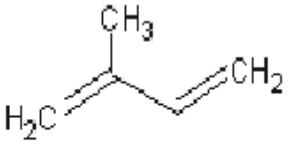
Antisiyaninler *Salvia*ların kırmızı yada mor çiçeklerinde bulunan kimyasallardır. Antisiyanin formülü Şekil 3.4 de verilmektedir. 19 adet Salvia antisiyanin türü tanımlanmıştır [21].



Şekil 3.4: Antisiyaninlerin Genel Formülü

3.5.4.Terpenler ve terpenoidler

Terpenler doğal ürünlerde yaygın olarak bulunan ve kimyasal iskeleti izoprenden (metilbüta-1,3-dien) oluşan organik bileşiklerdir.



İZOPREN

Şekil 3.5: İzoprenin Molekül Formülü

Oksijen içeren terpen türevleri ise terpenoid adını alırlar. Terpenoidlerin önemli biyolojik görevleri bulunmaktadır. Diterpenler ve seskiterpenler antibiyotik özelliğe sahiptir. Ayrıca diterpenler bitki ve hayvan hormonlarıdır. Terpenlerin alt birimleri ve C sayıları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Terpenlerin Alt Sınıfları [30]

	Terpenler	**Izopren birimleri**	**Karbon atomları**
1	Monoterpenler	2	10
2	Seskiterpenler	3	15
3	Diterpenler	4	20
4	Sesterterpenler	5	25
5	Triterpenler	6	30
6	Karotenoidler	8	40
7	Rubber	> 100	> 500

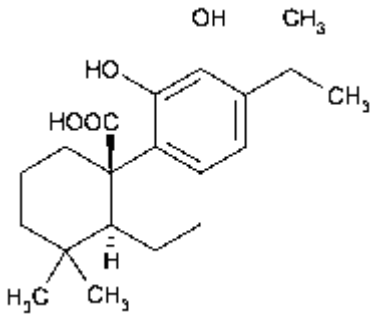
Monoterpenlere tanınmış bir örnek mentol, diterpen grubuna vitamin A_1 ve triterpen grubuna progesteron, testesteron gibi hormon gruplarını içine alan steroidler verilebilir. Literatürde çok sayıda *Salvia* terpenoidlerinin izolasyonuna ait çalışmalar bulunmaktadır. Türkiyede yetişen 46 adet *Salvia* türlerinden Ulubelen ve ekibi tarafından 229 adet terpen izole edilip tanımlanmıştır.

BÖLÜM 4

ROSMARİNİK VE KARNOSİK ASİT

4.1. KARNOSİK ASİT

Karnosik asitin (CA) kimyasal yapısı bir abietan diterpendir. CA yağ peroksidasyonuna karşı güçlü bir inhibitördür. Antioksidan aktivitesinin dışında antimikrobiyal, antiviral, antimutajenik ve antikansojerenik aktiveye de sahiptir.[31] Karnosik asitin molekül formülü şekil 4.1 de görülmektedir.

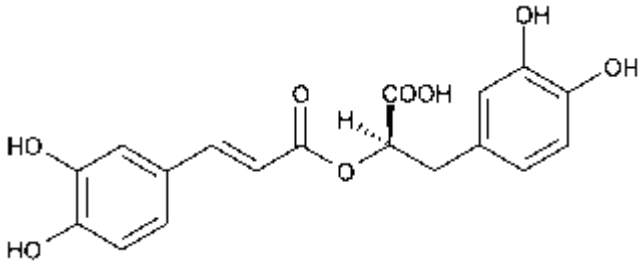


Şekil 4.1: Karnosik Asit

4.2. ROSMARİNİK ASİT

Rosmarinik asidin kimyasal yapısı bir fenolik asittir.Kafeik asit ve 3.4-dihidroksifenillaktik asidin esteridir. Rosmarinik asit antimikrobik, antiviral ve antienflaumatuar özelliklerinin yanında antioksidan özelliği de sahip bir bileşiktir. Antioksidan aktivitesi vitamin E'den bile daha fazladır.[32] Antitrombotik özelliği [33] ve böbrek hücrelerini koruyucu etkisi olduğu [34] kanıtlanmıştır.Ayrıca kırışık önleyici etkisi [35] sayesinde kozmetik ürünlerde de kullanılmaktadır. Rosmarinik asit gibi fenolik bileşikler hücreleri serbest radikallerin verdiği zarardan koruyarak

kanser riskini azaltmaktadır. Rosmarinik asitin molekül formülü şekil 4.2 de görülmektedir.



Şekil 4.2: Rosmarinik Asit

Her iki asidin de görüldüğü gibi aktif oldukları pek çok alan bulunmaktadır. *Salvia officinalisin* temel antioksidan özelliğinin miktar bakımından temel olarak bu iki maddeden geldiği kabul edilebilir. Bu nedenle bu iki bileşenin ortak en güçlü özellikleri olan antioksidan özellikleri hakkında aşağıda bilgi verilmektedir.

4.3. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, yağların veya diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe eden ya da yavaşlatan, serbest radikalleri nötralize eden maddelerdir. Serbest radikaller yüksek aktiviteye sahip bileşiklerdir. Kirli hava, sigara, radyasyon, bozulmuş gıdalar ve normal vücut metabolizması serbest radikallerin kaynağıdır. İlk serbest radikalin oluşması ile birlikte kontrol edilemeyen zincirleme bir reaksiyon başlar.

$$R^{\cdot} + {}^{3}O_2 \rightarrow ROO^{\cdot} \qquad \textbf{(4.1)}$$

$$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot} \qquad \textbf{(4.2)}$$

Burada $ROO^{\cdot}$ **(**yağ peroksi radikali) ve $R^{\cdot}$ **(**serbest radikal**)** yeni bir reaksiyonun başlamasına neden olurlar.[36]

4.4. ANTİOKSİDANLARIN TIBBİ ETKİLERİ

Damar sertliği ve kalp hastalıklarının başlıca nedeninin serbest radikaller olduğu düşünülmektedir. Oksidatif zararla parçalanmış kan hücrelerinin arter duvarlarına yapışması atardamarlara zarar verir. Kardiyovasküler hastalıklar, kalp ile beyine

giden kan ve oksijenin azalmasından kaynaklanmaktadır. Serbest radikal etkisini gösterdiğinde oksijenden mahrum kalan dokular ; hastalığın ilerlemesini hızlandırır ve kalp krizi geçirme riskini arttırır. Serbest radikaller nükleik asitlere de etki ederek hücrelerin genetik kodlarının değişmesine neden olabilirler. Aşırı hücre ölümü erken yaşlanmaya yol açarak kanser ve benzeri hastalıkları tetikleyebilir. Ayrıca dokuların erken yaşlanması serbest radikallerin zararları sonucu ile oluşan hücre kalıntılarının çoğalmasından kaynaklanmaktadır [37].

4.5. ANTİOKSİDANLARIN KAYNAĞI

Antioksidanların doğal kaynakları hayvansal ve bitkisel olabildiği gibi, sentetik olarak üretilen antioksidanlar da bulunmaktadır. Antioksidan özellik gösteren doğal kaynaklar ve etken maddeleri Tablo 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1 Doğal Antioksidanlar [37]

Vitaminler	A, C, E
Meyve ve sebzeler	Flavonoid; karotoneidler
Baharat, bitki, çay, kakao	Fenolik Bileşikler,terpenler
Mineraller,enzim bileşenleri	Se, Zn, Cu
Yağ ve yağ asitleri	Fosfolipidler

BÖLÜM 5

DENEYSEL KISIM

5.1. Kullanılan Cihazlar

Ayırma ve tayinler Diod array dedektörle kombine Agilent marka kapiler elektroforez cihazı kullanılarak yapıldı. pH ölçümlerinde Metrohm (654 pH meter) marka pH-metre, adaçaylarının ekstraksiyonunda sonorex marka ultrasonik su banyosu kullanılmıştır. Kullanılan kapiler kolonlar Polymicro Technologies firmasına aittir. Kapilerin iç çapı 50 μm, toplam uzunluğu 53 cm ve etkin uzunluğu 45 cm olarak seçildi. Kapiler ilk kullanımda yarım saat 1M NaOH ile ve her injeksiyon arasında 3 dakika NaOH, ardından 2 dakika çalışma tamponu ile yıkandı. Otomatik kapiler yıkaması, örnek injeksiyonu ve voltaj uygulaması ve verilerin değerlendirilmesi Agilent ChemStation yazılım programına sahip bir PC bilgisayarla kontrol edildi.

5.2. Kimyasallar

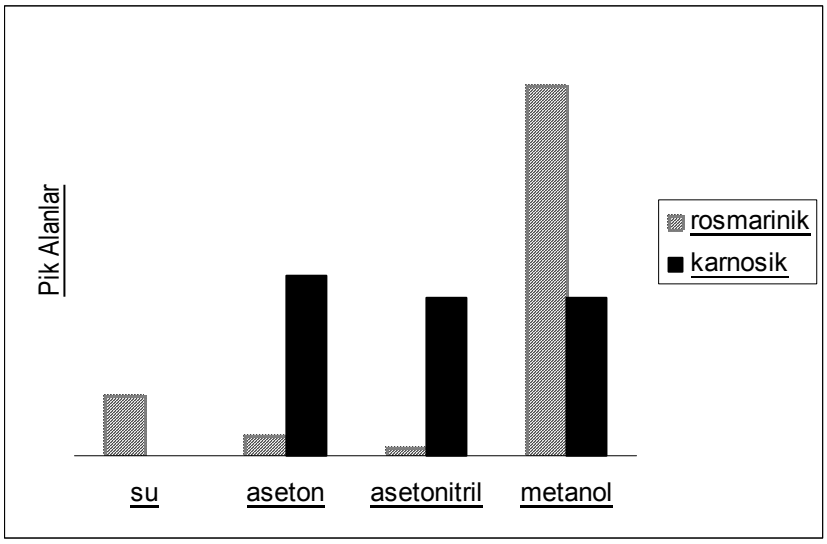
Karnosik asit, rosmarinik asit ve metanol Sigma (Steinheim,Germany) dan; sodyum borat ve kumarin Merck (Darmstadt,Germany) den, ticari adaçayları marketlerden temin edilmiştir.

5.3. Adaçayı Örneklerinin Hazırlanması

Doğaçay, Obaçay, Doğuş, Arifoğlu, Doğa, Doğadan, Botany marka poşet adaçayları içinden ve doğal bitki adaçayından alınan 1 gramlık tartımın üzerine 20 ml metanol eklendikten sonra 1 saat ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra 125 mm'lik filtre süzgeç kağıdından süzülerek injeksiyon yapılmıştır. Ticari adaçaylarının homojenliğini sağlamak için 5 adet poşet karıştırılıp bu karışımdan tartım alınmıştır. Doğal kuru bitki adaçayının yaprakları küçük parçalara ayrılıp karıştırılmıştır.

5.4. Uygun Çözücünün Seçilmesi

Ekstraksiyonda kullanılacak uygun çözücünün seçilmesi için su, metanol, asetonitril ve aseton ile denemeler yapılmıştır. Seçilen bu dört çözücüden alınan 10 ml ile 1 gram adaçayı 1 saat boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. Her bir çözücüdeki rosmarinik asit ve karnosik asit pik alanlarının değerleri okunmuş ve grafiğe geçirilmiştir. Şekil 5.1'den de görüleceği gibi rosmarinik asit en polar çözücü olan suda bir miktar çözünmekte ancak karnosik asid suya hiç geçmemektedir. Buna karşılık karnosik asidin bu çözücülerden polaritesi en düşük olan asetona geçtiği rosmarinik asit için ise bu çözücünün uygun olmadığı görülür. Karnosik asit ile rosmarinik asidin birarada tayini için en uygun ekstraksiyon çözücüsünün metanol olduğu saptandığından, adaçayı örneklerinin ekstraksiyonu için çözücü olarak metanol seçilmiştir.



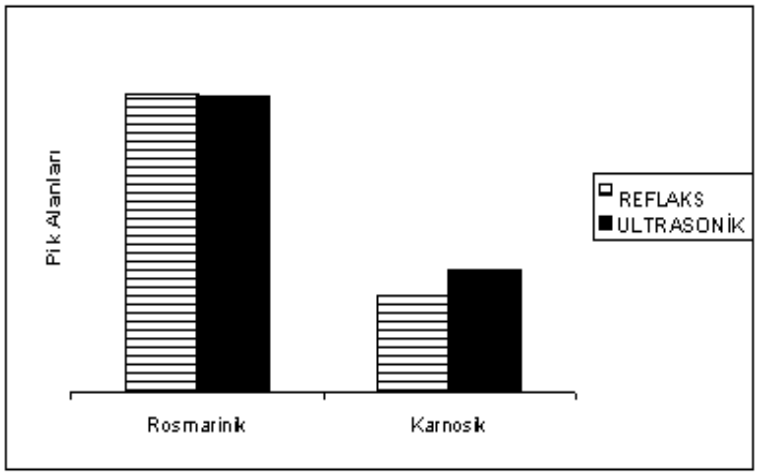
Şekil 5.1: Rosmarinik ve Karnosik Asidin Farklı Çözücülerdeki Pik Alanları

5.5.Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi

Ekstraksiyon yöntemi olarak geri soğutucuda (reflaks) ve ultrasonik banyoda ekstraksiyon denenmiştir. Her iki ekstraksiyon yönteminde de aynı marka adaçayından alınan 1 gramlık örnek, 10 ml metanolle 1 saat muamele edilmiştir.

Şekil 5.2'den görüleceği gibi iki ekstraksiyon arasında rosmarinik ve karnosik pik alanları bakımından önemli bir fark yoktur. Ancak literatürde karnosik asidin ısı ile bozulduğuna ilişkin çok sayıda rapor olması ve uygulama kolaylığı bakımından

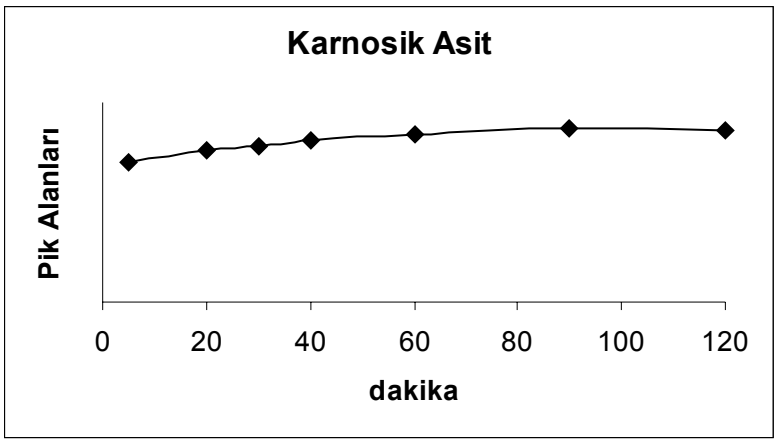
adaçaylarının ultrasonik banyo içinde metanol çözücüsü ile ekstraksiyonu tercih edilmiştir.



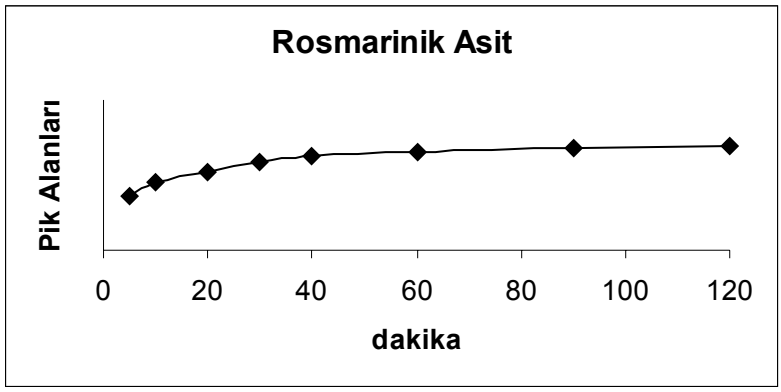
Şekil 5.2: Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

5.6. Ekstraksiyon Zamanının Seçilmesi

1 gram adaçayı örneği üzerine 10 ml metanol eklenerek 5, 10 , 20 , 30 , 40 , 60 , 90 , ve 120 ‘şer dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Şekil 5.3 ve Şekil 5.4’den de görüldüğü gibi 60 dakika sonrası rosmarinik ve karnosik asit pik alanları sabit kalmıştır. Ekstraksiyon zamanı bu sebeple 60 dakika olarak seçilmiştir.



Şekil 5.3: Karnosik Asidin Pik Alanlarının Ekstraksiyon Zamanıyla değişimi



Şekil 5.4: Rosmarinik Asidin Pik Alanlarının Ekstraksiyon Zamanıyla değişimi

5.7. Tampon Konsantrasyonun Seçilmesi

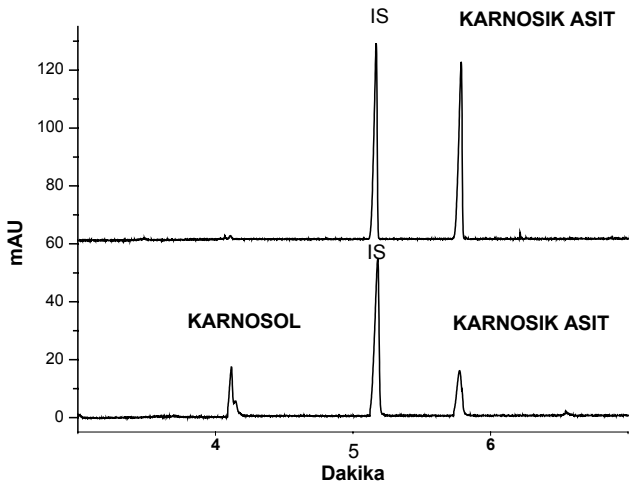
CE de tamponun ayırımcılık üzerinde (rezolüsyon) etkisi önemlidir. Bu nedenle seçilen bir adaçayı örneği ile yapılan ön denemelerde pH'ı 9,4 olan 30 mM'lık borat tamponu kullanıldığında adaçayındaki karnosik asit piki, adaçayı içeriğinde bulunan ve tanımlanamayan diğer kimyasal madde piklerinden tamamen ayrılmış ancak rosmarinik asit piki tam olarak ayrılmamıştır. Rosmarinik Asit pikinin en iyi şekilde ayrımını sağlayan tamponun seçilmesi amacıyla aynı adaçayı örneği 30, 40, 50, 60 mM borat tamponuna injekte edilerek denemeler yapılmıştır. Tampon konsantrasyonu arttıkça beklenildiği gibi rosmarinik asit piki, çevresindeki piklerden ayrılmış ancak yüksek konsantrasyonlarda geliş süresi artmıştır. Geliş süresinin artmasıyla pik genişler bu da kantitatif analiz için istenmeyen bir durumdur. Rosmarinik asidin ayrımı bakımından 40 ve 50 mM arasında kayda değer bir fark yoktur. 60 mM' da ise daha önce değinildiği gibi rosmarinik piki geç gelmiştir. Bu nedenler göz önüne alınarak çalışma tamponunun konsantrasyonu 40 mM olarak seçilmiştir.

5.8. Karnosik Asidin Karnosola Bozunması

Karnosik asit ışık ve ısının etkisiyle karnosola indirgenmektedir[6,7,8]. Şekil 5.9'da 1 hafta buzdolabında bekleyen karnosik asit standart çözeltisinin elektroforegoramı görülmektedir. 1 haftada, Karnosik asidin % 61'i bozulmuştur.Aynı deneme adaçayı örneğine de uygulanmıştır. Buzdolabında 1 hafta bekleyen adaçayında, karnosik

asidin % 36'sı bozulurken oda sıcaklığında 1 hafta bekleyen adaçayındaki karnosik asidin %81'i bozulmuştur.

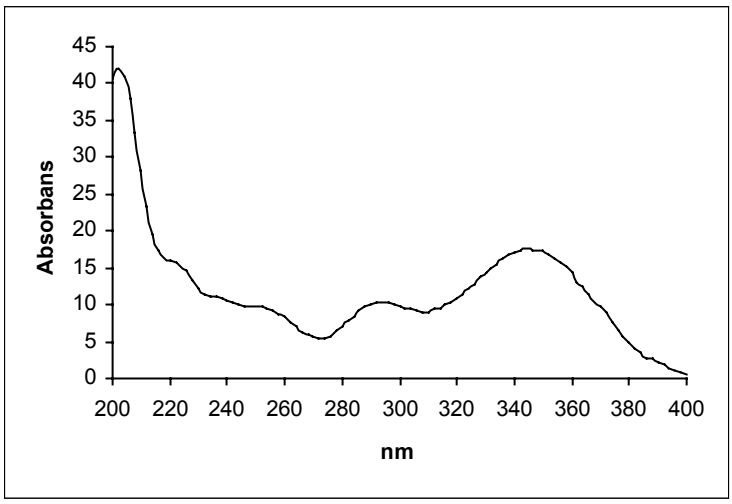
Saf karnosik asidin oda sıcaklığında 30-60-90 dakika bekleyen örneklerinde karnosola bozulma görülmemiştir. Örneklerin hazırlanma, ultrasonda bekleme ve hızla süzülerek injekte etme süresi genel olarak 70 dakikayı geçmediğinden analiz süresi boyunca adaçayındaki karnosiğin karnosola dönüşmediğini söyleyebiliriz.



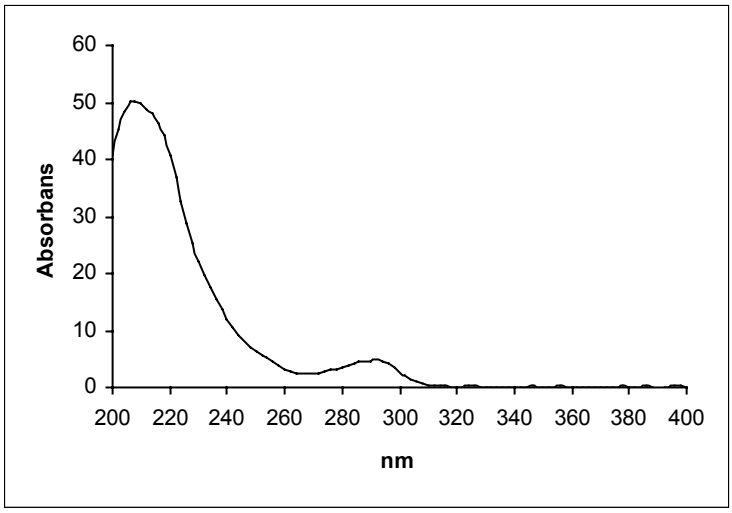
Şekil 5.5: Karnosik Asidin Karnosola Bozulması

5.9. Karnosik ve Rosmarinik Asitin UV spektrumu

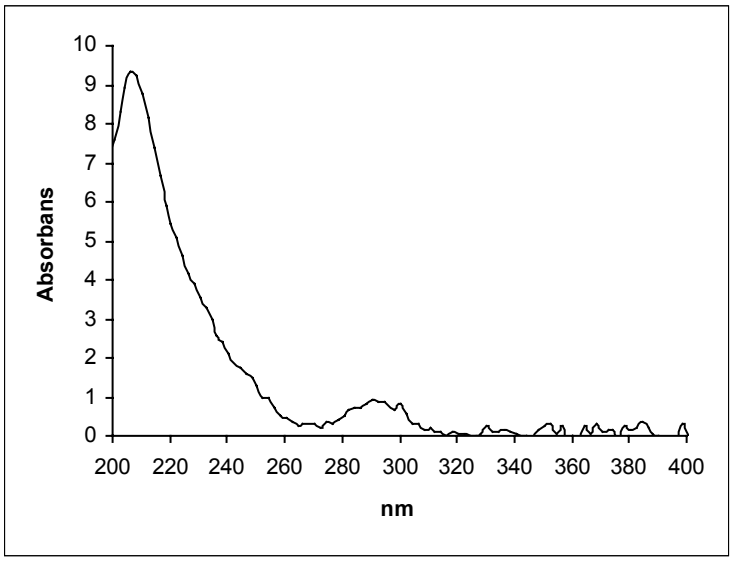
Karnosik ve rosmarinik asitin metanolde hazırlanan 1 mg/ml'lik stok çözeltilerinin ayırma elektrolitine injeksiyonu ile pik üzerinden alınan UV spektrumları Şekil 5.6 ve Şekil 5.7'de görülmektedir. Karnosik asitin bozunma ürünü olan karnosolun UV spektumu da karnosol pikinden alınmıştır (Şekil 5.8).



Şekil 5.6: Rosmarinik Asitin UV spektrumu



Şekil 5.7: Karnosik Asitin UV Spektrumu



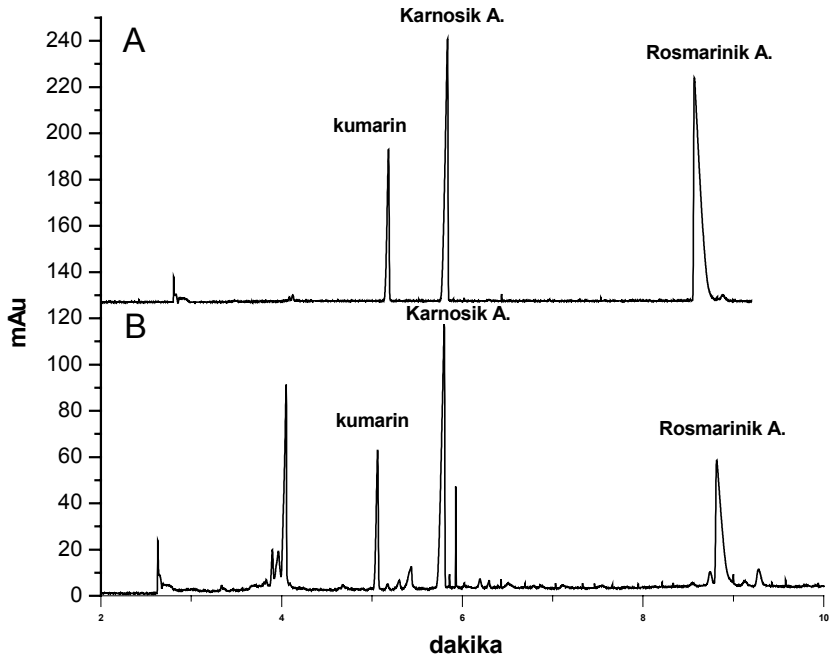
Şekil 5.8: Karnosolun UV Spektrumu

BÖLÜM 6

SONUÇLAR

6.1. Adaçayı Örneklerindeki Karnosik ve Rosmarinik Asit Piklerinin Saptanması

Ticari adaçaylarının ve bitki adaçayının analizleri ön denemeler sonucu optimal şartlar olarak saptanan 40 mM Borat tamponu (pH:9,6) kullanılarak, 25 ^{0}C sıcaklıkta 28 kV voltaj altında yapılmıştır. Elektroferogramlar 210 nm de alınmıştır. Kullanılan kapiler çapı 50 μm, toplam uzunluğu 53 cm ve etkin uzunluğu 45 cm olan silika kapilerdir. İç standart olarak kumarin seçilmiştir. Şekil 6.1'de adaçayı ekstraktı örneğinin elektrofrogramının (B) 500 μg/ml rosmarinik asit ve karnosik asit ve 100 μg/ml kumarin iç standartı içeren standart çözeltinin elektroferogramıyla (A) karşılaştırılması görülmektedir. Piklerin teşhisi adaçayı ekstresine standart ekleme yoluyla ve adaçayı ekstresindeki muhtemel pik spektrumlarının standart madde spektrumları ile karşılaştırılması ile yapılmıştır.

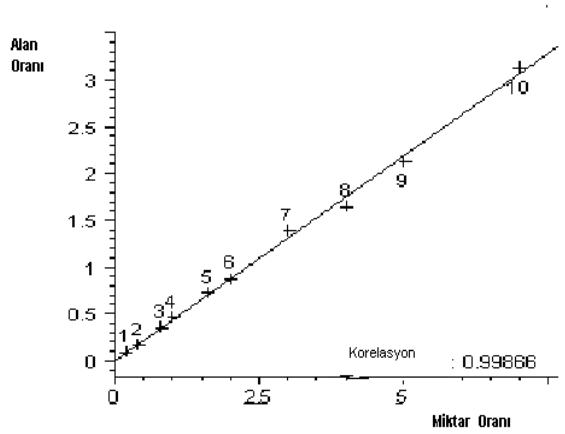


Şekil 6.1: Adaçayı ekstresinin ve Standart çözeltinin Elektroforegramlarının Karşılaştırılması A:Standart maddelerin elektroferogramı B:Adaçayı örneğinin elektroferogramı

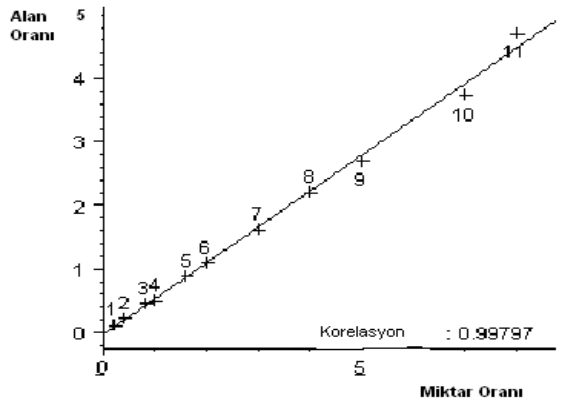
6.2. Adaçaylarındaki Karnosik ve Rosmarinik Asit Miktar Tayinleri

6.2.1. Kalibrasyon Grafikleri

Adaçayındaki karnosik ve rosmarinik miktarlarını tayin etmek için, her iki standart maddenin kalibrasyon eğrisi çizildi. Karnosik asit için 20-40-80-100-160-200-300-400-500-700 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusal kalibrasyon grafiği çizilebilirken, rosmarinik asit için 20-40-80-100-160-200-300-400-500-700-800 µg/ml konsantrasyonlar kullanılmıştır. Karnosik asit için 800 µg/ml'lik konsantrasyon doğrusallıktan sapma göstermiştir. Kalibrasyon eğrisi için iç standart olarak 100 µg/ml kumarin kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrileri Şekil 6.2 ve Şekil 6.3 de görülmektedir.



Şekil 6.2: Karnosik Asit Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 6.3: Rosmarinik Asitin Kalibrasyon Eğrisi

Kalibrasyon denklemleri karnosik asit için y= 0,43650186x + 0,0038267 ve rosmarinik asit y= 0,5610757x-0,0335423 olarak bulunmuştur. Doğrusal regrasyon değerleri karnosik ve rosmarinik asit için sırasıyla 0,99866 ve 0,99797 dur.

6.2.2. Pik Alanı ve Pik Geliş Süresi Tekrarlanabilirlik Değerleri

Tekrarlanabilirliği hesaplamak için seçilen adaçayı örneği ardarda yedi kere injekte edilmiştir. Rosmarinik ve karnosik asitin geliş süresi ve alanlarının % RSD olarak tekrarlanabilirlik değerleri Tablo 6.1'de görülmektedir.

Tablo 6.1: Rosmarinik ve Karnosik Asitin Tekrarlanabilirlik değerleri

	A(Pik Alanı) %RSD	t(geliş süresi)%RSD
Rosmarinik Asit	1,86	1,03
Karnosik Asit	2,99	0,09

6.2.3. Doğruluk analizleri

Yöntemin doğruluğu, adaçayı örneklerinde saptanan karnosik asit ve rosmarinik asit piklerinin farklı bölgelerinden alınan spektrumların standart örnek spektrumları ile karşılaştırılması ile pik saflığı analizi ile kontrol edilmiştir. Her iki örnek için pik saflığı % 99.8'in üzerinde bulunmuştur.

Ayrıca, adaçayı ekstresine üç farklı konsantrasyonda standart madde ilavesi ile geri kazanım analizleri yapılmıştır. Tablo 6.2'de adaçayı örneği üzerine ilave edilen standart rosmarinik ve karnosik asitlerin miktarlarının geri kazanımları görülmektedir.

Tablo 6.2 : Geri Kazanım

Eklenen Madde Kons.	ROSMARİNİK ASİT	KARNOSİK ASİT
50mikrogram/ml	% 93,6	%98,50
100mikrogram/ml	% 95,1	%99,20
150mikrogram/ml	% 109	%103

6.2.4. Yöntemin minimum dedeksiyon sınırı (LOD)

Yöntemin LOD değeri elektroferogramın farklı bölgelerinden hesaplanan taban çizginin ortalama gürültü miktarının üç katı sinyal kabul edilerek hesaplanmıştır. Buna göre karnosik asit için LOD 2,79 μg/ml ve rosmarinik asit için 3,18 μg/ml olarak saptanmıştır.

6.2.5. Adaçayı ekstrelerindeki karnosik ve rosmarinik asit miktarları.

Adaçaylarının metanol ekstraksiyonlarına geçen rosmarinik ve karnosik miktarları mg/g olarak Tablo 6.3'de verilmiştir.Her marka adaçayı için 3 farklı günde 3 farklı ekstraksiyon yapılarak miktar tayini yapılmıştır.

Tablo 6.3: Adaçayı ekstrelerindeki karnosik ve rosmarinik asit miktarları

Marka	Karnosik Asit (mg/g)	Rosmarinik Asit (mg/g)
Botany	5,42 ± 0,06	2,82 ± 0,16
Doğadan	7,16 ± 0,16	3,18 ± 0,22
Tema	6,31 ± 0,05	2,61 ± 0,24
Obaçay	2,99 ± 0,01	2,96 ± 0,14
Doğuş	3,45 ± 0,04	2,50 ± 0,01
Arifoğlu	6,81 ± 0,23	3,89 ± 0,36
Doğa	4,67 ± 0,15	4,01 ± 0,4
Kuru Bitki	11,4 ± 0,2	1,80 ± 0,02

6.3. Sonuç

Çalışmada tıbbi ve gıdasal önemi olan Adaçayı (*Salvia*) bitkisi içerisindeki en önemli antioksidanlardan olan karnosik asit ve rosmarinik asidin kapiler elektroforezle birarada tayini için bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen analiz yöntemi bitkisel çay olarak tüketilen adaçayı örneklerinin karnosik ve rosmarinik asit içeriklerinin analizine uygulanmıştır. Her iki aktif madde aynı anda 9 dakika gibi kısa bir sürede analiz edilebilmiştir. Yöntem tekrarlanır sonuçlar vermektedir ve her iki asidin dedeksiyon limitleri *Salvia* ekstrelerinde miktar tayini için yeterlidir.

CE'in bitki örneklerinin analizinde HPLC'ye göre avantajı ön saflaştırma gerektirmeksizin örneklerin kolona injekte edilmesi ve çok az madde tüketimidir. Bu hem zaman hem de para yönünden ekonomi sağlamaktadır. Dolgu kolonlara göre çok ucuz olan kapiler kolonlar her injeksiyon sonucu çeşitli yıkama yöntemleri ile yıkanarak rejenere edildikleri için herhangi bir ön saflaştırma işlemi de gerekmemektedir.

KAYNAKLAR

[1] **Robards, K.,** Strategies for the Determination of Bioactive Phenols in Plants, Fruit and Vegetables, 2003. *Journal of Chromatography A*, **1000**, 657-691.

[2] **Suntornsuk, L.,** Capillary Electrophoresis of Phytochemical Substances , 2002. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , **27** , 679-698.

[3] **Miura, K., Kikuzaki, H., and Nakatani, N.,** Antioxidant Activity of Chemical Components From Sage (*Salvia officinalis L.*) and Thyme (*Thymus vulgaris L.*) Measured by the Oil Stability Index Method, 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1845-1851.

[4] **Santos-Gomes, P., C., Seabra, R., M., Andrade, P., B., Fernandes-Ferreira, M.**, Determination of Phenolic Antioxidant Compounds Produced by Cali and Cell Suspansions of Sage (*Salvia officinalis L.*), 2003. *Journal of Plant Physicology*, **160**, 1025-1032.

[5] **Zheng, W., Wang, S., Y**., Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, 2001. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5165-5170.

[6] **Okamura, N., Fujimoto, Y., Kuwabara, S., Yagi, A.,** High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Carnosic Acid and Carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*, 1994. *Journal of Chromatograpy A*, **679**, 381-386.

[7] **Thorsen, M., A., Hildebrandt, K., S.,** Quantitative Determination of Phenolic Diterpenes in Rosemary Extracts, 2003. *Journal of Chromatograpy A*, **995,** 119-125.

[8] **Bicchi, C., Binello, A. and Rubiolo, P.,** Determination of Phenolic Diterpen Antioxidants in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with Different Methods of Extractions and Analysis, 2000. *Phytochemical Analysis*, **11**, , 236-242.

[9] **Wang, H., Provan, G., J., Helliwel, K**., Determination of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid in Aromatic Herbs by HPLC, 2004. *Food Chemistry*, **87**, 307-311.

[10] **Areias, F., Valentao, P., Andrade, P., B., Ferreres, F. and Seabra, R., M.,** Flavonoids and Phenolic Acids of Sage : *Influence of Some Agricultural Factors*, 2000., , **48**, 6081-6084.

[11] **Yuan, J.,Chen, H., Chen, F.,** Simultaneus Determination of Rosmarinic Acid, Lithospermic Acid B, and Related Phenolics in *Salvia miltiorrhiza* by HPLC, 1998. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2651-2654.

[12] **Ibanez, E., Cifuentes, A., Crego, A., L., Senorans, F., J., Cavero, S. and Reglero, G.,** Combined Use of Supercritical Fluid Extractions, Micellar Electrokinetic Chromatography, and Reverse Phase HPLC for the Analysis of Antioxidants From Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), 2000. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 460-465.

[13] **Saenz-Lopez, R., Fernandez-Zurbano, P., Tena, M., T.,** Capillary Electrophoretic Separation of Phenolic Diterpens From Rosemary, 2002. *Journal of Chromatography A*, **953**, 251-256.

[14] **Bonoli, M., Pelillo, M., Lercker, G.,** Fast Separation and Determination of Carnosic Acid and Rosmarinic Acid in Different Rosemary (*Rosmarinus Officinalis)* Extracts by Capillary Zone Electrophoresis with Ultra Violet-Diode Array Detection, 2003. *Chromatographia*, **57**, 505-512.

[15] **Engelhardt, H. and Beck, W., Schmitt, T.,**1994. Capillary Electrophoresis , Lengericher Handelsdruckkerei, Lengerich.

[16] http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/electrophoresis.

[17] **Bjergegaard, C. And Michaelsen, S.,** 1999. Chromatography and Capillary Electrohoresis in Food Analysis, Paston Prepress, Denmark.

[18] **Heıgher, D.N.**, 1992. High Performance Capillary Electrophoresis, Heelet Packard GmbH, Germany.

[19] http://herbalistatabay.com/adaçayı.

[20] http://bahce.biz/baharat/baharatlar/adaçayi2.htm.

[21] **Lu, Y. and Foo, L**.Y., 2001. Polyphenolics of Salvia-a rewiev, *Photochemistry*, **59**, 117-140.

[22] **Chang, H.M.,Cheng, K.P., Choang, T.F., Chow, H.F., Chui, K.Y., Hon, P.M.,Lau Tan, F.W., Yang, Y., Zhong, Z.P., Lee, C.M.,Sham, H.M., Chan, C.F.,Cui, Y.X.,Wong, H.N.C.**, 1990. Structure Elucadation and Total Synthesis of New Tanshinones Isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge .*Journal Of Organic Chemistry* , **55,** 3537-3543.

[23] **Zhang, K.Q., Bao, Y., Wu, P., Rosen, R.T. ,Ho**, C.T. ,1990. Anti-oxidative Components of Tanshen (*Salvia* miltiorrhiza) .*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 1194-1197.

[24] **Propokenko, S. A., Litkivenko, V.L.**, 1980. Biogically Active Compounds from plants of the *Salvia* Genus. *Farmatsevtichhnii Zhurnall* (Kiev), 67-68.

[25] **Kong, D**., 1989. Chemical Constituents of *Salvia miltiorrhiza .Zhongguo Yiyao Gongye Zashi*, **20**, 279-285.

[26] **Tang, W., Eisenbrand**, G., 1992. Chinese Drugs of Plants Origin. Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. *Springer-Verlag*, Berlin, Heiderlbeg, 891-902.

[27] **Al-Hazimi, H.M.C., Miana**, G.A., 1994. The Diterpenoids of *Salvia* Species. Part II . *Journal Of Chemical Society of Pakistan*, **16**, 46-63.

[28] **Rodriguez-Hahn, L., Esquivel, B., Cardenas**, J., 1995. Neo-clerodane Diterpenoids from American *Salvia* Species.*Recent Advances in Photochemistry*, **29**, 311-332.

[29] **Ulubelen, A., Topcu, G.**, 1998. Chemical and Biological investigations of *Salvia* Species Growing in Turkey. *Studies in Natural Products Chemistry*, **20**, 659-718.

[30] http://www.cyberlipid.org/simple/simp0004.htm

[31] **Shi, J. and Mazza, G., Maguer, M.,** 2002. Functional Foods, CRC Pres, Ottawa.

[32] http://www.phytochemicals.info/rosmarinic-acid.php.

[33] **Zou, Z.W., Xu, L.N.,Tian, J.Y.,** 1993. Antithrombotic and Antiplatelet Effects of Rosmarinic Acid, a Water-soluble Component Isolated from Radix *Salvia miltiorrhizae* (Danshen). *Yaoxue Xuebao*, **28**, 241-245.

[34] **Yokozawa,T., Liu, Z.W., Chen, C.P., Tanaka ,T**., 1999. Evaluation of Caffeic acid Anologs Usings a Cultured Rebal Epithilial Cell-line, *Pharmacy and Pharmacology Communacitions* **, 5**, 365-370.

[35] **Miyazaki, T., Ito, H., Kosoka, K**., 1998. Cosmetics Contaning Rosmarinic Acid. *Kokai Tokkyo Koho JP* 10 291, 929 [98 291, 929]

[36] **Madhavi, D. L., Despande S. S. and Salunkhe, D. K.**, 1996. Food Antioxidants, Marcel Dekker, Newyork.

[37] **Miguel, J. And Fleming**, **J.,** 1982 Antioxidation, Metabolic Rate, and Aging in Drosophila, Arch Geron Geriatr; 1-159.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İstanbul'da doğdu. Basınköy İlk ve Ortaokulu'nu bitirdikten sonra1997 yılında Florya Tevfik Ercan lisesi'nden mezun oldu. 2003 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun olup aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi'nde Yüksek Lisans'a başladı. Mart 2004'de analitik kimya anabilim dalına araştırma görevlisi olarak kabul edildi ve halen bu görevini sürdürmektedir.