T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI *ALLIUM* (Yabani Sarımsak) TÜRLERİNİN AFLATOKSİN, AĞIR METAL VE SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİNİN ICP-MS VE LC-MS/MS İLE BELİRLENMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Ebubekir İZOL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

MART - 2016

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Ebubekir İZOL tarafından yapılan "Bazı *Allium* (Yabani Sarımsak) Türlerinin Aflatoksin, Ağır Metal ve Sekonder Metabolit İçeriklerinin ICP-MS ve LC-MS/MS ile Belirlenmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Üye : Prof. Dr. Engin TİLKAT

Üye : Doç. Dr. Abdulselam ERTAŞ

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/03/2016

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

28/03/2016

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, bilim insanı profili ve insani yönü ile örnek aldığım, maddi ve manevi yönü ile sürekli bana destek olan, teşvik eden ve yardımlarını benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Hamdi TEMEL'e,

Tez çalışmam süresince her konuda rehberliğine başvurduğum ve desteğini her zaman yanımda gördüğüm değerli Doç. Dr. Abdulselam ERTAŞ'a,

Çalışmalarım boyunca desteklerini eksik etmeyen Yrd. Doç. Dr.Mehmet BOĞA ve her zaman yanımda hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ'a ve Uzman İsmail YENER'e,

Tez çalışmam süresince her zaman, her anlamda yanımda olan, desteğini esirgemeyen çok değer verdiğim babam Mehmet İZOL ve annem Müzeyyen İZOL'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (DÜBAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No: ECZACILIK. 15.005).

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR I

İÇİNDEKİLER II

ÖZET VI

ABSTRACT VII

ÇİZELGE LİSTESİ VIII

ŞEKİL LİSTESİ IX

EKLER XII

KISALTMA ve SİMGELER XIV

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ 3

2.1. Araştırılan Türler ile İlgili Genel Bilgiler 3

2.1.1. *Allium* Türlerinin Genel Özellikleri 4

2.1.2. *Allium* Türleri ile İlgili Yapılan Araştırmalar 14

2.2. Aflatoksinler 19

2.3. Ağır Metaller 21

2.4. Antioksidanlar 23

2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması 25

2.4.1.1. Birincil Antioksidanlar 25

2.4.1.2. İkincil Antioksidanlar 27

2.4.2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 28

2.4.2.1. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Metodu 29

2.4.2.2. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Metodu 29

2.4.2.3 β-Karoten Renk Açılım Metodu 30

2.4.2.4. CUPRAC Metodu (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) ... 30

2.5. Alzheimer Hastalığı 31

2.5.1.	Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirilkolinesteraz (BChE) İnhibitörleri …..	31
2.5.2.	Kolinesteraz İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığındaki Mekanizması ……	32
2.6.	Sitotoksik Etki …….	32
2.7.	Primer ve Sekonder Metabolitler ……	33
2.7.1.	Fenolik Bileşikler ……	35
2.7.2.	Fenolik Asitler …….	36
2.7.2.1.	Hidroksibenzoik Asitler ……..	36
2.7.2.2.	Hidroksisinnamik Asitler ……	37
2.7.3.	Flavonoidler …….	39
2.7.4.	Kumarinler ……...	41
2.7.5.	Terpenler ……..	42
2.7.6.	Stilbenler …….	44
2.7.7.	Lignanlar …….	44
2.7.8.	Ksantonlar ……...	45
2.7.9	Lignin ……..	46
3.	**MATERYAL ve METOT** …….....	47
3.1.	Bitkisel Materyal …….	47
3.2.	Kimyasal Standartlar ve Çözeltiler ……..	48
3.2.1.	Kimyasal Maddeler …….	48
3.2.2.	Kullanılan Çözeltiler ……...	48
3.3.	Kullanılan Cihazlar ve Araçlar ……	51
3.4.	Ekstrelerin Hazırlanışı ……	52
3.5.	Ekstrelerin % Verimi **.....**……...	53
3.6.	ELISA Cihazı ile Aflatoksin İçerik Analizi ……**..**	54
3.7.	ICP-MS Cihazı ile Ağır Metal İçerik Analizi ....…….	55
3.8	Antioksidan Aktivite Tayin Metodları ……	55
3.8.1	ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Metodu ……..	55

3.8.2.	DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Metodu …..	56
3.8.3.	β-Karoten-Linoleik Asit Metodu (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini) …	56
3.8.4.	CUPRAC Metodu ……	57
3.9.	Antikolinesteraz Aktivite Tayin Metodu …….	57
3.9.1.	Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) Aktivite Testi ……...	57
3.9.2.	Butirilkolinesteraz enzimi (BChE) Aktivite Testi	58
3.9.3.	İstatistik Hesaplamalar ……	58
3.10.	Sitotoksisite Testleri ……	58
3.11.	Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi ……..	59
3.11.1.	Toplam Fenolik Miktar Tayin Metodu ……	59
3.11.2.	Toplam Flavonoid Miktar Tayin Metodu ……	60
3.12.	ELISA Reader Cihazı ……..	61
3.13.	ICP-MS Cihazı …….	61
3.14.	LC-MS/MS Cihazı ……..	63
4.	**BULGULAR ve TARTIŞMA** ……...	64
4.1.	Ekstrelerin % Verim Sonuçları ……	64
4.2.	Aflatoksin İçerik Sonuçları …….	65
4.3.	ICP-MS ile Ağır Metal İçerik Sonuçları …….	66
4.4.	Antioksidan Aktivite Sonuçları ……...	67
4.5.	Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları ……	70
4.6.	Sitotoksisite Aktivite Sonuçları ……...	71
4.7.	Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktar Tayin Sonuçları …….	74
4.8.	LC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerinin Belirlenmesi ve Kantitatif Analizi …	75
4.8.1.	LC-MS/MS ile Çalışılan *Allium* Türlerindeki Fitokimyasallların Kantitatif Analizi	78
4.8.2.	LC-MS/MS Analizindeki Standart ve Numune Kromatogramları ……...	82
5.	**SONUÇ ve ÖNERİLER** ……	85

6. **KAYNAKLAR** ……... 88

EKLER 95

ÖZGEÇMİŞ ……... 111

ÖZET

BAZI *ALLIUM* (Yabani Sarımsak) TÜRLERİNİN AFLATOKSİN, AĞIR METAL VE SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİNİN ICP-MS VE LC-MS/MS İLE BELİRLENMESİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ebubekir İZOL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2016

Alliaceae (Zambakgiller) familyasına ait *Allium* cins adı ile bilinen sarımsak, soğan en önemli sebze türlerindendir. 25 - 30 cm yüksekliğinde yeşilimsi beyaz veya pembe çiçekli otsu bir bitkidir. Nadiren tohum bağlar, bu nedenle soğancıkları ile üretilir. *Allium* cinsinin dünya üzerinde yaklaşık 800 türü bulunmakta iken, ülkemizde ise 197 takson bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında özellikle ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetişen bazı türlerin toprak altı ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstrelerinin toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoid miktarları kersetine eş değer olarak tayin edilmiştir. Hazırlanan bu ekstrelerin antioksidan aktiviteleri β-karoten renk açılımı, DPPH serbest radikal giderimi, ABTS katyon radikali giderimi ve CUPRAC yöntemleri ile, antikolinesteraz aktiviteleri ise asetil- ve bütiril-kolineteraz yöntemleri ile belirlenmiştir. Bu biyolojik aktivitelerin yanı sıra bu ekstrrelerin sitotoksik aktiviteleri fibroblast (bağ doku hücresi) ve DLD-1 (kolon kanser hücresi)hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Çalışılan türler halk arasında besin olarak tüketildiği için toksik etkilerini ortaya koymak için ICP-MS ile ağır metal içerikleri ve ELISA cihazı ile total aflatoksin içerikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu türlerden hazırlanan etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile fenolik içeriği grubumuz tarafından daha önce valide edilen metoda göre tespit edilmiştir.

Çalışılan 12 farklı *Allium* türünün genel olarak total fenolik içeriğinin flavonoid içeriğe göre daha zengin olduğu belirlenmiştir. Total fenolik içerik bakımından en zengin ekstre AAtü olmakla beraber AAta, AAHtü, AAHta ve AAVtü ekstrelerinde zengin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Total flavonoid içerik bakımından ise yine AAHta, AAHtü ve AAVtü ekstrelerinin en yüksek içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan 25 ekstrenin antikolinesteraz aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca genel olarak çalışılan tüm ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin düşük/orta derecede olduğu tespit edilmiştir. Fakat çalışılan bazı ekstrelerin özellikle kanserli DLD-1 hücre serileri üzerinde yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle total fenolik ve flavonoid içerik bakımından zengin olan AAtü ekstresinin hem orta dercede antioksidan (ABTS) hemde yüksek derecede sitotoksik etki potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki türlerin genel olarak düşük total aflatoksin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Fakat özellikle antioksidan kapasite bakımından aktif olan AAHtü ekstresinin hazırlandığı AAH türünün içerdiği total aflatoksin değerinin yüksek olması besin olarak tüketiminin kontrollü bir şekilde yapılması gerektiğini göstermiştir. Ayrıca çalışılan bazı türlerin özellikle kurşun, kadmiyum ve arsenik içeriğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak çalışılan bütün türlerin LC-MS/MS sonuçlarına göre fenolik içeriklerinin çeşitlilik ve miktar bakımından fakir olduğu belirlenmiştir.

Halk arasında *Allium* türleri hem gıda ve kozmetik hem de tıbbi uygulamalar için kullanılan en eski kültür bitkileri arasında yer almaktadır. Bu çalışma ile değerli bu türlerden 12 tanesi biyolojik ve kimyasal yönden taranmış ve daha detaylı çalışmalar için önemli veriler ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Allium*, antioksidan aktivite, LC-MS/MS, fenolik içerik, ağır metal, sitotoksik aktivite

ABSTRACT

DETERMINATION OF HEAVY METALS AND SECONDER METABOLITES OF SOME *ALLIUM* (Wild Garlic) SPECIES BY ICP-MS AND LC-MS/MS INVESTIGATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

MASTER THESIS

Ebubekir İZOL

DICLE UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
2016

Being very important vegatables, garlic and onion are *Allium* species that belong to Alliaceae family. The plant is 25-30 cm tall and herbaceous, having greenish-white or pink flowers. They rarely give seeds, so they are produced from their shallots. *Allium* genus comprises approximately 800 species in the world. There are 197 taxons in our country. In this thesis, the total phenolic (equivalent to pyrocatechole) and total flavonoid (equivalent to quercetin) amounts of the ethanol extracts of the underground and overground parts of some *Allium* species that grow especially in the East and the Southwest Anatolia region of our country were detected. The antioxidant activities of these extracts were determined by β-caroten bleaching assay, DPPH free radical scavanging activity, ABTS radical cation decolorization assay, CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) methods and their anticholinestrase activities were determined by acetyl- and butiryl- cholinesterase methods. In addition to these biological activities, the cytotoxic activities of the extracts were investigated by fibroblasts (connective tissue cells) and DLD-1 (colon cancer cell) cells. Since the studied species are consumed as food among people, the heavy metal contents (by ICP-MS) and total aflatoxin amounts (by ELISA) of them were determined to investigate their toxic effects. Besides, the phenolic composition of the ethanol extracts of these species were screened by an LC-MS/MS method which was validated before.

Generally, 12 different studied *Allium* species were richer in terms of total phenolic amount compared to the total flavonoid amount. Although, AAtü was determined to be the richest extract in terms of total phenolic content, AAta, AAHtü, AAHta and AAVtü extracts were also rich in terms of total phenolic content. Additionally, AAHta, AAHtü and AAVtü extracts were the richest extracts in terms of total flavonoid content. All of the studied 25 extracts showed no anticholinesterase activities. Moreover, all the extracts determined to have mid/low antioxidant activities. However, some extracts showed high cytotoxic effects especially over DLD-1 cancer cell series. Especially, the AAtü extract that is rich in terms of total phenolic and total flavonoid content determined to have both middle antioxidant activity (ABTS) and high cytotoxic activity over DLD-1 cell series.Generally, the species in this study determined to have low total aflatoxin amount. But, the fact that the AAHtü extract prepared from AAH species has high aflatoxin content shows that the controlled consumption of this species as food is necessary. Besides, lead, cadmium and arsenic content of some species were detected to be high. Furthermore, the phenolic contents of all studied species were determined to be poor in terms of diversity and quantity.

Allium species are oldest culture plants that are used as food and for cosmetic and medical applications in public. With this study, 12 of these precious species were screened chemically and biologically and important data were put forth for further studies.

Keywords: *Allium*, antioxidant activity, LC-MS/MS, phenolic content, heavy metal, cytotoxic activity.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	Bitkisel ilaçlar ve ürünler üzerine toksik metallerin uluslararası limitlerinin örnekleri (W.H.O. 2007) ……..	22
Çizelge 2.2.	Reaktif oksijen ve azot türleri ……..	23
Çizelge 2.3.	Fenolik bileşikler ……..	35
Çizelge 2.4.	Hidroksibenzoik asitler ……	37
Çizelge 2.5.	Hidroksisinnamik asitler	38
Çizelge 3.1.	*Allium* türleri ve herbaryum numaraları ……...	47
Çizelge 4.1.	Ekstrelerin % Verim sonuçları ve *Allium* türlerinin kodlandırılması ……....	64
Çizelge 4.2.	Aflatoksin sonuçları ……	65
Çizelge 4.3.	Ağır metal analiz sonuçları ……..	66
Çizelge 4.4.	Ağır metal analiz sonuçları ……..	67
Çizelge 4.5.	Ekstrelerin β-Karoten, DPPH ve ABTS yöntemlerine göre antioksidan aktivitelerinin IC_{50} sonuçları ……	68
Çizelge 4.6.	Bitki ekstrelerinin CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri …….	69
Çizelge 4.7.	Bitki ekstrelerinin antikolinesteraz aktivite sonuçları ……..	70
Çizelge 4.8.	*Allium* türlerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri ……	74
Çizelge 4.9.	LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler ……	76
Çizelge 4.10.	*Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile kantitatif analizi …….	78
Çizelge 4.11.	*Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile kantitatif analizi ……	79
Çizelge 4.12.	*Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile kantitatif analizi …….	79
Çizelge 4.13.	Analit miktarının (µg analit/g ekstre) en çok bulunduğu türler ……	80

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	*Allium akaka*'nın Türkiye'de dağılımı	5
Şekil 2.2.	*Allium akaka*	5
Şekil 2.3.	*Allium atroviolaceum*'un Türkiye'deki dağılımı	6
Şekil 2.4.	*Allium atroviolaceum*	6
Şekil 2.5.	*Allium chrysantherum*'un Türkiye'deki dağılımı	7
Şekil 2.6.	*Allium chrysantherum*	7
Şekil 2.7.	*Allium kharputense*'nin Türkiye'deki dağılımı	8
Şekil 2.8.	*Allium kharputense*	8
Şekil 2.9.	*Allium rhetoreanum*'un Türkiye'deki dağılımı	9
Şekil 2.10.	*Allium rhetoreanum*	9
Şekil 2.11.	*Allium scabriscapum*'un Türkiye'deki dağılımı	10
Şekil 2.12.	*Allium scabriscapum*	10
Şekil 2.13.	*Allium scorodoprasum* subsp. *roturdum*' un Türkiye'deki dağılımı	11
Şekil 2.14.	*Allium scorodoprasum* subsp. *roturdum*	11
Şekil 2.15.	*Allium shatakiense*'nin Türkiye'deki dağılımı	12
Şekil 2.16.	*Allium shatakiense*	12
Şekil 2.17.	*Allium vineale*'nin Türkiye'deki dağılımı	13
Şekil 2.18.	*Allium vineale*	13
Şekil 2.19.	Allininin allinaz enzimi ile allisine dönüşümü	17
Şekil 2.20.	Aflatoksin B1	19
Şekil 2.21.	Aflatoksin G1	19
Şekil 2.22.	Birincil antioksidanlar	27
Şekil 2.23.	İkincil antioksidanlar	28
Şekil 2.24.	DPPH radikalinin antioksidan ile reaksiyonu	30
Şekil 2.25.	Primer ve sekonder metabolizma yolları	34
Şekil 2.26.	Fenol halkası	35

Şekil 2.27. p-hidroksi benzoik asit genel yapısı 37

Şekil 2.28. Hidroksisinnamik asit genel yapısı 38

Şekil 2.29. Bazı hidroksisinnamik asitler 38

Şekil 2.30. 2-Fenil benzopiran (flavonoid) genel yapısı 39

Şekil 2.31. Temel flavonoidlerin genel yapısı 40

Şekil 2.32. Diğer flavonoidlerin genel yapısı 41

Şekil 2.33. İzokumarin ve kumarin yapıları 41

Şekil 2.34. İzopren yapısı 42

Şekil 2.35. Bazı monoterpen yapıları 43

Şekil 2.36. Bazı diterpenlerin yapısı 43

Şekil 2.37. Bazı triterpenlerin yapısı 43

Şekil 2.38. Resveratrol yapısı ve glikozit formu 44

Şekil 2.39. Bazı lignan yapıları 45

Şekil 2.40. Ksantonun yapısı 46

Şekil 2.41. Lignin yapısı 46

Şekil 3.1. Bitkilerin etanolde çözünmesi 52

Şekil 3.2. Süzme işlemi 53

Şekil 3.3. Çözücü uçurma işlemi 53

Şekil 3.4. Mitotoksin ELISA test kitleri 54

Şekil 3.5. Pirokatekolün ölçü grafiği 60

Şekil 3.6. Kersetinin ölçü grafiği 61

Şekil 4.1. AAHta, AAtü, AAta, ACtü, AKtü türlerinin canlı hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları 72

Şekil 4.2. AAHta, AAtü, AAta, ACtü, AKtü türlerinin kanserli hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları 72

Şekil 4.3. ARtü, AStü, ASctü, ASRtü, AShtü türlerinin canlı hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları 73

Şekil 4.4. ARtü, Astü, ASctü, ASRtü, AShtü türlerinin kanserli hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları 73

Şekil 4.5. ASitü, ATtü, Avtü, AVitü, Asstü türlerinin canlı hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları 74

Şekil 4.6. ASitü, ATtü, Avtü, AVitü, Asstü türlerinin kanserli hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları 74

Şekil 4.7. LC-MS/MS standart kromatogramı 83

Şekil 4.8. AAHtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı 84

EKLER

Ek No		Sayfa
Ek 1.	ELISA yöntemi toplam aflatoksin kalibrasyon eğrisi ……...	95
Ek 2.	Ağır metal analizi kalibrasyon grafikleri ……..	95
Ek 3.	AAVtü, AAHtü, AAHta, AAtü, AAta türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	96
Ek 4.	ACtü, ACta, AKtü, AKta, ARtü türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	96
Ek 5.	AStü, ASta, ASctü, ASRtü, ASRta türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği ……	97
Ek 6.	AShtü, AShta, ASitü, ASita, ATtü türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	97
Ek 7.	Avtü, AVitü, AVita, Asstü, Assta türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	97
Ek 8.	AAVtü, AAHtü, AAHta, AAtü, AAta türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği ……	98
Ek 9.	ACtü, ACta, AKtü, Akta, ARtü türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği ……	98
Ek 10.	AStü, Asta, ASctü, ASRtü, ASRta türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	98
Ek 11.	AShtü, AShta, ASitü, ASita, ATtü türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	99
Ek 12	Avtü, AVitü, AVita, Asstü, Assta türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	99
Ek 13	AAVtü, AAHtü, AAHta, AAtü, AAta türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	99
Ek 14	ACtü, ACta, AKtü, AKta, ARtü türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	100
Ek 15	AStü, ASts, ASctü, ASRtü, ASRta türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	100
Ek 16.	AShtü, AShta, ASitü, ASita, ATtü türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	100
Ek 17.	ACtü, ACta, AKtü, AKta, ARtü türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği …….	101
Ek 18.	Sitotoksisite % canlılık değerleri (Fibroblast hücreleri üzerindeki)	101

Ek 19. Sitotoksisite % canlılık değerleri (DLD-1 kanser hücreleri üzerindeki) …….. 102
Ek 20. AAHta kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 102
Ek 21. AAVtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı ……... 102
Ek 22. AAtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 103
Ek 23. AAta kısmının LC-MS/MS kromatogramı ……... 103
Ek 24. ACtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 103
Ek 25. ACta kısmının LC-MS/MS kromatogramı ……... 104
Ek 26. AKtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 104
Ek 27. AKta kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 104
Ek 28. ARtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 105
Ek 29. AStü kısmının LC-MS/MS kromatogramı ……... 105
Ek 30. ASta kısmının LC-MS/MS kromatogramı ……... 105
Ek 31. ASctü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 106
Ek 32. ASRtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 106
Ek 33. ASRta kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 106
Ek 34. AShtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 107
Ek 35. AShta kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 107
Ek 36. ASitü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 107
Ek 37. ASita kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 108
Ek 38. ATtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı ……... 108
Ek 39. AVtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 108
Ek 40. AVitü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 109
Ek 41. AVita kısmının LC-MS/MS kromatogramı …… 109
Ek 42. Asstü kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 109
Ek 43. Assta kısmının LC-MS/MS kromatogramı …….. 110

KISALTMA VE SİMGELER

A•	:	Antioksidan radikal
AAH	:	*Allium akaka* (Hakkâri)
A.D.	:	Aktif değil
ABTS	:	2,2 –azinobis(3-etilbenzotiazolin-sulfonik asit)
AChE	:	Asetilkolinesteraz
AcI	:	Asetiltiyokolin iyodür
ACoAC	:	Asetil CoA karboksilaz
ACSOs	:	S-alkil-L-sistein sülfoksitler
AFB1	:	Aflatoksin B1
AH	:	Antioksidan molekül
AIDS	:	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANR	:	Antosiyanidin redüktaz
ANS	:	Antosiyanidin 4-redüktaz
BA_2H	:	Benzoik asit-2-hidroksilaz
BChE	:	Bütirilkolinesteraz
BHA	:	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	:	Bütillenmiş hidroksi tolüen
BuI	:	Bütiriltiyokolin iyodür
C_4H	:	Sinnamat-4-hidroksilaz
Cdk1	:	Siklin bağımlı kinaz 1
$CHCl_3$	:	Kloroform
CUPRAC	:	Cupric reducing antioxidant capacity
DADS	:	Dialil disülfit
DAS	:	Dialil sülfonik asit
DATS	:	Dialil trisülfit
DLD-1	:	Kolon kanser hücresi
DMAPP	:	Dimetilallil pirofosfat
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DPPH	:	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DTNB	:	5,5-ditiyobis-(2-nitro benzoik asit)

EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	:	Etanol
FCR	:	Folin-Ciocalteu reaktifi
FDA	:	Gıda ve ilaç dairesi
HPLC	:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ICP-MS	:	İndüktif eşleşmiş plazma- kütle spektrometrisi
IC_{50}	:	% 50 inhibisyon konsantrasyonu
K	:	Kelvin
LC	:	Sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	:	Sıvı kromatografisi üçlü kuadrupol kütle spektrometresi
LDL	:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOD	:	Belirleme alt sınırı
LOQ	:	Tayin alt sınırı
LPO	:	Lipid peroksidasyon
m/z	:	kütle/yük
M+	:	Pozitif moleküler iyon
µ	:	Mikro
µL	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
µg/kg	:	Mikrogram/kilogram
mg/day	:	Miligram/gün
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
MS	:	Kütle spektrometresi
MS^n	:	Çoklu MS
MTT	:	Metil Tiyazol Tetrazolium (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)
NADH	:	Nikotinamid adenindinükleotit
NBT	:	Nitroblutetrazolium
Nc	:	Neokuproin
NMDA	:	N-metil-D-aspartat

ORAC	:	Oksijen radikal absorbans kapasitesi
$O_2^{\bullet-}$	:	Süperoksit
$ONOO^-$	:	Peroksinitrit
PC-3	:	Prostat kanser hücresi
ppb	:	Milyarda bir birim
ppm	:	Milyonda bir birim
$R^{\bullet}$	:	Radikal
ROO•	:	Peroksi radikali
RO•	:	Oksi radikali
R^2	:	Belirleme katsayısı
RF	:	Radyo frekans
RID	:	Refraktif indeks dedektörü
RNA	:	Ribonükleik asit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
RSD	:	Bağıl standart sapma
RT	:	Alıkonma zamanı
SAC	:	S-allilsistein
TA	:	Toprak altı
TÜ	:	Toprak üstü
UHPLC	:	Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi
UV	:	Ultraviyole
α-Toc	:	Alfa tokoferol

1.GİRİŞ

İnsanlığın varoluşuyla birlikte temelde beslenme için her zaman bitkiler kullanılmıştır. Bitkilerin önemi ilk zamanlardan günümüze kadar gelmektedir. Bitkiler zamanımızda gıda, ilaç ve kozmetik alanlarında kullanımı hızla artan temel kaynaklar olmuştur. Özellikle insan sağlığı için yapılan sentetik ilaçların yan etkileri sebebiyle ilaçların birçoğunun kaynağı olan bitkilerin doğal tüketimi hızla artmaktadır. Kozmetik alanında güzel kokuları, renkleri ve zengin kimyasal bileşenleri nedeniyle bitkiler kullanılmaktadır. Gıda olarak ise bitki türlerinin tüketimi önemini her geçen gün arttırmaktadır.

Yapılan araştırmalarda günümüzde dünya üzerinde yaklaşık 329 000 bitki türü tespit edilmiştir ve bu sayı yapılan incelemelerle sürekli artmaktadır (Raven ve ark. 2005). 2000 yılında yapılan bir araştırmada bitki türü sayısı 250 000 olarak tespit edilmiş ve bu bitkilerin sadece 5000 türünün eczacılık alanında incelendiği bulunmuştur (Allen-Diaz B 2000). Bundan dolayı farmakolojik olarak incelenmeyi bekleyen çok fazla bitki türü bulunmaktadır. Türkiye ise bitki türü bakımından çok zengin bir ülkedir. Son yıllarda bulunan yeni türlerle birlikte Türkiye'de yaklaşık olarak 12 000 bitki türü olduğu bulunmuştur (Erik ve Tarıkahya 2004). Ülkemizdeki bu türlerden 3649 tanesinin endemik olduğu ortaya konmuştur. Bu şu anlama gelmektedir; bu türler ülkemizin dışında dünyanın herhangi bir yerinde bulunmadığı, sadece ülkemizde bulunduğudur (Güner 2012).

Gelişen bilim ve teknoloji imkânlarıyla bitkilerin kimyasal bileşenleri ve bu bileşenlerin aktivitelerini belirleme çalışmaları devam etmektedir. Bitkilerdeki primer (birincil) ve sekonder (ikincil) metabolitler birçok biyolojik aktivite göstermektedir. Özellikle sekonder metabolitlerin; fenolik asitler, fenolik glikozitler, flavonoidler, fenil propanoidler, terpenoidler ve doymamış laktonlar gibi birçok çeşidi bulunmaktadır. Sekonder metabolitlerin ilaç, gıda, kozmetik sanayinde kullanımları artmaktadır (Banerjee ve Bonde 2011). İkincil metabolitler antikanser özellik gösterirler ve özellikle kansere sebep olan tümörlü hücrelerin büyümesini en aza indirmekte ve gelişimini durdurmaktadır (Lee ve ark. 2004).

Bitkilerin yapılarındaki yüksek oranda bulunan fenolik ve flavonoid bileşiklerinden dolayı insan sağlığı üzerinde etkileri bulunmaktadır. Bu etkilerin öncelikli

olanı ise fenolik ve flavonoid bileşiklerin antioksidan aktiviteleridir. Antioksidanlar insan vücudundaki metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan oksidasyon sürecini en aza düşüren ve bu sebeple serbest radikallerin meydana gelmesini engelleyip insan vücudundaki birçok zararın önüne geçilmesine neden olan moleküllerdir (Benkeblia 2005). Antioksidanlar insan vücudundaki radikallerin zararını ortadan kaldırdığından ve gıdalardaki maddelerin bozulmasını engellediğinden dolayı sürekli çalışılmakta ve çok fazla araştırmaya konu olmaktadır. Son yapılan çalışmalar bitkisel kaynaklı doğal antioksidanlara kaymaktadır (Kulisic ve ark. 2004). Antioksidan bakımından zengin gıdaların tüketilmesinin hücresel yaşlanmayı geciktirdiği ve kronik hastalıkların oluşumunu azalttığı veya önlediği sebepleri ile antioksidanların insan ömrünün uzamasına neden olduğu bilimsel çalışmalarla ispatlanmıştır.

Bu çalışmada *Allium akaka, A. atroviolaceum, A. chrysantherum, A. kharputense, A. rhetoreanum, A. scabriscapum, A. schoenoprasum, A. scorodoprasum* subsp. *roturdum, A. shatakiense, A. shirnakiense, A. tripedale, A. vineale* ve *A. ssp.* (türü tespit edilmeyen) türlerinden (toprak altı ve toprak üstü bitki kısımlarından ayrı ayrı) etanol ekstreleri hazırlandı. Etanol ekstreleri hazırlandıktan sonra LC-MS/MS ile bazı fenolik ve flavonoid bileşiklerin miktarsal tayinleri yapıldı. Ayrıca bu türlerin çeşitli kısımlarının ICP-MS cihazı ile ağır metallerinin kantitatif tayini ve ELISA ile total aflatoksin içerik tayini yapılmıştır. Bunlara ek olarak etanol ekstrelerinin antioksidan, antikolinesteraz ve sitotoksisite özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında incelenen çoğu *Allium* türünün kimyasal içerikleri ve belirtilen aktiviteleri ilk kez incelenmiş olup elde edilen sonuçlar bilim dünyasına kazandırılmıştır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Araştırılan Türler ile İlgili Genel Bilgiler

Allium cinsi Türkiye Florası'nın en geniş cinslerinden biri olup Alliaceae familyasında bulunur. *Allium* bulunduğu familyanın en geniş cinslerinden biridir. Soğan, sarımsak ve pırasa türlerini içinde bulundurmaktadır. Bu nedenle *Allium* türleri soğanlı bitkiler olarak adlandırılmaktadır. İnsanlığın ilk tarihlerinden günümüze kadar kullanımı devam etmektedir. Çoğu türü yenilebilir olmasından yemeklerdeki tat ve kokusu, ayrıca ilaç etkisi sebebi ile halk arasında çok tüketilmektedir (Frıtsch 2010).

Allium cinsi bitkiler genellikle çok yıllıklı ve yumru gövdeli olup soğanlı, kormlu, rizomlu ve tuberli bitkilerdir. Genellikle soğan ve sarımsak kokulu bitkilerdir. Yaprakları gövdeden ve alt kısımdan çıkabilir. Tohumları disk, halkalı veya üç kenarlı olabilen *Allium* türleri uzun ömürlüdür. Meyveleri ise kapsül şeklindedir. Farklı iklimlerde yetiştirilmekte olup özellikle tohumları dayanıklı olduğundan taşınması ve yetiştirilmesi avantajlıdır. Birçok farklı türü olduğundan çok güzel görünümlü çiçek yapısına sahiptirler (Davis 1984).

Dünya genelinde yaklaşık olarak 800 *Allium* türü bulunmaktadır. Ülkemizde ise son yapılan incelemelerle birlikte 197 takson tespit edilmiştir (Koyuncu 2012, Özhatay ve ark. 2011, Güner ve ark. 2012). *Allium* cinsinin dünyadaki yetiştirildiği alanlara baktığımızda gen merkezinin Anadolu ve Orta Asya olduğu ileri sürülmekte ve özellikle Türkiye, Afganistan, İran ve Rusya'nın olduğu bölge öne çıkmaktadır. Gen merkezi olan bu ülkelerden diğer ülkelere götürülmesi ile dünya coğrafyasında birçok ülkede yetiştirilmektedir. Bu ülkelerin başında ise Amerika, Çin, Hindistan ve Avrupa ülkeleri gelmektedir. Ülkemizde ise birçok yörede yetişmekte olup, Dünya genelindeki üretimde ise ülkemiz ilk sıralarda yer almıştır (Fritsch ve Friesen 2002).

Allium cinsi halk arasında ilaç etkisi bilinen ve bu sebep ile kullanılan harika bir bitkidir. Halk arasında soğan ve sarımsak olarak daha çok kullanılan bitkiler gelişen bilimsel metotlarla ve ilaç yapımında bitkilerin aktif incelenmeye başlanmasıyla, özellikle kimyasal bileşenlerinin tespit edilmesi ve bu tespit edilen maddelerin biyolojik ve farmakolojik etkilerinin ortaya konulması ile sürekli araştırmalara konu olmakta ve güncelliğini devam ettirmektedir. Soğan ve sarımsağın birçok hastalığa iyi geldiği tespit edilmiştir. Bunlardan bazıları şunlardır: Kalp damar hastalıkları, kanser, antibiyotik ve

antiseptik etkisiyle solunum yolu hastalıkları, mide ve bağırsak hastalıkları, astım, eklem ağrıları, romatizma, karaciğer yetmezliği. Ayrıca *Allium* cinsi antioksidan etkisiyle vücuttaki birçok radikallerin azaltılmasıyla çok sayıda hastalığın oluşmasını engellemekte veya en aza indirmekte yada ilerlemesini durdurmakta olan harika bir bitkidir (Villamiel 2007, Koç 2002).

2.1.1. *Allium* Türlerinin Genel Özellikleri

Allium, Alliaceae familyasının içinde yer alan ve soğan, sarımsak, pırasa gibi çok bilinen türleri bünyesinde bulunduran bir bitki cinsidir. Türleri çok yıllık ve yumru gövdeli olup, tipik soğan ya da sarımsak kokusunu ve tadını vermektedir. Pek çoğu yenilebilir türdür (Güner 2012). *Allium* cinsinin bilimsel sınıflandırması şöyledir:

Âlem: Plantae (Bitkiler)

Bölüm: Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)

Sınıf: Liliopsida (Bir çenekliler)

Takım: Asparagales

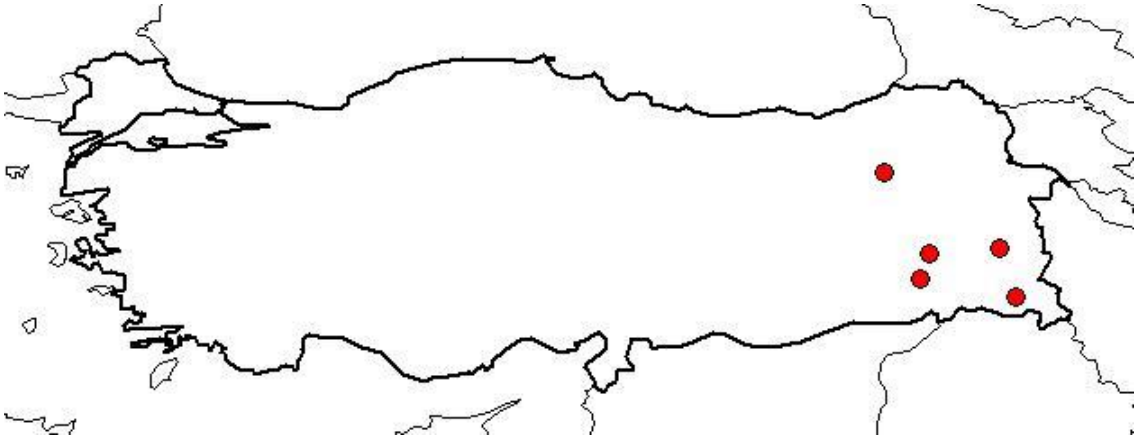
Familya: Alliaceae

Cins: *Allium*

Bu çalışmada araştırılan *Allium* türleri ise şunlardır:

- *Allium akaka*
- *Allium atroviolaceum*
- *Allium chrysantherum*
- *Allium kharputense*
- *Allium rhetoreanum*
- *Allium scabriscapum*
- *Allium schoenoprasum*
- *Allium scorodoprasum* subsp. *roturdum*
- *Allium shatakiense*
- *Allium shirnakiense*
- *Allium tripedale*
- *Allium vineale*

***Allium akaka*;** çok yıllık olan ve endemik olmayan otsu bir türdür. Halk arasında 'yer soğanı' veya 'guhbizing' olarak adlandırılmaktadır. Besin olarak pilav içinde kullanılmaktadır (Fırat ve Aziret 2016). Habitatları volkanik kayalıklar, volkanik çağıllıklar, steplerdir. Azerbaycan, İran ve Ermenistan'da dağılmıştır. Ülkemizde ise daha çok Doğu Anadolu bölgesinde görülmektedir (Şekil 2.1.).

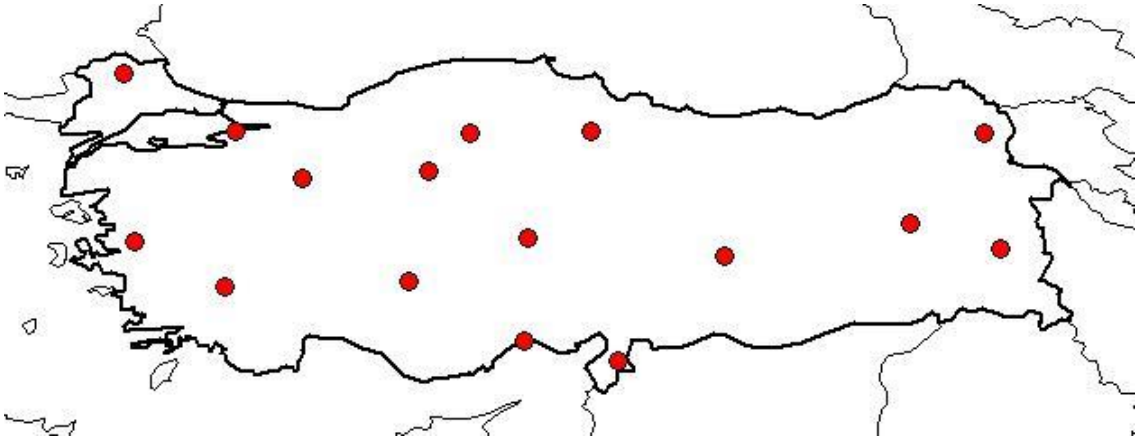


Şekil 2.1. *Allium akaka*'nın Türkiye'deki dağılımı (Hakkari, Siirt, Bitlis, Erzurum, Van)



Şekil 2.2. *Allium akaka* (Fırat ve ark. 2015).

Allium atroviolaceum; çok yıllık olan ve endemik olmayan bir türdür. Halk arasında 'lifli körmen' olarak isimlendirilmektedir. Habitatları ekili tarlalar, bağlar, kırlar, orman kenarları, çayırlıklar, nadas tarlalarıdır. Orta ve doğu Avrupa, orta Asya'da dağılım gösterir. Türkiye'nin ise birçok yerine yayılmıştır (Şekil 2.3.).

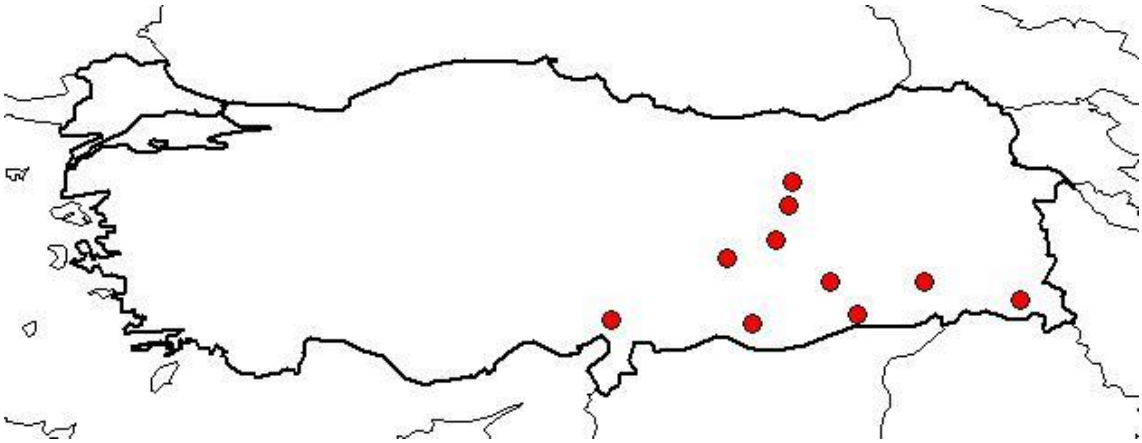


Şekil 2.3. *Allium atroviolaceum*'un Türkiye'deki dağılımı



Şekil 2.4. *Allium atroviolaceum* (Fırat ve ark. 2015).

Allium chrysantherum; çok yıllık olan ve endemik olmayan bir türdür. Halk arasında 'sarı kafa' olarak adlandırılmaktadır. Habitatları otlu bölgeler ve kırlardır. Genel dağılımları Kuzey Irak, Kuzey Suriye, Batı İran'dır. Türkiye'de ise Doğu Anadolu bölgesinde yetişmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. *Allium chrysantherum*'un Türkiye'deki dağılımı (Osmaniye, Hakkari, Mardin, Siirt, Diyarbakır, Elazığ, Erzincan, Malatya, Tunceli, Şanlıurfa)



Şekil 2.6. *Allium chrysantherum* (Fırat ve ark. 2015).

Allium kharputense; çok yıllık olan ve endemik olmayan bir türdür. Halk arasında 'Harput soğanı' olarak isimlendirilmektedir. Besin olarak bulgur pilavı ve çorba çeşitlerinde kullanılmaktadır (Fırat ve Aziret 2016). Habitatları ekili alanlar, çimenlik yamaçlar, bazalt ve açık kırmızı killerdir. Genel dağılımı Kuzey Irak ve Kuzey Batı İran'dır. Türkiyedeki yetiştiği alanlar ise Doğu ve Güneydoğu Anadolu'dur (Şekil 2.7.).

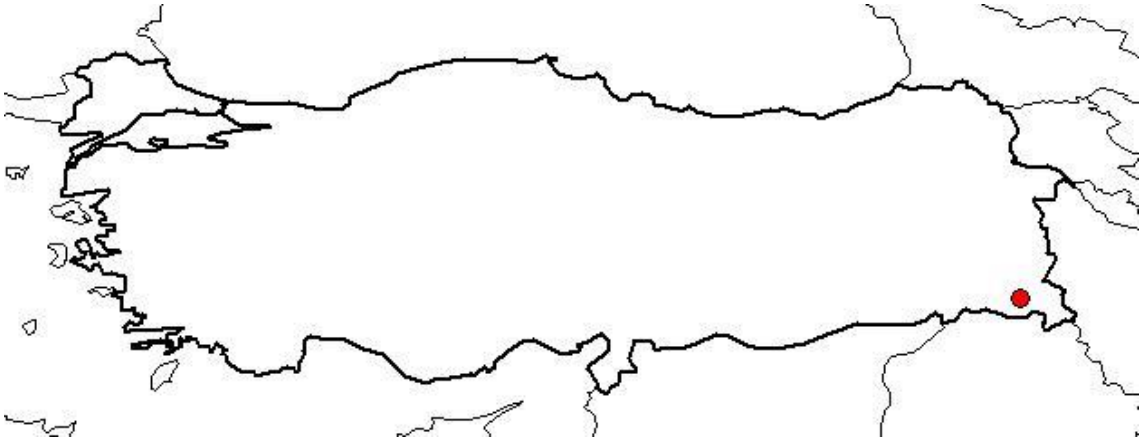


Şekil 2.7. *Allium kharputense*'nin Türkiye'deki dağılımı (Gaziantep, Mardin, Batman, Ağrı, Amasya, Elazığ, Erzincan, Muş, Sivas, Tunceli, Şanlıurfa)



Şekil 2.8. *Allium kharputense* (Fırat ve ark. 2015).

***Allium rhetoreanum*;** çok yıllık olan ve endemik bir türdür. Halk arasında 'Hakkâri soğanı' veya 'luş' olarak adlandırılmaktadır. Besin olarak pilav içinde ve sebze olarak tüketilmektedir (Fırat ve Aziret 2016). Habitatları otlaklardır. Endemik bir tür olduğundan sadece Türkiye'de Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetişmektedir (Şekil 2.9.).

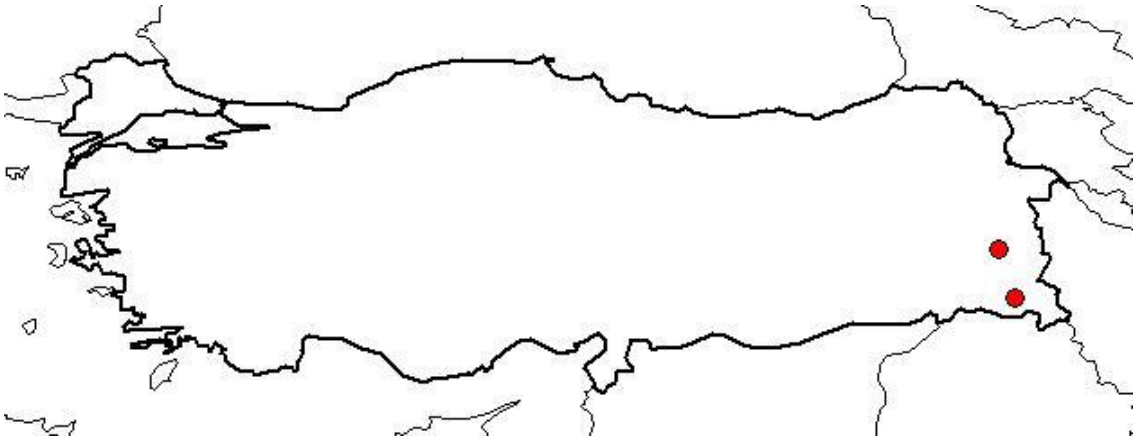


Şekil 2.9. *Allium rhetoreanum*'un Türkiye'deki dağılımı (Hakkari)



Şekil 2.10. *Allium rhetoreanum* (Fırat ve ark. 2015).

***Allium scabriscapum*;** çok yıllık olan ve endemik olmayan otsu bir türdür. Halk arasında 'yamaç tutan' olarak bilinmektedir. Habitatları aşınmış şiştli tepe etekleridir. Genel dağılımları Ermenistan, Kuzey Irak ve Horasan'dır. Türkiyede ise Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetişir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. *Allium scabriscapum*'un Türkiye'deki dağılımı (Hakkâri, Van)



Şekil 2.12. *Allium scabriscapum* (Fırat ve ark. 2015).

Allium scorodoprasum* subsp. *roturdum; çok yıllık olan ve endemik olmayan otsu bir türdür. Halk arasında 'deli pırasa' olarak adlandırılmaktadır. Besin olarak peynirin içinde tüketilmektedir (Fırat ve Aziret 2016). Habitatları kalkerli ve killi tahrip edilmiş yamaçlar, çimenlik alanlar, kırlar, kumsallar, kumlardır. Genel dağılımları Kırım ve Kafkasya'dır. Türkiye'nin ise genelinde yetişir (Şekil 2.13.).

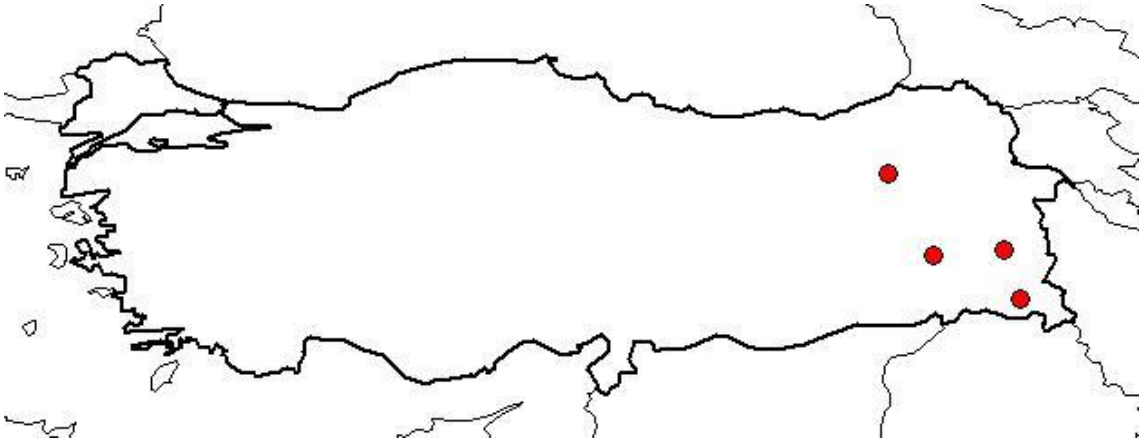


Şekil 2.13. *Allium scorodoprasum* subsp. *roturdum*'un Türkiye'deki dağılımı



Şekil 2.14. *Allium scorodoprasum* subsp. *roturdum* (Fırat ve ark. 2015).

Allium shatakiense; çok yıllık olan ve endemik olan otsu bir türdür. Halk arasında ‘çatak soğanı’ veya ‘çorin’ olarak bilinmektedir. Sebze olarak ve meşhur Van peynirinin içinde tüketilmektedir (Fırat ve Aziret 2016). Habitatları çayırlıklar, çimenlik yamaçlar, dağ stepleri, bazalt yerlerdir. Endemik olduğundan Türkiye’de Doğu Anadolu bölgesinde yetişir (Şekil 2.15.).

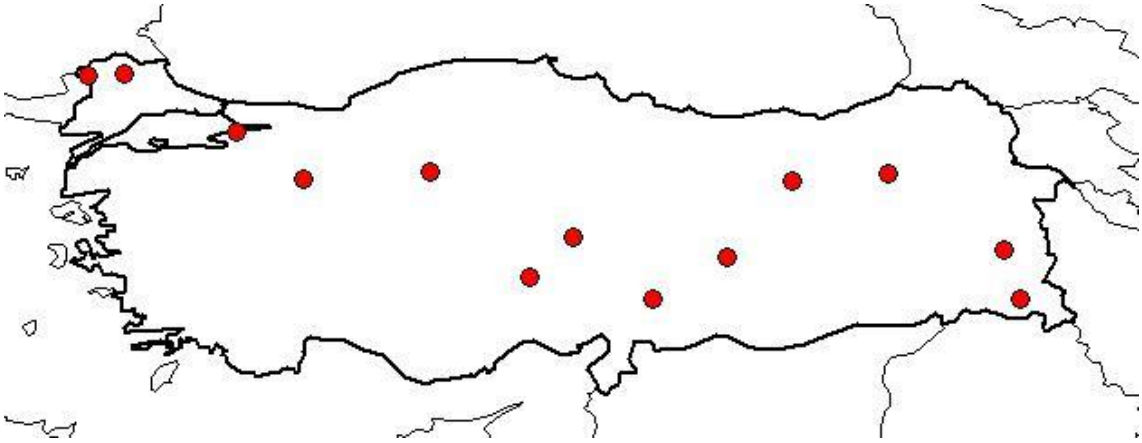


Şekil 2.15. *Allium shatakiense*’nin Türkiye’deki dağılımı (Hakkari, Bitlis, Erzurum, Van)



Şekil 2.16. *Allium shatakiense* (Fırat ve ark. 2015).

Allium vineale; çok yıllık olan ve endemik olmayan otsu bir türdür. Halk arasında 'sirmo' olarak isimlendirilmektedir. Besin olarak peynirin içinde tüketilmektedir (Fırat ve Aziret 2016). Habitatları nehir yatakları, bataklıklar, tarlalardaki yabani otlardır. Genel dağılımları Kuzey İran, Suriye, Lübnan ve Kuzeybatı Afrika'dır. Türkiye'de ise genel bir dağılımı görülür (Şekil 2.17.).



Şekil 2.17. *Allium vineale*'nin Türkiye'deki dağılımı



Şekil 2.18. *Allium vineale* (Fırat ve ark. 2015).

2.1.2. *Allium* Türleri ile İlgili Yapılan Araştırmalar

Allium cinsi bilimsel araştırmalara sürekli konu olmakta ve güncelliğini devam ettirmektedir. Tarihteki ilk araştırmalar XVI. yüzyıl sonrası başlamıştır. *Allium* türleri ile ilgili ilk bilgiler Fransızların çalışmalarıyla 1721'de ortaya konmuştur (Haris ve ark. 2001).

Tür itibarı ile çok geniş olması ve yenilebilir bir bitki olması, zengin kimyasal bileşenleri içinde barındırması nedenleriyle çok farklı alanlara konu olmakta ve incelenmektedir. Bu alanlardan bazıları şunlardır: Yenilebilir bir tür olması ile Gıda Endüstrisinde, birçok hastalığa sebep olan radikallere etki etmesi, antioksidan etkileri ve farmakolojik özellikleri ile İlaç Sanayisinde, halk arasında bilinen saç dökülmelerine karşı önleyici etkileri, güzel çiçek görünümleri, güzel kokuları ve antibiyotik etki göstermeleri nedenleriyle Kozmetik Sanayisinde, içerdiği zengin türler ve bu türlerin bazılarının endemik türler olması sebebi ile Botanik Biliminde, çok önemli oranda fenolik ve flavonoid bileşikler barındırması nedeni ile Fitokimya (Bitki Kimyası) alanlarında incelenmiş ve araştırmaları güncelliğini devam ettirmektedir.

Bir araştırmada Tayvan *Allium fistulosum* türünün pirinç şarabı ekstresi üzerinde antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik içeriği incelenmiştir. DPPH radikal süpürme kapasitesi %90.2 ve %52.1 olarak bulunmuş ve IC_{50} değerleri ise 14.6 ve 26.0 µg/mL olarak belirlenmiştir. Şarap ekstrelerinin toplam fenolik içeriği gallik asit eşdeğeri olarak 56.4-198.9 mg arasında değişkenlik göstermiştir (Tsan ve ark. 2016).

Farklı soğan kültürlerinde (*Allium fistulosum* L.) yapılan araştırmada kadmiyum (Cd) metalinin besin elementlerine olan etkisi araştırılmıştır. Cd ile besin elementleri arasında pozitif önemli kolerasyon olduğu görülmüştür ve Cd içeriğinin özellikle fosfor, demir ve mangan gibi besleyici elementlere olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir (Xuhui ve ark. 2016).

Yabani sarımsak olan *Allium ursinum* L. türünde biyoaktif bileşiklerin ultrasonik ekstraksiyonu üzerinde çalışılmış ve farklı ekstraksiyon yöntemleri denenerek bunların optimizasyonu yapılmıştır. Bu ekstrelerin farklı sıcaklıklarda ve farklı ultrasonik güç ve farklı süreler göz önüne alınarak ultrasonik ekstraksiyon verimi optimum koşulları hesaplanmıştır. Belirlenen optimum koşullarda gallik asit eşdeğerliğinde toplam fenolik

(1.60 g), kersetin eşdeğerliğinde toplam flavonoid miktarları (0.35 g) belirlenmiş ve antioksidan aktivitesi (IC_{50} 0.71 mg/ml) ifade edilmiştir (Alena ve ark. 2016).

Streptozotokin ile uyarılmış diyabetik sıçanlar üzerine yapılan bir araştırmada olgun sarımsak ektresinin antioksidan potansiyeli incelenmiştir. Sarımsak ekstresinin diyabetik etkileri azalttığı ve toplam antioksidan seviyeleri belirtilmiştir (Martha ve ark. 2016).

Yapılan bir araştırmada *Allium* sebze alımının kanser riski arasındaki ilişkinin miktarsal olarak tayini incelenmiştir. Araştırma sonucuna göre *Allium* türlerinin alımı ile kanser riski oluşumunun arasında ters orantı olduğu yani belirlenen kontrole göre kanser riskini azalttığı saptanmıştır (Valentina ve ark. 2016).

Allium hookeri türünün kök kısmının metanol ekstresinin fenolik bileşiklerinin karekterizasyonu ve izolasyonu yapılmış ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Antioksidan aktivitesi DPPH radikal süpürme aktivitesi, süperoksit söndürme aktivitesi ve süperoksit radikal süpürme aktvitesi yöntemleri ile belirlenmiştir (Hyun ve ark. 2015).

Bir incelemede tuzlanmış ördek yumurtalarının mikro yapısı, yağ asidi profili ve lipit oksidasyonuna sarımsak yağının etkisi incelenmiştir. Sarımsak yağının antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile ve standartlar, sentetik antioksidan olan BHT ve gallik asit ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Sarımsak yağının süpürme etkisi doza bağlı olarak artmıştır. Sonuç olarak sarımsak yağının potansiyel bir antioksidan ajan olduğu ve doğal bir gıda katkısı olarak kullanılabileceği saptanmıştır (Putri ve ark. 2015).

Allium orientale türü üzerinde yapılan bir çalışmada, bu türün fenolik bileşikleri ve antoksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Antioksidan aktiviteler DPPH, β-karoten ve toplam fenolik bileşik yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Ekstrede toplam fenolik içerik (120.979 +/- 1.05 mg gallik asit eşdeğerliğinde) yüksek bulunmuş ve DPPH aktivitesi (IC_{50} 42.18 +/- 1.68 mg/mL) belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *Allium orientale* türünün toprak üstü ekstresinin farmasotik ürünlerde yeni bir antioksidan olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Ceylan ve Alic 2015).

Allium iranicum türünün yaprak ekstrelerinin klinik çalışmalar ile antihemoroid bir ajan olarak farmakolojik etkileri araştırılmıştır. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda eksterelerin hemoroid hastalığında görülen rahatsızlıkların azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Seyed ve ark. 2015).

Dünyanın farklı yerlerinden toplanan *Allium sativum* türündeki kimyasal bileşenler araştırılmıştır. Yaklaşık 103 sarımsak klonu toplanmıştır. Fenolik içerik HPLC ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile tespit edilmiştir. Çalışmada kimyasal içeriğin coğrafi konumlara göre farklılık gösterdiği kantitatif olarak gösterilmiştir. (Sho ve ark. 2014).

Yapılan bir incelemede küçük sarı soğan olarak bilinen *Allium flavum* türünün sitotoksik aktiviteleri, antioksidan aktiviteleri ve fenolik profilleri belirlenmiştir. Metanol ekstrelerinde LC-MS/MS ile 44 fenolik bileşik içeriğine bakılmış ve 25 bileşik bulunmuştur. Birkaç yöntemle antioksidan aktivite bakılmış ve düşük aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Kolon adenokarkinoma hücrelerinde sitotoksik etki IC_{50} =71 μg mL^{-1} ve IC_{50} =81 μg mL^{-1} olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bu türün fonksiyonel bir gıda olduğu ve sağlık için faydalı bir fitokimyasal olduğu ifade edilmiştir (Natasa ve ark. 2013).

Allium tuncelianum türünün toplam antioksidan aktivitesinin ve kuru madde içeriğinin *Allium sativum* ile karşılaştırıldığı çalışmada, iki sarımsak türünün etanol ve su ekstreleri hazırlanmıştır. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri $ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ radikali yok edici etki yöntemleri ile belirlenmiştir. *Allium tuncelianum* türünün etanol ekstresinin standart antioksidan olan BHT'den daha yüksek oranda aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda *Allium tuncelianum* türünün doğal bir antioksidan olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (Agbaş ve ark. 2013).

Allium türleri üzerine yapılan diğer bir çalışmada, güzel kokulu olan bazı *Allium* türlerinin kimlikleri belirlenmiştir. Belirlenen bu türlerin kromozom sayıları, yaşadıkları alanlar, korunma yöntemleri ve üretildikleri yerlerden nerelere ihraç edildikleri ile ilgili bilgilendirme yapılmıştır (Özhatay 1996).

Allium cinsi yapılarında bulunan zengin flavonoid bileşikler sayesinde antioksidan aktiviteleri oldukça yüksektir. Birçok farklı türü de olduğundan son yıllarda en fazla incelenen türler arasında olmuştur. Özellikle yiyilebilir bir cins olduğundan sebzeler arasında en fazla ilgi uyandırmış ve gıda endüstrisinde çok fazla araştırılmıştır. (Benkeblia 2005).

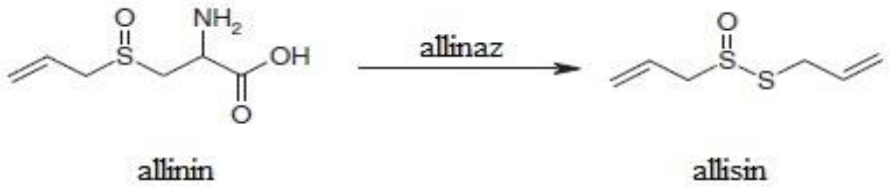
Yapılan bir başka çalışmada, *Allium* türlerinden bazılarının flavonoid bileşikleri araştırılmıştır. Bu bileşiklerden en temel olanı kuersetin olarak tespit edilmiş ve kuersetinin antioksidan etkisinin yüksek olduğu bulunmuştur. İncelenen *Allium* türünün

diğer sebze ve meyve türlerine oranla en fazla kuersetin oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Kuersetinin antioksidan etkisinden dolayı antiviral ve antikanserojen özelliği ortaya konmuştur (Prior 2003).

Kuvvetli antioksidan özellik gösteren *Allium* türleri ve bu türler içinde özellikle *Allium sativum* (sarımsak) bulundurduğu bazı aminoasitler (metionin, glutamin ve sistein gibi) sayesinde hücreleri serbest radikallerin zararlarından koruduğu ortaya konmuştur. Antioksidan etkisi ile vücutta zararlarının yok edilmesi veya en az indirilmesi güç olan cıva, arsenik, kurşun, bakır ve kadmiyum gibi ağır metallerin zehirlemesine karşın etkin bir savunma yapıp vücudu koruduğu bulunmuştur (Madhavi ve ark. 1996).

Ülkemizde tür sayısının fazla olmasından dolayı morfolojik çalışmaları yapılmaktadır. Yapılan bir araştırmada, Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinde yaşayan *Allium* türlerinin morfolojik ve anatomik özellikleri incelenmiştir. Üç farklı türün morfolojisinin yapılabildiği ve anatomik özelliklerinin farklılık arz ettiği ve ayrımlarının yapılabildiği ortaya konmuştur (Özdemir ve ark. 2011).

Allium türlerinin aktif bileşiği allisin olarak adlandırılan diallil tiyosülfinat olduğu bulunmuştur (Fujisawa ve ark. 2008). Allisin oluşum mekanizması şöyledir: *Allium* türleri tüketilirken, allinin bileşiğine allinaz enziminin etkisiyle dokularda allisin oluşmaktadır. Bu mekanizma aşağıdaki Şekil 2.19'da gösterilmiştir. Allisin, *Allium* türlerine tatlarını, kokusunu veren ve kuvvetli antioksidan özellik gösteren bileşiktir. *Allium* türlerinin farmakolojik ve biyolojik etkilerinin kükürtlü bileşiklerinden kaynaklandığı bulunmuştur. Bu kükürtlü bileşenler S-alkil-L-sistein sülfoksitlerdir (ACSOs) (Villamiel 2007).



Şekil 2.19. Allinin allinaz enzimi ile allisine dönüşümü (Okada ve ark. 2005)

Allisin oluşumunda farklı ara ürünlerde oluşmaktadır. Bunlar: Dialil sülfonik asit (DAS), dialil disülfit (DADS), dialil trisülfit (DATS) ve ajoendir (Lardos ve Kreuter

2001). Bu sülfürlü bileşikler üzerine de birçok araştırmalar yapılmaktadır. *Allium* türleri üzerine kükürt kaynaklı bileşikler uygulanarak incelenen türün içeriğine pozitif etkileri belirlenmiş olup kükürt atomunun araştırılan tür üzerinde verimi arttırdığı tespit edilmiştir (Al-Frahiat 2009). Yapılan bir araştırmada *Allium* türlerinin yapraklarındaki sülfür içeriği ile allisin arasında önemli bir orantı belirlenmiştir. Türler arasında allisin farklı oranlarda bulunmuştur (Hoppe ve ark. 1996).

Sülfür bileşikleri tıbbi etki gösteren temel bileşenlerdir. Allil sülfür bileşikleri anti tümör ajanlar olduğu belirlenmiş olup, DADS bileşeni fare karaciğerinde yapılan bir deneyde tümör oluşumuna neden olan ve kanser ajanı olarak adlandırılan AFB1'in (aflatoksin B1) kanserojenik etkisini ve etki ettiği alanı düşürdüğü bulunmuştur (Haber ve ark. 1996).

Belirli kolesterol seviyesi bulunan gönüllü hastalara düzenli olarak bir yıl boyunca bir *Allium* türü tozu verilerek kolesterol düzeyleri incelenmiştir. Araştırma sonucunda kolesterol seviyelerinin erkek ve bayan hastalarda 300'den 28 düzeyine kadar düştüğü görülmüştür. Böylece *Allium* türlerinin günümüz insanlığının önemli problemlerinden olan LDL kolesterol seviyesine çok önemli oranda etki ettiği belirlenmiştir (Sobenin ve ark. 2010).

Özellikle beyin tümörlerinde, mide kanserinde, akciğer kanserinde, meme kanserinde, kolon kanserlerindeki kanserojenik hücrelerin gelişiminin durdurulması ve inhibe edilmesinde sülfür bileşenlerinin öneminin çok fazla olduğu belirlenmiştir (Losling 2003).

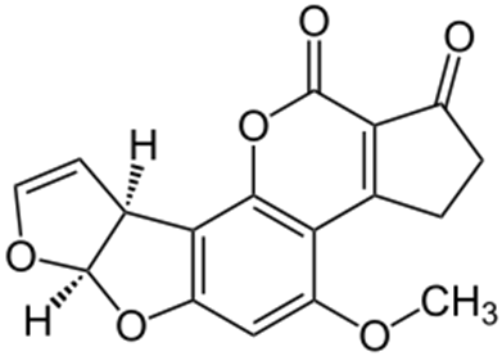
Kronik hastalıkların önde gelenlerinden olan kalp-damar hastalıkları günümüz insanlığı için çok ciddi sorunlar teşkil etmekte ve birçok ölüme sebep olmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların başında ise damar tıkanıklıkları gelmektedir. *Allium* türlerinin içeriğinde bulunan allisin bileşiği birçok hastalığa etki ettiği gibi kardiyovasküler hastalıklarına da önemli ölçüde fayda sağladığı ifade edilmiştir (World Health Organization 2011, Arzonlu ve ark. 2011).

Allium cinsi bitkinin içerdiği flavonoid bileşikler ve sülfürlü bileşiklerden dolayı birçok kimyasal ve biyolojik çalışmaları yapılmış ve halen araştırmalar devam etmektedir. Tür sayısının fazla olması taksonomik ve morfolojik olarak da incelenmelerine sebep olmuş ve yeni türlerinin tespit çalışmaları devam etmektedir.

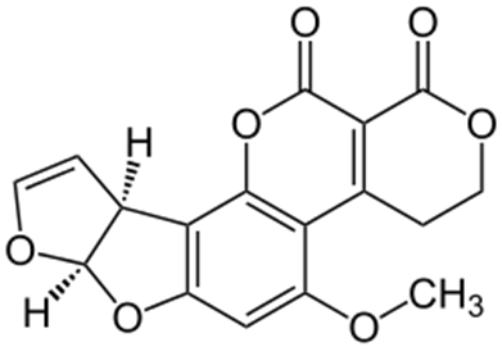
2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler, besinlerin içinde ve/veya üzerinde bulunan *Aspergillus flavus, A. nomius* veya *A. parasiticus* küf mantarlarının neden olduğu toksik metabolitler olup insan sağlığı açısından en tehlikeli mitotoksinlerdir (Zinedine 2007). Aflatoksinler, İngiltere'de kanatlı hayvanlardan olan hindilerin ölümüne neden olan 'Turkey X' hastalığı neticesinde keşfedilmiştir. Hindi hastalığı yüzbinden fazla kanatlı hayvanın ölümüne sebep olmuştur ve buna neden olan aflatoksinler ilk kez 1960 yılında heterosiklik bileşikler ile ilgili olarak bulunmuştur (Farombi 2006).

Yapılan araştırmalar sonucunda genel olarak dört farklı aflatoksin türü bulunmuştur. Bunlar B1, B2, G1 ve G2 aflatoksinleridir. *A. flavus* nadiren aflatoksin G1 ve G2'yi üretebilirken, *A. parasiticus* aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 türlerini üretir. Bu aflatoksinlerin dışında besinlere direkt kontamine olmuş M1 ve M2 olmak üzere iki metabolitin olduğu tespit edilmiştir. En tehlikeli aflatoksin türü aflatoksin B1'dir (Şekil 2.20.). Aflatoksin B1 hücrelere etki ederek kansere neden olabilirken hem de gen yapısına etki ederek yapısını değiştirebilmektedir.



Şekil 2.20. Aflatoksin B1



Şekil 2.21. Aflatoksin G1

Aflatoksinlerin oluşması için ilk koşul, toksine neden olan küflerin gıdalara bulaşması ve bu gıdaların küflerin çoğalmasını sağlayacak uygun bir yapılarının bulunmasıdır. Küf gelişimi tarlalarda başlamakta, uygun olmayan kurutma şartlarında gelişmekte, taşıma ve depolama aşamalarında bulaşma oranıyla artış göstermektedir. Küfler besinler üzerinde pamukumsu ve farklı renkli yapılarda bulunurlar. Gözle görülemeyecek noktalara kadar nufuz ederler ve bu nedenle küflenmiş gıdaların küflenen kısımlarını kesip geriye kalan kısmını kullanmak yanlıştır.

Aflatoksinler insan vücuduna direk veya hayvanların yemlerindeki toksinleri almasıyla insanlarında besin olarak hayvansal gıdaları kullanması ile bulaşır. Aflatoksinlerin esas olarak küflü gıdalarda görülmesine karşın doğrudan insan tüketimine sunulan gıdalarda da aflatoksin bulunabileceği, çeşitli işleme fonksiyonlarının bunu çoğunlukla ortadan kaldırmadığı ve hayvan yeminde bulunabilecek aflatoksin çeşitlerinin çok az bir seviyede de olsa süt, yumurta ve et gibi gıdalara yerleşerek insan sağlığı açısından risk oluşturabileceği ortaya konmuştur. Bu toksinler akut ölümlere, kronik hastalıklara, bazı kanser türlerine, DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonuna; çeşitli enzim aktivitelerinde azalmaya; glukoz metabolizması depresyonuna; fosfolipidler, serbest yağ asitleri, trigliseritler, kolesterol ve esterleri dahil olmak üzere lipid sentezi inhibisyonuna gibi metabolik etkiler göstermektedir. Ayrıca aflatoksinlerin hepatit, siroz, böbrek hastalıkları ve kronik gastrit gibi hastalıklara sebep olabildiği ifade edilmiştir (Koirala 2005).

Besinlerdeki aflatoksin miktarı birçok ülkede yasal olarak belirlenmiştir. Bu miktarın Dünya Sağlık Örgütü ve diğer sağlık kuruluşları ile en aza indirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Ülkemizdeki en toksik etkiyi gösteren aflatoksin B1'in besin ve tarım ürünlerindeki bulunma oranının en yüksek limiti 5 ppb olarak belirlenmiştir ve bu limit devlet kurumlarının çalışmaları ile daha da düşürülmektedir. Belirlenen bu limit besin maddelerine göre ve tüketici sınıfına göre değişiklik göstermektedir. Aflatoksin oluşumunu en aza indirgemek için kuvvetli bir dezenfektan olan ozon (O_3) kullanılmakta ve bu yönteme ozonlama denmektedir. Ozonlama yöntemi aflatoksin oluşumunu azaltmakta fakat tamamen durduramamaktadır. Bu nedenle aflatoksin oluşumunu engellemek için yeni yöntemler araştırılmaktadır (Kaya ve ark. 2002).

2.3. Ağır Metaller

Günümüzde ağır metaller özellikle bitkiler için büyük önem arz etmektedir. Yenilebilen bitkiler insan ve hayvan sağlığına içerdikleri ağır metaller sayesinde olumlu ve olumsuz etki edebilmektedirler. Sanayileşmenin arttığı günümüzde endüstri bölgelerindeki ağır metal kirliliklerinden kaynaklanan zehirlenmeler ilk kez Japonya'da tespit edilmiştir. Hava, toprak ve suda ağır metallerin bulunma oranları sağlık açısından büyük öneme sahiptir.

Ağır metal tanımı fiziksel özellik bakımından yoğunluğu 5 g/cm^3 den daha yüksek olan metaller için kullanılır. Ağır metal sınıfına çinko, cıva, kurşun, nikel, kadmiyum, bakır, kobalt, demir, krom, uranyum ve gümüş gibi 60'dan fazla metal dahildir. Bu metaller doğada karbonat, sülfür, oksit ve silikatları şeklinde görülür. Metallerin biyolojik etkilerinin incelenmesi, metallerin ağırlıklarının değil bulundukları periyodik tablodaki gruplarının özelliğinin değerlendirilerek yapılması daha doğrudur (Kahvecioğlu ve ark. 2004).

Ağır metallerin doğadaki yayılımları daha çok insan kaynaklı olduğu görülmektedir. Endüstride ağır metallerin kullanımı arttıkça atık ürünlerin veya kazaların nedeniyle ekolojideki metal etkisi artmaktadır. Yapılan bir araştırmada insan kaynaklı ağır metallerin normal seviyelerden çok daha fazla olduğu ispatlanmıştır (Dar 2004).

Bitkiler yetiştirildikleri ortamdan etkilenerek ordaki elementleri yapılarına alırlar. Bu elementler bitkilerde bazen toksik etkiye neden olarak yenildiğinde de insan ve hayvan sağlığına toksik etki gösterirler. C, H, O, N, K, S, P, Mg, Ca, Zn, Cu, Cl ve Mo elementleri bitkiler için kesin gerekli olan besin maddeleridir. Co, Al, Si, Na, Ni ve V elementleri ise yalnız bazı bitkiler için ihtiyaç olduğu öngörülen yararlı elementlerdir (Yıldız 2003). Bakır metali insanlarda ve hayvanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve farklı oksidasyon reaksiyonlarının olmazsa olmaz elementidir. Yaşam ile ilgili olmayan ağır metaller ise çok az derişimlerde de yapıya etki ederek sağlık sıkıntılarına neden olmaktadır. Buna en güzel misal canlı sistemlerdeki kükürtlü enzimlere bağlanan civa metalidir (WHO 1996).

Metabolizmada ağır metellerin etkileri genel olarak şunlardır:

1-Kanserojen ve mutojen özelliklerinden yapı taşlarına etki

2-Kimyasal tepkimelere etki

3-Fizyolojik sistemlere etki

4-Alerjen etki

Çizelge 2.1. Bitkisel ilaçlar ve ürünler üzerine toksik metallerin uluslararası limitlerinin örnekleri (W.H.O. 2007)

		Arsenik (As)	Kurşun (Pb)	Kadmiyum (Cd)	Krom (Cr)	Cıva (Hg)	Bakır (Cu)	Kurşun metallerinin toplam toksisitesi
Bitkisel ilaçlar için								
Kanada	Taze bitkisel materyaller	5 ppm	10 ppm	0.3 ppm	2 ppm	0.2 ppm		
	İşlenmiş bitkisel ürünler	0.01 mg/day	0.02 mg/day	0.006 mg/day	0.02 mg/day	0.02 mg/day		
Çin	Bitkisel materyaller	2 ppm	10 ppm	1 ppm		0.5 ppm		20 ppm
Malezya	İşlenmiş bitkisel ürünler	5 mg/kg	10 mg/kg			0.5 mg/kg		
Kore Cumhuriyeti	Bitkisel materyaller							30 ppm
Singapur	İşlenmiş bitkisel ürünler	5 ppm	20 ppm		0.5 ppm	150 ppm		
Tayland	Bitkisel materyaller, işlenmiş bitkisel ürünler	4 ppm	10 ppm	0.3 ppm				
WHO tavsiyeleri			10 mg/kg	0.3 mg/kg				
Diğer bitkisel ürünler için								
Ulusal Sağlık Örgütü tavsiyesi (Taze ilave besinler)		5 ppm	10 ppm	0.3 ppm	2 ppm			
Ulusal Sağlık Örgütü tavsiyesi (İşlenmiş ilave besinler)		0.01 mg/day	0.02 mg/day	0.006 mg/day	0.02 mg/day	0.02 mg/day		

2.4. Antioksidanlar

Canlı sistemlerinde bulunan proteinler, nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar oksidasyon geçirebilirler ve okside olan bu bileşikler hücre ve doku hasarına uğrayabilirler (Kameda ve ark. 2003). Bu durum genel olarak 'Oksidatif Stres' olarak adlandırılır. Oksidatif stresin ana etmeni aktif olmayan oksijen ve azot türleridir. Bu aktif olmayan oksijen ve azot türleri Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (Aruoma ve Cuppet 1997).

Reaktif oksijen ve azot vücutta farklı yollarla oluşabilir. Hücreler solunum yaparken oluşabilmektedir. İnsan vücudu doğal ve insan etkenli radyasyona maruz kalır. Radyasyona sebep olan yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar suyu parçalayıp hidroksi radikalinin oluşumuna neden olabilmektedir (Von-Sonntag 1987). Ayrıca günümüzde çok kullanılan sentetik gıdalar ve ilaçlar da neden olabilmektedir. Sigara dumanında canlı sistemlerinde radikal oluşumuna neden olduğu ifade edilmiştir.

Çizelge 2.2. Reaktif oksijen ve azot türleri

Reaktif Oksijen Türleri		**Reaktif Azot Türleri**	
Radikaller	**Radikal Olmayanlar**	**Radikaller**	**Radikal Olmayanlar**
Süperoksit ($O_2^{\bullet -}$)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Azot Oksit ($NO^{\bullet}$)	Nitröz Asit (HNO_2)
Hidroksi ($HO^{\bullet}$)	Hipokloröz Asit (HClO)	Azot dioksit $NO_2^{\bullet}$)	Nitrozil Katyonu (NO^+)
Peroksi ($RO_2^{\bullet}$)	Hipobromöz Asit (HBrO)		Nitroksi Anyonu (NO^-)
Alkoksi ($RO^{\bullet}$)	Ozon (O_3)		Diazot tetraoksit (N_2O_4)
Hidroperoksi ($HO_2^{\bullet}$)	Singlet Oksijen ($^1\Delta g\ ^1O_2$)		Diazot trioksit (N_2O_3)
			Peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$)
			Peroksinitröz Asit (ONOOH)
			Nitronyum Katyonu (NO_2^+)
			Alkilperoksi nitrit (ROONO)

Oksidasyon olayı radikalik zincir tepkimeleri üzerinden yürüyerek oluşur. Radikaller, üzerlerinde elektron boşluğu olduklarından bu boşlukları doldurma eğilimindedirler. Bu nedenle zayıf bağlı elektronları koparak kendilerine bağlarlar. Radikallerin bu özellikleri onların kimyasal olarak aktif olmalarına neden olur ve

bulundukları hücrelerde modifikasyonlara sebep olurlar. DNA bazlarına zarar vererek mutasyona sebep olurlar. $O_2^{\bullet -}$, $OH^{\bullet}$, $ONOO^-$ radikallerinin DNA hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (Floyd ve ark. 1988). DNA hasarı ise kanser nedenlerinin en önde gelen sebebidir. Hücrelerin kendi savunma mekanizmalarının DNA hasarlarına karşı yetersiz kalabildiği ifade edilmiştir (Guyton ve Kensler 1993).

Antioksidanların savunma mekanizmaları farklı şekillerde işlev gösterir. Oksidasyon olayını ilk oluşum veya gelişim evrelerinde önler veya geciktirirler. Radikalik bileşik oluşumunu önler ve var olan radikalleri yok ederler. DNA modifikasyonunu engeller ve onarırlar. Radikal oluşumuna neden olan zincir tepkimelerinin oluşumuna engel olurlar. Bu işlevlerinden dolayı canlı organizmalarının antioksidan bileşiklere çok fazla ihtiyacı olmaktadır. Yaşlanmayı geciktirici, antikarsinojenik, antimutajenik, antimikrobiyal ve daha birçok işlev antioksidanlar tarafından yapılmaktadır (Cook ve Samman 1996). Antioksidanların eksikliğinde radikaller (reaktif oksijen ve azot) nedeniyle kanser, kalp-damar hastalıkları, AIDS, şeker hastalığı, parkinson gibi hastalıklar meydana gelmektedir (Packer ve Cadenos 2002).

Antioksidanların vücuda alınması hayati birçok fonksiyon nedeniyle elzemdir. Doğal antioksidanlar, bitkisel ve hayvansal besinlerde bulunan ve ekstrakte edilebilen veya gıda işlenmesi sürecinde ortaya çıkan bileşiklerdir. Doğal antioksidanların en önemli olanları, flavonoidler, tokoferoller, fenolik asitler, karotenoidler, C vitamini, polifenoller ve selenyumdur (Doğmuş ve Durucasu 2013). Doğal sebze ve meyve tüketiminin içerdikleri antioksidanlar nedeniyle birçok hastalığın iyileşmesinde çok önemli rol oynadıkları ortaya konmuştur.

Sentetik antioksidanlar ise gıdaların bozulmasını önlemek, tadını, rengini, kokusunu korumak ve bekleme süresini arttırmak için kullanılmaktadırlar. Özellikle besinlerin oksijenin neden olduğu otooksidasyonu yavaşlatma gerekçesi ile kullanılmaktadır. Birçok sentetik antioksidanlar gıda endüstrisi, kozmetik sanayisi ve ilaç sanayisinde kullanılmaktadır. Bütillenmişhidroksianisol (BHA), bütillenmişhidroksi tolüen (BHT), *t*-bütilhidrokinon (TBHQ) en yaygın olan sentetik antioksidanlardır. Sentetik antioksidanların ve oluşturabildikleri yan ürünlerin farklı hastalıklara neden olabildikleri ifade edilmiştir. Bu gerekçelerden dolayı sentetik antioksidanlar yerine doğal kaynaklı antioksidanların tüketimi öngörülmektedir.Günümüzde yapılan birçok araştırma

doğal antioksidanlar üzerine yoğunlaşmış ve güncelliğini arttırarak devam etmektedir (Yamazaki ve ark. 2007).

Antioksidan maddelerin işlevi şu şekildedir.

$R\bullet + O_2 \rightarrow RO_2\bullet$

$RO_2\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet$ yada $RO\bullet + AH \rightarrow ROH + A\bullet$

$RO_2 + A\bullet \rightarrow ROOA$

(R• : Radikal, AH: Antioksidan molekülü, A• : Antioksidan aktif molekülü) (Shahidi,1996).

2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanları farklı şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Öncelikli olarak doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar şeklinde iki bölümde sınıflandırılabilirler. Kimyasal reaksiyonlardaki mekanizmalarına göre birincil (primer) ve ikincil (sekonder) antioksidanlar olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Bazı antioksidanlar çok fonksiyonlu olarak da ifade edilirler, bunun nedeni ise birden fazla aktivite mekanizması göstermeleridir (Reische ve ark. 2002). Kimyasal bileşenlerine göre de antioksidanlar sınıflandırılmaktadır. Ancak bu sınıflandırmalardaki antioksidanlar reaksiyon mekanizmalarına göre yapılan sınıflandırmada yer aldığından genel olarak primer ve sekonder antioksidanlar olarak incelenecektir.

2.4.1.1. Birincil Antioksidanlar

Birincil antioksidanlar tip-1 ya da zincir kırıcı olarak adlandırılırlar. Otooksidasyonun ilk evresini engelleyen veya yavaşlatan birincil (primer) antioksidanlar, otooksidasyonun ileri aşamalarını da yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Otooksidasyonun yürüme zinciri şu şekildedir:

1-Yağ radikali ($R^{\bullet}$) oluşması için doymamış yağ bileşiğinden α-metilenik hidrojen ayrılarak otooksidasyon zincirini başlatır.

$RH \rightarrow R\bullet + H\bullet$

2-Yağ radikali yüksek reaktivite gösterir ve peroksi (ROO•) radikali oluşturmak için oksijenle tepkimeye girer.

$R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet + H\bullet$

3-Tepkimenin sonraki aşamalarında peroksi (ROO•) radikali yağla tepkimeye girer ve hidroperoksit (ROOH) ve kararsız bir lipit radikali (R•) oluşturur.

$$ROO\bullet + RH \rightarrow ROOH + R\bullet$$

Sonraki aşamada ise yağ radikali diğer bir peroksi radikali oluşturmak üzere oksijen ile tepkimeye girer. Oksidatif zincir mekanizması katalizlenir ve otooksidasyon olayı sürekliliğini korur (Reische ve ark. 2002).

Hidroperoksitler kararsız bileşiklerdir bu nedenle radikaller oluştururlar. Radikallerin oluşumu tepkime hızının artmasına sebep olur.

$$R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet + H\bullet$$

$$ROOH \rightarrow RO\bullet + HO\bullet$$

$$RO\bullet + RH \rightarrow ROH + R\bullet$$

Primer antioksidanlar radikallerle reaksiyona girip radikalleri kararsız yapılarından daha kararlı radikal olmayan bileşiklere tebdil ederler. Primer antioksidanlar taşıdıkları hidrojen atomlarını lipit radikallerine bağlarlar ve böylece antioksidanlar ve lipit türevleri oluştururlar. Birincil antioksidanlar hidrojen gönderici olarak peroksi (ROO•) radikallerine yağlardan fazla önem gösterirler. Bu nedenle otooksidasyon tepkimelerinde meydana gelen peroksi ve oksi (RO•) serbest radikalleri primer antioksidanlar ile bloke edilirler. Antioksidanlar direk yağ radikalleri ile de reaksiyon oluşturabilirler. Mekanizması şu şekilde gösterilir:

$$ROO\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet$$

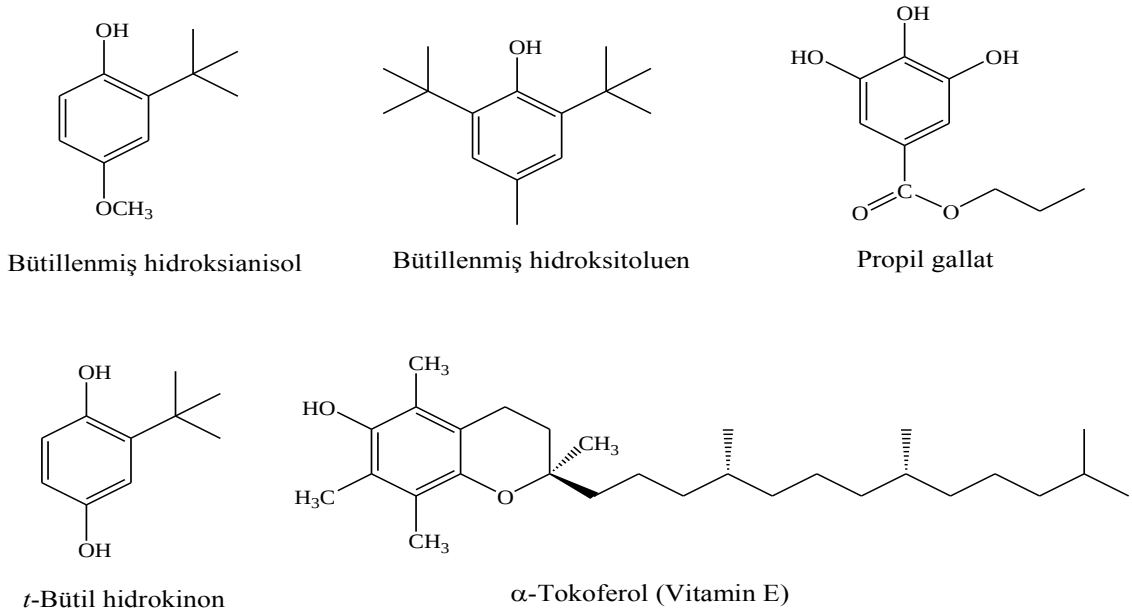
$$RO\bullet + AH \rightarrow ROH + A\bullet$$

$$R\bullet + AH \rightarrow RH + A\bullet$$

(AH: Antioksidan, A• : Antioksidan radikal, R• : Lipit radikali) (Reische ve ark. 2002).

Primer antioksidanlar, farklı halka sübstitüsyonlarını bulunduran mono ya da polihidroksi fenol bileşikleridir. Fenoldeki hidroksil grubuna elektron veren grupların sübstitüsyonlarından meydana gelen indüktif etki bileşiğin antioksidan aktivitesini yükseltir. Fenoldeki hidroksil gruplarının orto ve para konumlarına göre antioksidan aktivite farklılık gösterebilmektedir.

Sentetik primer antioksidanlara BHA, BHT, propil gallat ve t-bütil hidrokinon örnek gösterilebilir. Doğal kaynaklı primer antioksidanlara ise tokoferoller ve karotenoitler örnek verilmektedir (Şekil 2.22.) (Reische ve ark. 2002).

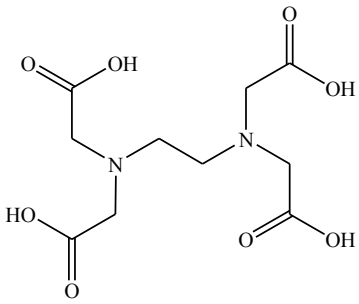


Şekil 2.22. Primer antioksidanlar

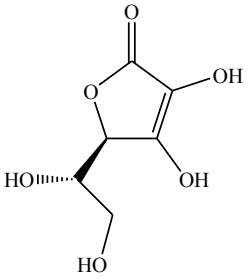
2.4.1.2. İkincil Antioksidanlar

İkincil (Sekonder) antioksidanlar, primer antioksidanlar gibi serbest radikalleri kararlı bileşiklere dönüştüremezler. Oksidasyonun hızına etki edip yavaşlatmaktadırlar. Sekonder antioksidanlar metal iyonlarını yakalayıp aktifliklerini bozarlar, oksijen atomunun aktvitivesini kaldırırlar, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan bileşiklere dönüşümünü gerçekleştirebilirler, ultraviyole ışınlarının radyasyonu absorblayabilirler. Bu antioksidanlar tek başlarına antioksidan etki gösteremeyip genellikle primer antioksidanların aktivitelerine etki edip artmasına neden olurlar. Bu antioksidanlara şunlar örnek verilebilir: EDTA, askorbik asit, askorbil palmitat, sitrik asit, lesitin, β-karoten ve tartarik asit (Şekil 2.23.) (Reische ve ark. 2002).

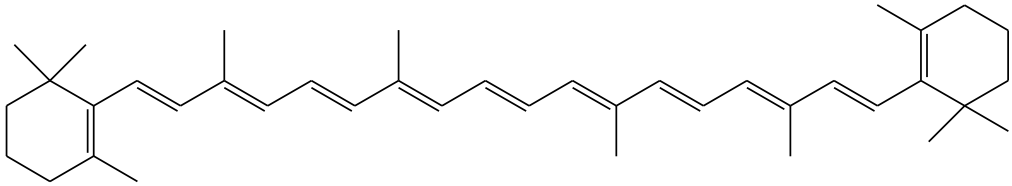
Sekonder antioksidanlar etki mekanizmalarına göre temel olarak üç gruba ayrılabilir. Bunlar: Kelat yapıcılar (fosforik asit, sitrik asit, tartarik asit ve EDTA), singlet oksijen gidericiler (Karotenoitler), oksijen gidericiler ve indirgeme ajanlarıdır (Askorbil palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbat, sülfitler ve askorbik asit) (Reische ve ark. 2002).



Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)



Askorbik asit



β-Karoten (A vitamini)

Şekil 2.23. İkincil antioksidanlar

2.4.2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi temel olarak hidrojen atomu transferi veya elektron transferine dayanarak yapılır. Birçok aktivite tayin yöntemleri bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır:

- ABTS katyon radikali giderim aktivitesi metodu (Re ve ark. 1999).
- CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) metodu (Apak ve ark. 2004).
- DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) metodu (Valkonen ve Kuusi 1997).
- DPPH serbest radikali giderim aktivitesi metodu (Blois 1958).
- FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) metodu (Benzie ve Strain 1996).
- Folin Ciocalteu metodu (Singleton ve ark. 1999).
- Fikoeritrin (PE) esaslı yöntemler (Ghiselli ve ark. 1995).
- Krosin metodu (Tubaro ve ark.1998).
- Luminol metodu (Whitehead ve ark.1992).

- Metal bağlama metodu (Dinis ve ark. 1994).
- ORAC (Oksijen radikal absorbans kapasitesi) metodu (Prior ve Cao 1999).
- β-Karoten renk açılım metodu (Miller 1971).
- Siklik voltametri metodu (Kohen ve ark. 1999).
- Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi metodu (Liu ve ark. 1997).
- TOSC (Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) metodu (Winston ve ark.1998).
- TRAP (Toplam radikal tutma parametresi) metodu (Wayner ve ark. 1985).

Kullanılan antioksidan metodlar şunlardır:

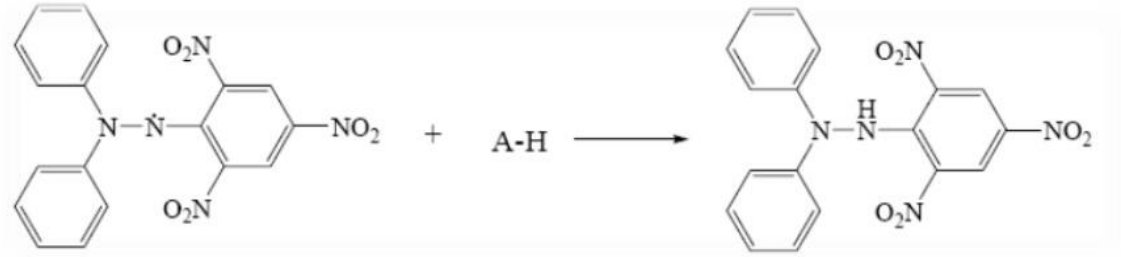
2.4.2.1. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Metodu

ABTS (2,2′-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)) oksidatif bir ajan ($K_2S_2O_8$, MnO_2 ve H_2O_2 gibi) ile koyu yeşil veya mavi renkli monokatyon radikal şeklini ($ABTS^{+\bullet}$) alan bir kromojendir. Antioksidan özellik gösteren bir kimyasal ile reaksiyona girdiğinde $ABTS^{+\bullet}$ radikal katyonu indirgenerek renksiz haline dönüşür. Burda katyonun dekolorizasyon derecesi yani renginin açılması indirgenme seviyesi ile ilgilidir. Bu özelliği sayesinde spektrofotometrik ölçümlerle antioksidan aktivite belirlenebilmekte ve antioksidan olduğu bilinen standartlar ile kıyas edilerek aktivite tayini yapılabilmektedir. Spektrofotometrik ölçümlerde $ABTS^{+\bullet}$ nin reaksiyon sonucundaki absorbans değerinin düşmesi antioksidanın aktif olduğunu bildirmektedir (Sashidhara ve ark. 2011).

2.4.2.2. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Metodu

Bu metot, antioksidan bileşiklerin kararlı bir organik azot radikali olan DPPH'ın (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil) serbest radikal giderim aktivitesini ölçme esasına dayanmaktadır (Şekil 2.24.). Rengi kırmızı olan DPPH radikalinin 515 nm'de en yüksek absorbsiyon değeri ölçülür. DPPH çözeltisine antioksidan eklenmesi ile absorbans değeri düşer ve antioksidanların varlığıyla radikalin rengi sarıya dönüşür. Genel olarak antioksidan özelliği araştırılan bitki ekstresinin DPPH ile etkileşmesinin 517 nm'de değerine ve standart madde ile kıyaslanması esasına bağlanmaktadır (Blois, 1958). Bu yöntemin dezavantajlarından biri 517 nm'de absorbsiyon yapan karotenoitler gibi bazı bileşiklerin analizinin zor olmasıdır. Antioksidan bileşiklerden bazıları, sterik engel

nedeniyle DPPH ile reaksiyona yavaş girerler veya giremezler. Bu sebep ile antioksidan kapasiteyi tam anlayabilmek için bu testin yanında başka testler de yapılmalıdır.



Şekil 2.24. DPPH radikalinin antioksidan ile reaksiyonu

2.4.2.3. β-Karoten Renk Açılım Metodu

β-Karoten renk açılım metodu iki metodla yapılabilmektedir: Agar difüzyon ve spektroskopik metot. Her iki metot da linoleik asit oksidasyonu neticesinde konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesi esasına bağlanmaktadır. Oksijen ile doyurulmuş suya linoleik asit ve β-karoten koyulur. Linoleik asitten oluşan radikaller (·OH, ·OR, ·OOR, vs.), 490 nm'de maksimum absorbans veren β-karoteni parçalayarak renginin açılmasına neden olurlar. Antioksidanlar, oluşan radikalleri söndürerek β-karotenin renginin açılmasını önlemektedir (Huang ve ark. 2005).

2.4.2.4. CUPRAC Metodu (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)

CUPRAC metodunda, Neokuproin (2,9–dimetil–1,10–fenantrolin) ve Cu (II) aynı ortama koyulur. Antioksidanın Cu (II)'yi indirgemesi sonucu oluşan Cu (I)'in neokuproin ile yaptığı kompleks 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Apak ve ark. 2004).

2.5. Alzheimer Hastalığı

Alman psikiyatri doktoru Alois Alzheimer tarafından ilk kez 1907 yılında tanımlanan Alzheimer hastalığı; demansın en yaygın görülen türüdür, yaşlı insanlardaki hafıza eksikliği ve zihinsel bozulma ile anılan nörodejeneratif bir hastalıktır. Demans, günlük yaşamsal fonksiyonları etkileyen beyin hastalığı olarak bilinip, hafıza eksikliği, yaşamsal fonksiyonları gerçekleştirmede zorluk; idrak etmede, sosyal uyum yeteneğinde azalma, duygusal tepkilerin düzenlenmesinde bozulma gibi belirtilerle ifade edilmektedir.

Kesin bir tedavisi bulunmayan demansın en yaygın türü ise Alzheimer hastalığıdır (Parihar 2004). Hastalık toplumda öncelikle yaşlı insanlarda görülmektedir. Alzheimer hastalığı, insan beyninin hafıza ve öğrenmeden sorumlu bölgelerindeki kolinerjik sinir hücrelerinin kaybıyla ilgili olarak nörofibrillerin düğümlenmesi ve amiloitlerin meydana gelmesi olarak ifade edilmektedir. Sinir hücrelerinin kaybıyla doku hasarları oluşur ve bu da hafıza da kalıtsal sorunlara sebep olur. Bu bölgelerde patolojik protein birikimi görülür. Burdaki protein β-amiloit plaklardan oluşmaktadır (Selekler 2010).

İnsan beyninde iki çeşit kolinesteraz enzimi bulunmaktadır. Bunlar: 7. kromozomdaki bir gen ile kodlanan asetilkolinesteraz (AChE) ve 3. kromozom geni ile kodlanan butirilkolinesteraz (BChE) enzimidir (Savalev ve ark. 2004).

2.5.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirilkolinesteraz (BChE) İnhibitörleri

AChE insan beyninde özellikle erişkin bireylerde yaygın olarak görülürken, BChE sınırlı olarak görülmektededir. AChE enzimi vücut dokularının uyarılabilen kısmında bulunurken, BChE enzimi ise sinir sisteminin merkezi ve periferal kısımlarında, plazmada ve karaciğerde bulunmaktadır (Hartman 2010).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administrationi, FDA) aracılığı ile kolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalığının uygulan ilk ilaç tedavisi olduğu ispat edilmiştir. Hastalık üzerindeki tedavi etkisi 6 ile 36 hafta süresince uygulanan tedavi sonucunda bilişsel fonksiyonlarda artma olduğu görülmüştür. Kolinesteraz enzimleri, hastalığa olumlu yönde etki etmesi ve engelleyici olarak etkisinin görülmesinden dolayı, Alzheimer hastalığının tedavisi için yeni bir ümit olmuştur (Raskin ve ark. 2004).

2.5.2. Kolinesteraz İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığındaki Mekanizması

Kolinesteraz inhibitörleri, AChE enziminin katalizlediği asetilkolin sinir hücreleri taşıyıcılarının yıkımını durdururlar. AChE'nin temel aktivitesi hücrelerdeki kolinerjik sinapslarda asetilkolinin (ACh) hidrolize uğramasıyla sinir impulsunu sonlandırmaktır (Mukherjee ve ark. 2007). Alzheimer hastalarında asetilkolin miktarında azalma görülür ve bu sebeple beynin algılama ölçütünde risk oluşturmaktadır. Asetilkolin enzimi β-amiloit olarak adlandırılan plakaların oluşumuna pozitif etki eder ve AChE'nin işlevini artırarak bozunmasını engeller (Hu ve ark. 2003). Asetilkolinesteraz inhibisyonunun,

amilot başlatıcı proteini üreterek sinir hücrelerini muhafaza eden evrenin başlamasını sağladığı ifade edilmiştir (Standridge 2004).

Oksidatif stres biyomoleküllerin oksitlenmesine sebep olarak hücrelerin zarar görmesine neden olur. β-amiloitlerin dokulardaki birikimi oksidatif stres ile de birleştiğinde nöronlarda yapısal bozukluğa neden olur ve bu süreç işlevsel aksaklıklara, zihinsel sıkıntılara ve ölüme de neden olabilmektedir. Beyin hücrelerindeki bu süreç Alzheimer riskini yükseltmektedir (Hartman 2010).

Yapılan araştırmalarda Alzheimer hastalığının tedavi yöntemlerinde maksimum faydanın elde edildiği ilaç grubunun asetilkolinesteraz inhibitörleri olduğu görülmüştür. Fakat bu AChE inhibitörlerinin ilerleyen Alzheimer hastalığında kullanılmaması ve yan etkileri nedenleriyle yeni ilaçların arayışını elzem kılmıştır (Orhan ve ark. 2002). Diğer tedavi yöntemleri arasında ise en önde gelen 'N-metil-D-aspartat' (NMDA) reseptör antagonistleridir. Kolinesteraz inhibitörleri, hafıza ve düşünce ile alakalı nörotransmitter olan asetilkolinin parçalnmasını engellemeye yardımcı olmaktadırlar. NMDA reseptör antagonistleri de öğrenme ve hafıza işlevleri yönü ile önemli bir transmitter olan glutamatı düzenleyici etki göstermektedir (Hartman 2010).

2.6. Sitotoksik Etki

Günümüz insanlığının en önemli hastalıklarından biri kanserdir. Kanser, dokular ve organlardaki hücreler veya hücreler arası salgılanan maddelerde meydana gelir ve hücrelerin yapısının bozulması ve çoğalması ile oluşur. Dünya genelinde ölüm nedenlerinden ilk sıralarda yer almaktadır. Kanser hastalıklarının tam olarak tedavi yöntemi bulunamamıştır. Bu nedenle günümüzde birçok çalışma kanser hastalıklarının tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır ve bu sebeple sitotoksik etkili yeni bileşiklerin bulunması önem arz etmektedir. Yapılan araştırmalarda sitotoksisite çalışmaları hızla artmakta ve araştırmalara geniş ölçüde konu olmaktadır (Blakely ve ark. 2004).

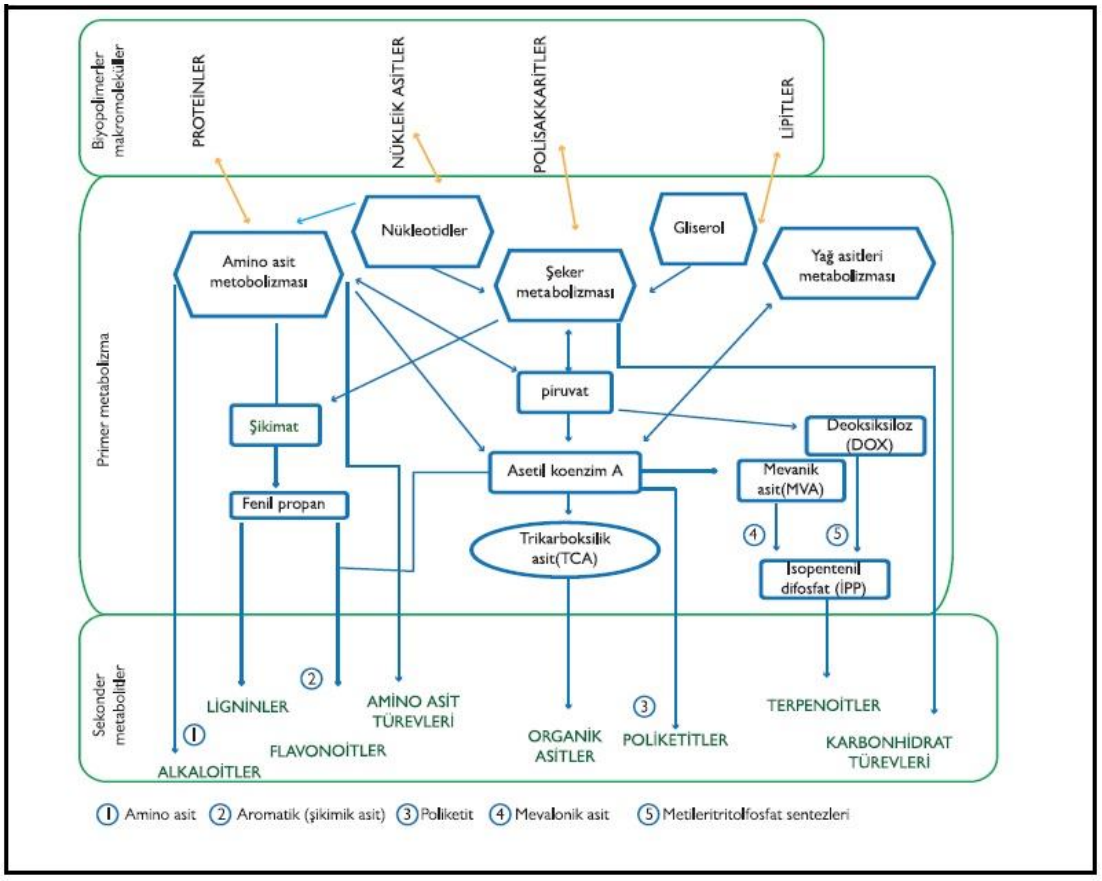
Antikanser ve sitotoksik etki gösteren bileşiklerin belirlenmesi ve bu bileşiklerin ilaç maddelerine dönüştürülmesi kanser hastalıkları için önem arz etmektedir. Sitotoksik aktiviteyi belirlemek için in vitro ve in vivo metodları kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan in vitro metodu, hücre kültüründe referans bileşik kullanılarak farklı hücrelere karşı test edilmesi ile uygulanmaktadır. In vitro sitotoksisite testleri ilaç üretimindeki ilk

aşamalardan biridir. Özellikle kanser ilaçlarının keşif edilmesinde ve geliştirilmesinde çok önemlidirler. Bu nedenle in vitro testlerin sonucuna göre yeni ilaçlar ilk değerlendirmeyi geçtikleri sonucunda hayvan deneyleri ve klinik çalışmalara geçilerek araştırılmaktadır. İn vivo metodu ise deney hayvanlarının organlarındaki doku ve hücrelere uygulanmaktadır (Onda ve ark. 2004, Ulukaya ve ark. 2011).

Sitotoksik etki gösteren bitki türleri üzerine incelemeler artmaktadır. *Allium* türlerinde bulunan SAC (S-allilsistein) bileşiği fareler üzerinde yapılan çalışmada, kötü huylu ve hızlı ilerleyen akciğer kanseri hücrelerinin gelişimini yavaşlattığı tespit edilmiştir (Tang ve ark. 2010). Yine fareler üzerinde yapılan deneyde *A. sativum* türünde bulunan DATS (dialiltrisülfit) bileşiğinin prostat gelişime neden olan PC-3 kanser hücrelerinin gelişimini baskıladığı belirtilmiştir (Xiao ve ark. 2006). SAC bileşiği Bcl-2 protein üretiminin azalmasına neden olarak ve kaspaz-3 aktivitesinin artmasını sağlayarak prostat kanserinde iyileşme sağladığı ifade edilmiştir (Chu ve ark. 2007). Yapılan bir çalışmada DATS'ın A375 hücre tümörünün gelişimini baskılayarak ve DNA hasarını engelleyerek cilt kanserine önemli ölçüde etki ettiği bulunmuştur (Wang ve ark. 2012).

2.7. Primer ve Sekonder Metabolitler

Prokaryotik mikroorganizmalar, canlılarda ortak 'primer metabolit' olarak isimlendirilen ve canlılık için gerekli olan yapı taşları nükleik asitler, proteinler, yağlar ve karbonhidratlardır (Şekil 2.25.). Canlılık işlevleri ile direkt ilgisi olmayan ve primer metabolizma sonucu sadece belirli organizma, tür veya dokularda sekonder metabolizma sonucu üretilen diğer maddeler ise 'sekonder metabolit' olarak isimlendirilmektedir. Sekonder metabolitlere ise, fenolik bileşikler, terpenoidler, kükürt içeren bileşikler, azot içeren alkaloitler örnek olarak verilmektedir (Dewick 2002).



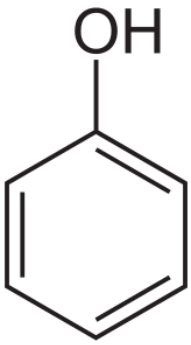
Şekil 2.25. Primer ve sekonder metabolizma yolları (Hänsel ve Sticher, 2007).

Bitkilerde ve diğer canlılarda; madde alışverişi ve dönüşümleri, biyokimyasal tepkimelerle moleküler ve hücresel seviyeden başlanarak karmaşık bir reaksiyon ağı meydana getirerek gerçekleşirler. Temel yapı taşı olarak faaliyet gösteren basit moleküller primer metabolizma, burdan oluşan moleküller ise sekonder metabolizma faaliyetlerini gerçekleştirir. Bazen primer ve sekonder maddeler arası geçiş ürünleri (ara metabolitler) oluşabilir. Bu metabolitler tekrar birbirine dönüşür. Primer metabolitler canlı sistemler için yokluğu düşünülemez maddelerdir. Fitokimyasal çalışmalarda primer ve sekonder metabolitlerin dönüşümleri incelenmiştir.

Sekonder metabolitler daha çok bitkiler aleminde görülür. Bitkilerin sağlık açısından önemi bilinmektedir, bunun yanında ilaç ve kozmetik alanlarındaki kullanımları ve bu alanlarda etken madde olmaları birçok araştırmaları bu yöne kaydırmıştır. Sekonder metabolitler bu belirtilen nedenlerle çok geniş bir alanda araştırılmakta ve her geçen gün bilimsel araştırmalara konu olmaktadır. Sekonder metabolitlerin en önemlilerinden biri de fenolik bileşiklerdir.

2.7.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, işlevsel türevlerini de kapsayan bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik bileşiklerdir. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu bulunduran fenol olarak isimlendirilen benzendir (Şekil 2.26.). Fenolik bileşikler, fenol halkasındaki benzene farklı radikal gruplarının bağlanmasıyla oluşmaktadırlar. Fenolik bileşikler bitkilerde bulunan en geniş sekonder metabolitlerdendir ve genelde glikozitler halinde bulunurlar. 8000'den fazla fenolik bileşik bulunmaktadır (Geissman ve Crout 1969).



Şekil 2.26. Fenol halkası

Fenolik bileşiklerin bir çok türü bulunmaktadır ve genel olarak basit fenoller ve polifenoller olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Fenolik bileşikleri şöyle gösterebiliriz: (Çizelge 2.3.)

Çizelge 2.3. Fenolik bileşikler

C sayısı	İskelet	Sınıflandırma	Örnek
6	C_6	Basit Fenoller	Hidrokinon
6	C_6	Benzokinonlar	2,6-Dimetoksibenzokinon
7	C_6-C_1	Fenolik asitler	Gallik asit
8	C_6-C_2	Asetofenonlar	Gallasetofenon
8	C_6-C_2	Fenilasetik asitler	p-hidroksifenil-asetik asit

Çizelge 2.3. Devamı. Fenolik bileşikler

9	C_6-C_3	Hidroksisinnamik asitler	p-kumarik asit
9	C_6-C_3	Kumarinler	Eskuletin
9	C_6-C_3	Fenilpropenler	Eugenol
9	C_6-C_3	İzokumarinler	Bergenin
10	C_6-C_4	Naftokinonlar	Juglon
13	C_6-C_1- C_6	Ksantonlar	Mangiferin
14	C_6-C_2- C_6	Stilbenler	Resveratrol
15	C_6-C_3-C_6	Flavonoidler	Apigenin
18	$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanlar	Pinoresinol
30	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoidler	Amentoflavon

Polifenoller genel bir sınıflandırma ile fenolik asitler ve flavonoidler şeklinde iki ana bölüme ayrılmaktadır (Shi ve ark. 2003).

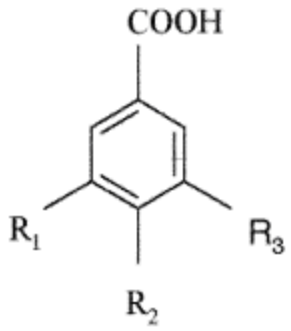
2.7.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler bitkiler aleminin en geniş fenolik bileşiklerinden biridir. Bitkilerde genellikle şekerler veya organik asitler ile esterleşmiş olarak bulunurlar. Fenolik asitlerdeki fenol halkasına bağlı olan hidroksil grubu yüksek aktivite gösterip şekerler ile bağlanarak glikozitleri oluştururlar (Saldamlı 2005).

Fenolik asitler genel olarak hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler olarak iki grupta incelenmektedir.

2.7.2.1. Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler C_6-C_1 iskelet yapısında bulunan ve benzoik asitten türeyen bileşiklerdir. Hidroksibenzoik asit türevleri olan bileşikler aromatik halkanın hidroksillenme ve metillenmesi ile farklılık göstermektedir. Doğada en çok bulunan benzoik asitler şunlardır; p-hidroksi benzoik asit, protokatesik asit, vanilik, siringik, gallik, salisilik, gentisik ve ellajik asitlerdir (Yang ve ark. 2001).



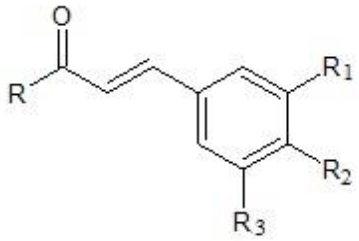
Şekil 2.27. p-hidroksi benzoik asit genel yapısı

Çizelge 2.4. Hidroksibenzoik asitler (Nack ve Shahidi 2004)

Asit adı	R_1	R_2	R_3
p-hidroksi benzoik	H	OH	H
Protokatesik	OH	OH	H
Gallik	OH	OH	OH
Salisilik	H	H	OH
Gentisik	OH	H	OH
Siringik	OCH_3	OH	OCH_3
Vanilik	OCH_3	OH	H

2.7.2.2. Hidroksisinnamik Asitler

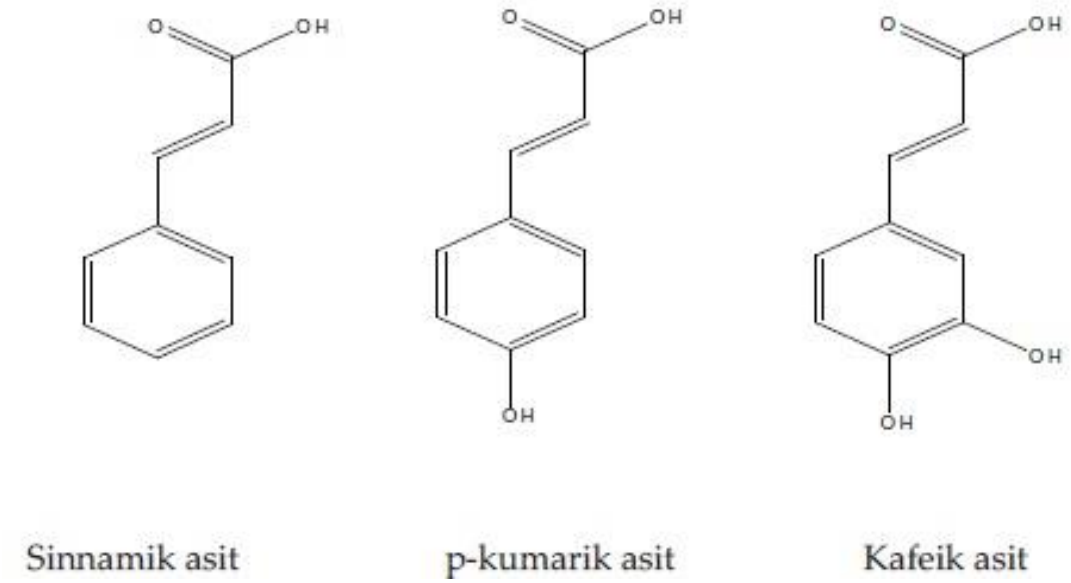
Hidroksisinnamik asitler C_6-C_3 fenilpropan yapısını göstermektedir. Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan hidroksisinnamik asitler bitkilerde glikozitler ve esterler gibi farklı konjuge formlarda bulunurlar. Fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun sayısı ve konumuna göre farklı özellik gösterirler. Sinnamik asitler, kumarinler, fenilpropanoidler, lignanlar, stilbenler, izoflavonoidler, auronların üretildiği biyosentetik yolda üretilirler (Vogt 2010). Hidroksisinnamik asitler arasında en önemli olanlar şunlardır; p-kumarik, o-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit , sinapik ve klorojenik asitler (Çizelge 2.5.). Hidroksisinnamik asitler serbest halde çok az bulunurlar, genellikle asit türevleri şeklinde bulunmaktadır (Saldamlı 2005).



Şekil 2.28. Hidroksisinnamik asit genel yapısı

Çizelge 2.5. Hidroksisinnamik asitler (Nack ve Shahidi, 2004)

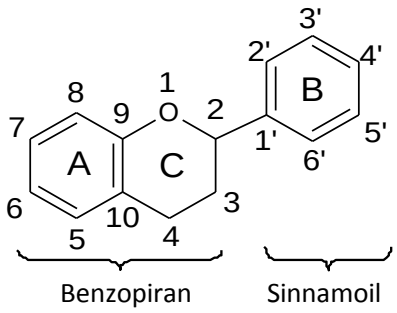
Asit adı	R_1	R_2	R_3
p-kumarik	H	OH	H
o-kumarik	OH	H	H
m-kumarik	H	H	OH
Sinnamik	H	H	H
Sinapik	OCH_3	OH	OCH_3
Kafeik	OH	OH	H
Ferulik	OCH_3	OH	H



Şekil 2.29. Bazı hidroksisinnamik asitler

2.7.3. Flavonoidler

Flavonoidler, üçlü karbon köprüsü ile iki aromatik halkanın bağlandığı polifenolik bileşiklerdir. Flavon adı Latince sarı anlamında olan flavus sözcüğünden gelmektedir. Bitki aleminde çok fazla bulunan ve genellikle sarı renkli olan bileşiklere flavonoid denilmiştir (Nack ve Shahidi 2004). Flavonoidler, yapısında C_6-C_3-C_6 iskeletini bulunduran ve özellikle de fenilbenzopiran iskelet yapısı bulunan fenolik bileşiklerdir (Şekil 2.30.). Flavonoidler çoğunlukla bitkiler tarafından üretilen muhteviyatında 4000'den fazla bileşik bulunduran devasa bir gruptur. Antioksidan özelliklerine ve kelatlama yeteneğine sahiptirler (Liu 2004) ayrıca hastalıklara karşı savunma sisteminin parçası oldukları gibi bitkilerin büyüme ve olgunlaşmasını da etkilemektedir.



Şekil 2.30. 2-Fenil benzopiran (flavonoid) genel yapısı

3 karbonlu C ve 6 karbonlu A ve B halkalı yapılardan meydana gelen heterosiklik bileşikler, C halkası olan hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılık gösterirler. Karbon atomları oksijenden başlanarak numaralandırılırken B halkasındaki karbonlar ise üssü(') rakamlarla numaralandırılmaktadır. Flavonoid grupların karekteristik özelliklerini B halkası ile merkezdeki halka yapısına bağlanan gruplar, bağ yapan hidroksil gruplarının sayısı, üçlü karbon köprüsünün oksidasyon seviyesi ve doymamışlık derecesi ortaya koyar ve flavonoidler bu özelliklerine göre gruplara ayrılmaktadır (Saldamlı 1998).

Flavonidler temel olarak 6 gruba ayrılırlar. Bunlar:

1-Flavon

2-Flavon-3-ol

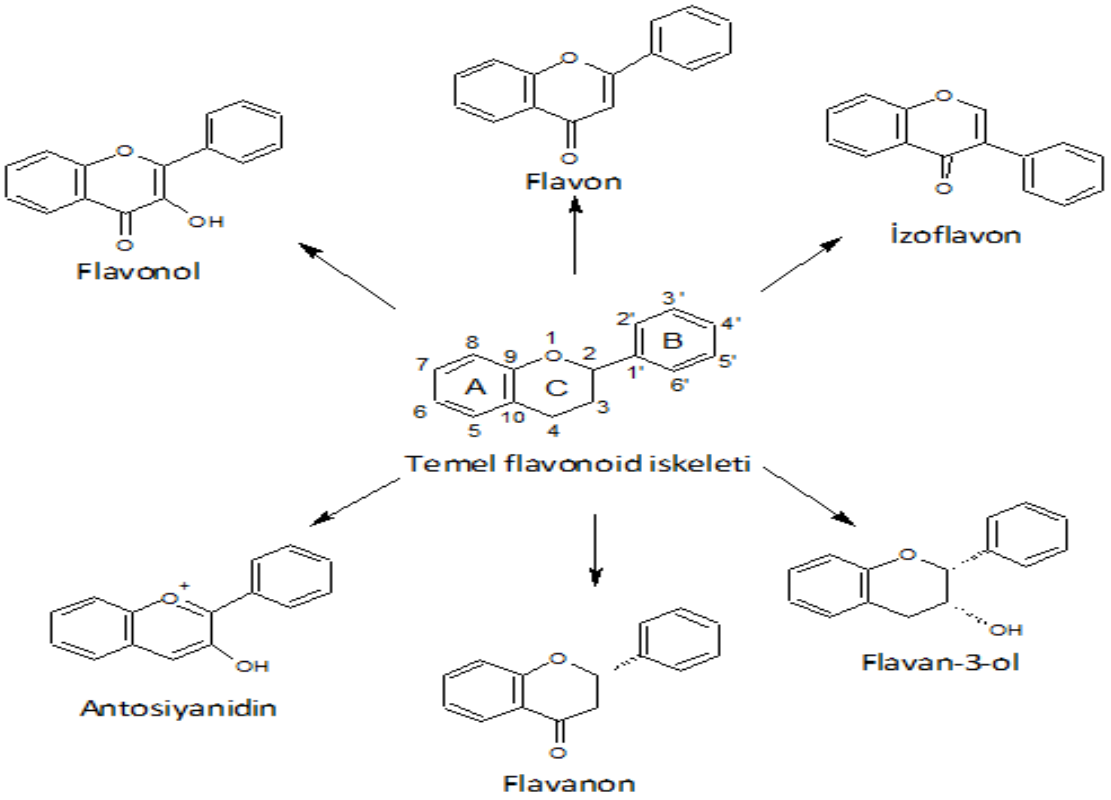
3-Flavonol

4-Flavonon

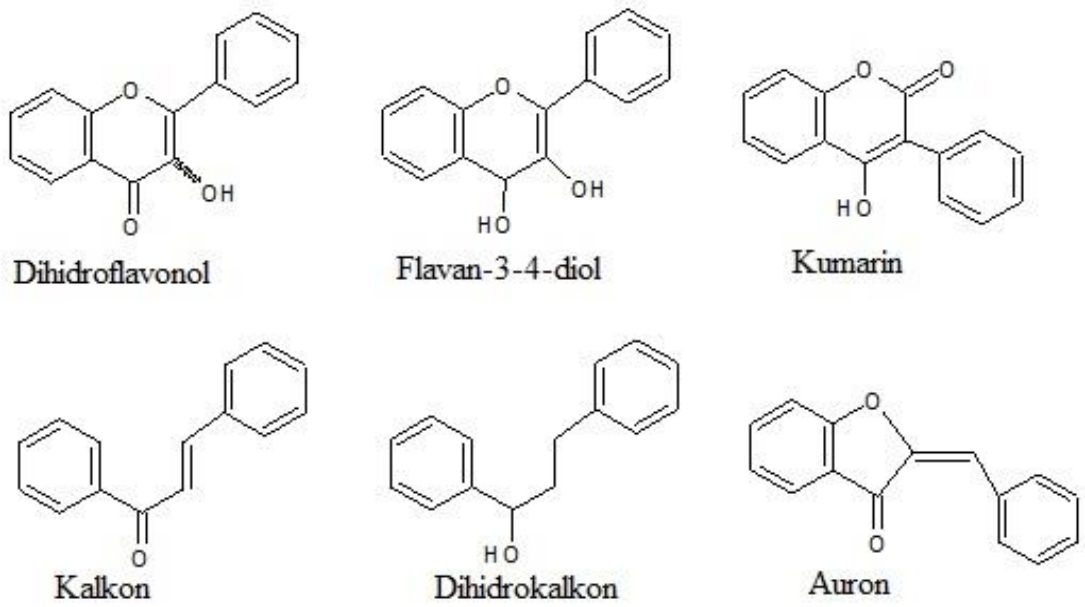
5-İzoflavon

6-Antosiyanidin'dir (Şekil 2.31.).

Bunların dışında bitkilerde çok az bulunan dihidroflavon, dihidrokalkon, kumarin, flavan-3-4-diol,kalkon ve auron bileşenleri de flavonoid sınıfındadır (Şekil 2.32.).



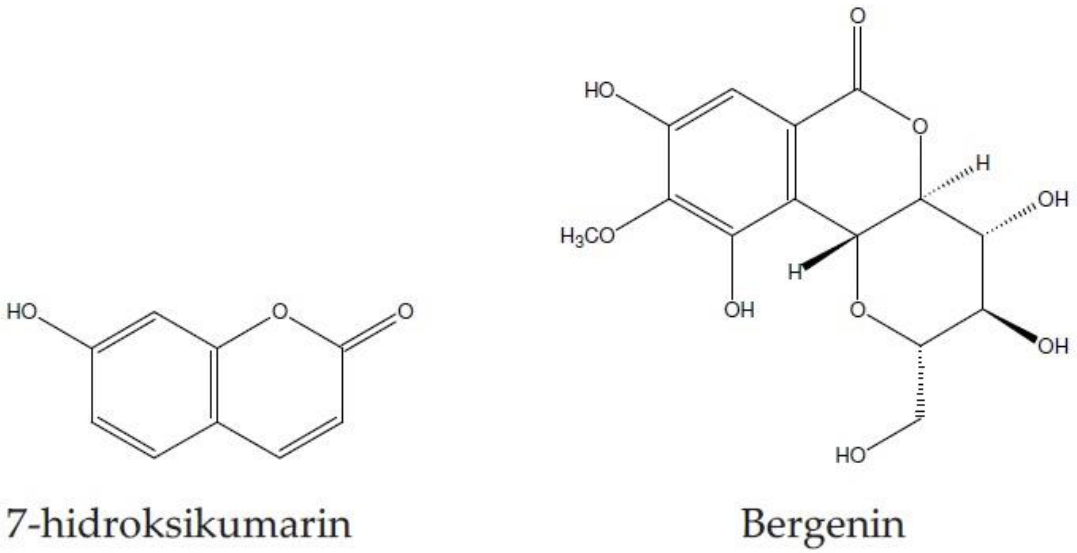
Şekil 2.31. Temel flavonoidlerin genel yapısı



Şekil 2.32. Diğer flavonoidlerin genel yapısı

2.7.4. Kumarinler

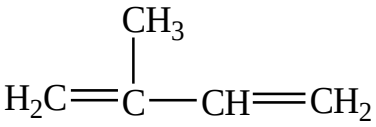
C_6-C_3 yapısını gösterirler. C_3 biriminden olan heterosiklik oksijen grubuna sahiptirler. İzokumarinler de yapısal olarak kumarinlere benzemektedir. Farklı olarak karbonil ve oksijen grupları ters olarak bağlanmıştır. İzokumarin (bergenin) ve kumarin yapıları görüldüğü gibidir (Şekil 2.33.).



Şekil 2.33. İzokumarin ve kumarin yapıları

2.7.5. Terpenler

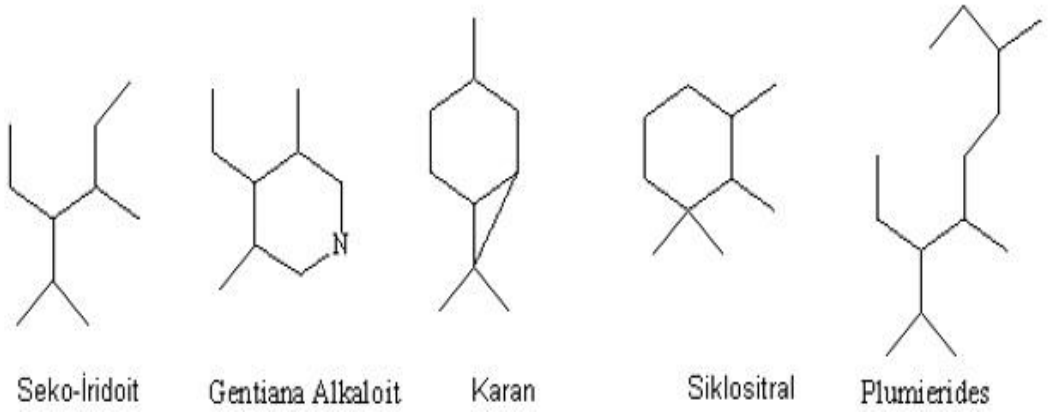
Terpenler, bitkisel metabolitler içinde en fazla farklılık gösteren ve bitkilerde yaygın olarak bulunan geniş bir bileşik grubudur. Temel yapıları beş karbonlu izopren molekülünden oluştuklarından izoprenoidler olarak da adlandırılırlar (Şekil 2.34.). Terpenler bitki hücrelerinde genellikle serbest halde bulunurken, glikozitler, organik esterler veya proteinlerle birlikte bulunmaktadırlar (Dewick 2009).



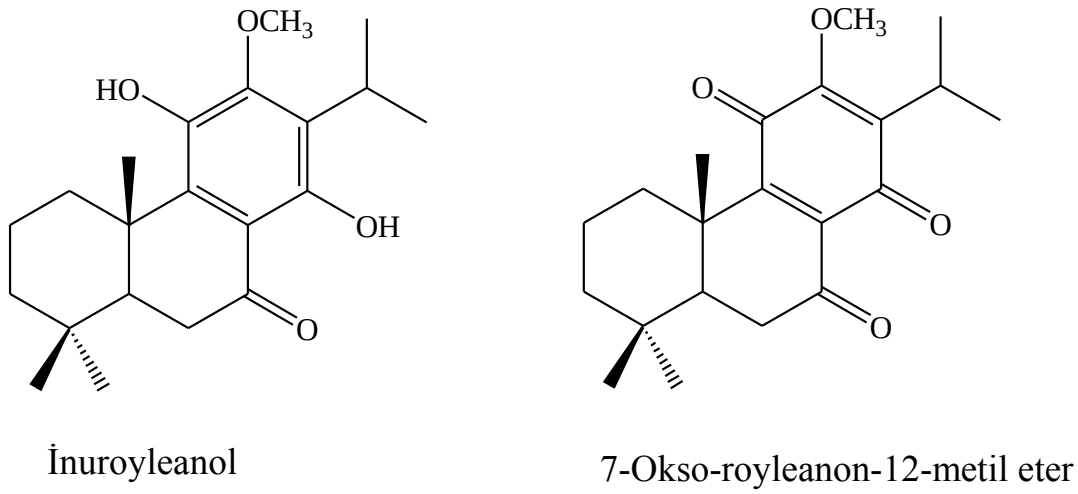
Şekil 2.34. İzopren yapısı

Terpenlerin temel yapıları izopren moleküllerinden meydana geldiğinden sınıflandırmaları da izopren moleküllerinin sayısına göre yapılır. İzopren kuralına göre bütün terpenler iki veya daha fazla izoprenin bir araya gelmesi ile oluşmuştur. Sekonder metabolitlerin bir üyesi olan terpenlerin farmakolojik etkileri bulunmaktadır (Boiteau ve ark. 1964). Terpenlerin izopren sayılarına göre sınıflandırması şöyledir:

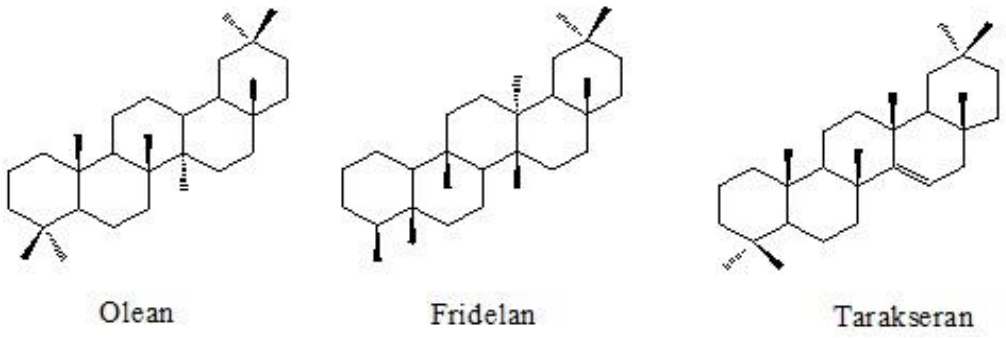
- Hemiterpenler
- Monoterpenler
- Seskiterpenler
- Diterpenler
- Sesterterpenler
- Triterpenler
- Tetraterpenler
- Politerpenler



Şekil 2.35. Bazı monoterpen yapıları (Devon ve Scott. 1972)



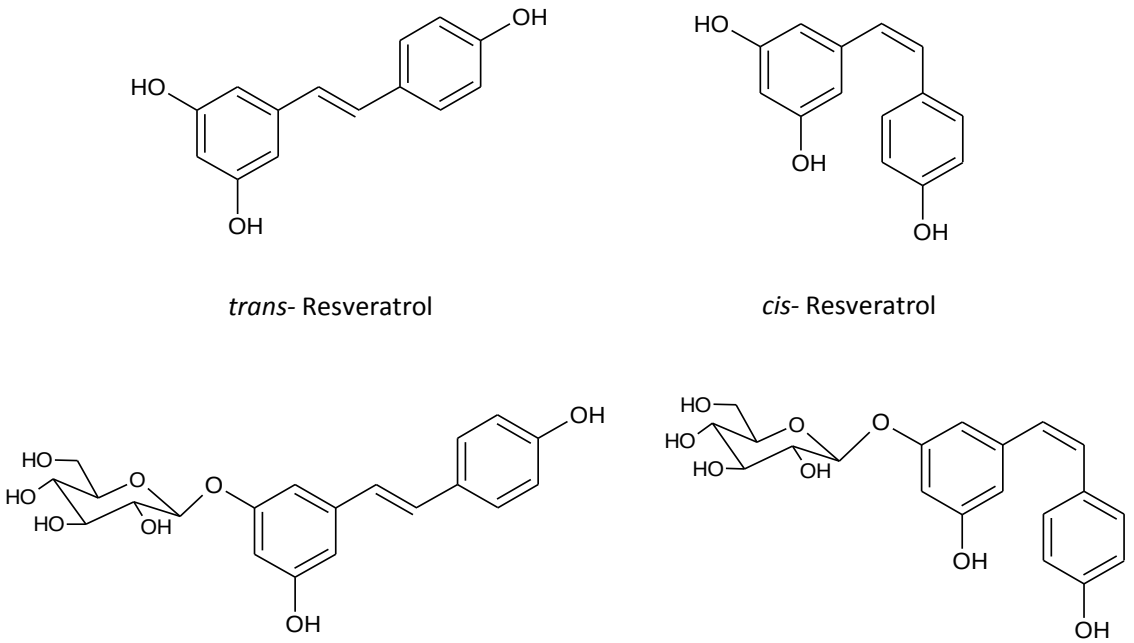
Şekil 2.36. Bazı diterpenlerin yapısı (Kabouche ve ark. 2007)



Şekil 2.37. Bazı triterpenlerin yapısı

2.7.6. Stilbenler

Fenolik bileşikler içerisinde bulunan stilbenler C_6-C_2-C_6 yapısında bulunan bileşiklerdir. Bitkiler tarafından bakteri ve viral patojenlerin zararlarına karşı üretilen fitoaleksinler olarak da ifade edilmektedirler. En önemli bileşiklerinden biri de resveratroldur. Bitkilerde cis ve trans izomerleri halinde farklı formları bulunur. Genel olarak en yaygın formu ise piseid ve polidatin olarak da ifade edilen trans-resveratol-3-O-glikozit formudur (Şekil 2.38.) (Kimura ve ark. 1985).



trans- Resveratrol

cis- Resveratrol

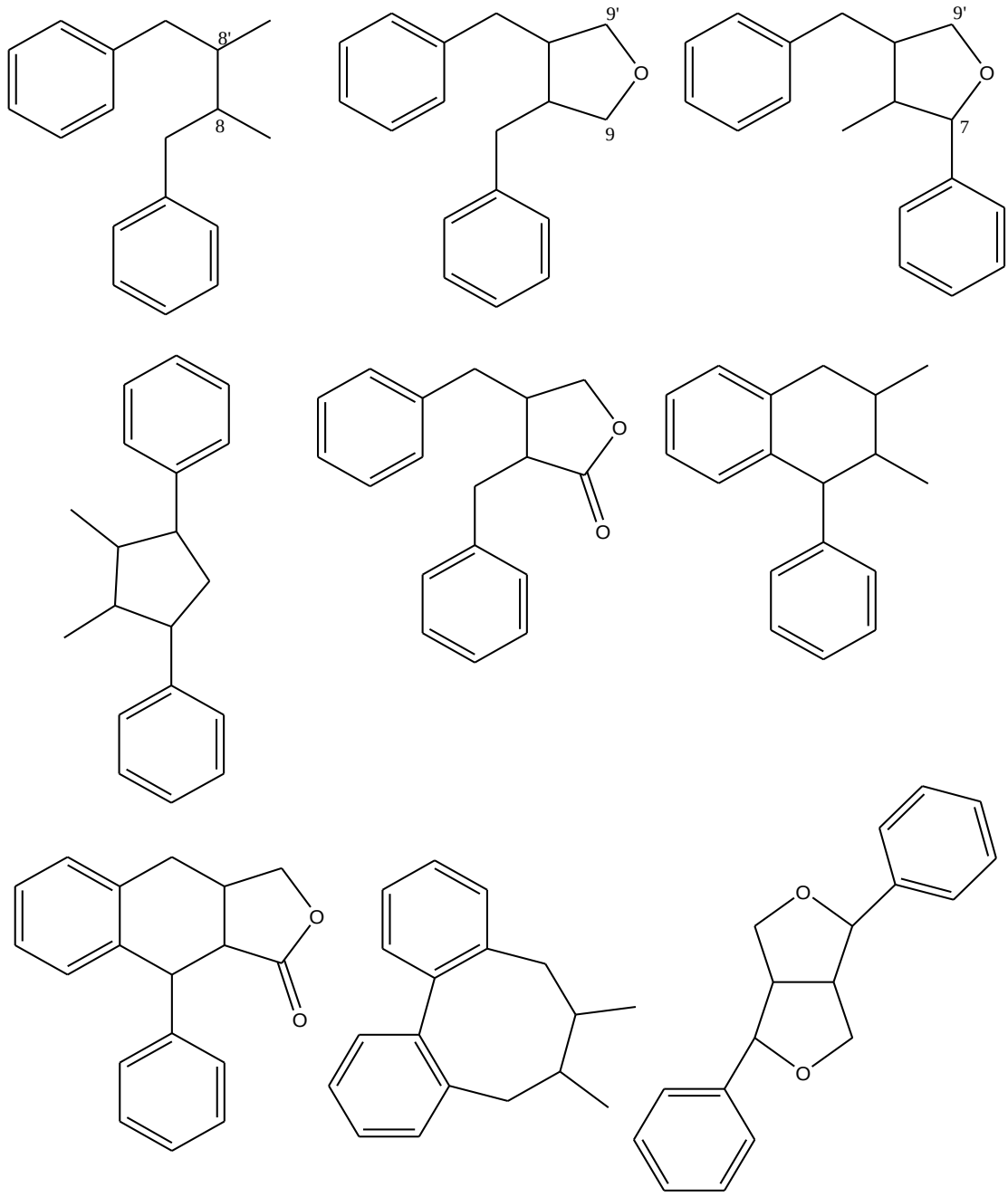
trans- Resveratrol-3-O-glikozit

cis- Resveratrol-3-O-glikozit

Şekil 2.38. Resveratrol yapısı ve glikozit formu

2.7.7. Lignanlar

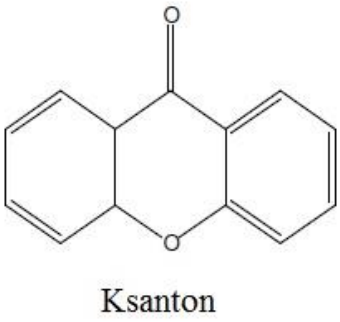
Lignanlar fenolik bileşikler arasında bulunan $(C_6$-$C_3)_2$ iskelet yapısında bulunan bileşiklerdir. Lignanlar, fenilpropan molekülünün kondenzasyonu ile meydana gelir ve ayrıca kondenzasyon sonucu norlignanlar, neolignanlar, oligomerler bileşikleri de meydana gelir. Bitkiler âleminde yaygın olarak bulunmaktadır (Bruneton 1993).



Şekil 2.39. Bazı lignan yapıları

2.7.8. Ksantonlar

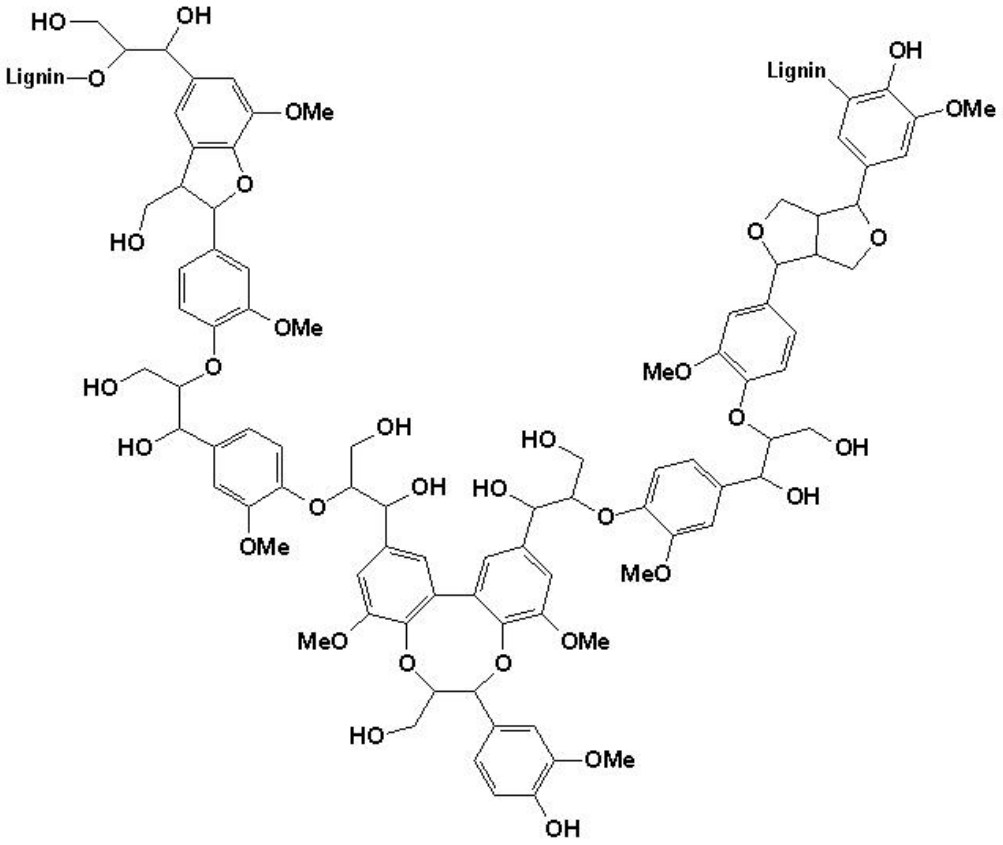
Ksantonlar C_6-C_1-C_6 molekül yapısını göstermektedirler. Ksantonlar çiçeklerdeki sarı renk pigmentinin oluşumunu sağlamaktadırlar (Vermerris ve Nicholson 2006).



Şekil 2.40. Ksantonun yapısı

2.7.9. Lignin

Fenolik polimerlerden olan lignin bitkilerdeki selülozdan sonra en fazla bulunan biyopolimerdir. Hidrofobik özelliğinden dolayı dokular arasında su transferini kolaylaştırır ve bitkilerin yapılarını desteklemektedir (Vermerris ve Nicholson 2006).



Şekil 2.41. Lignin yapısı

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bitkisel Materyal

Allıum cinsine ait farklı türler Türkiye'nin farklı coğrafi yerlerinden toplandı ve teşhisleri Van Yüzüncüyıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji bölümünde yapıldı (Fırat ve ark. 2015, Davis 1984). Toplanan bitkiler toprak altı ve toprak üstü kısımlara ayrıldı. Bitki türleri ve toplandığı yerler Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Allium* türleri ve herbaryum numaraları

***Allium* Türü**	**Toplandığı Yer**	**Herbaryum Numarası**
Allium akaka	Van	M Fırat 31017
Allium akaka	Hakkâri	VANF 164090
Allium atroviolaceum	Van	M Fırat 31039
Allium chrysantherum	Şırnak	M Fırat 30188
Allium kharputense	Diyarbakır	VANF 164091
Allium rhetoreanum	Hakkâri	VANF 164084
Allium scabriscapum	Van	M Fırat 31171
Allium schoenoprasum	Van	VANF 164093
Allium scorodoprasum subsp. *roturdum*	Van	VANF 164086
Allium shatakiense	Van	VANF 164085
Allium shirnakiense	Şırnak	M Fırat 30835
Allium tripedale	Hakkâri	VANF 164089
Allium vineale	Van	VANF 164087
Allium vineale	Malatya	VANF 164088

3.2. Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

3.2.1. Kimyasal Maddeler

Pirokatekol, kersetin, β-karoten, linoleik asit, 2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 5,5-ditiyobis-(2-nitro benzoik asit) (DTNB), nikotinamit adenindinükleotit (NADH), nitroblutetrazolyum (NBT), nitroblutetrazolyum (NBT), α-tokoferol, potasyum peroksi disülfat ($K_2S_2O_8$), asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, ABTS, bakır (II) klorür, kloroform, diklorometan, etanol, alüminyum nitrat, potasyum asetat, galantamin hidrobromür, Tween-40, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin), asetiltiyokolin iyodür, butiriltiyokolin iyodür (Fluka), sodyum karbonat, amonyum asetat, sodyum hidrojen fosfat ve sodyum dihidrojen fosfat, Folin-Ciocalteu reaktifi (Applichem), hidrojenperoksit (H_2O_2), nitrik asit (HNO_3), Tripsin EDTA (%25), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT), DMSO, DLD-1 (kanser hücresi), p-kumarik asit, o-kumarik asit, gallik asit, kafeik asit, vanilik asit, salisilik asit, kinik asit, 4-hidroksi benzoik asit, ferulik asit, klorojenik asit, rozmarinik asit, protokateşikasit, sinnamik asit, sinapinik asit, fumarik asit, malik asit, siringik asit, vanilin, kumarin, fisetin, hesperetin, naringenin, rutin, kamferol, mirisetin, kersitrin, luteolin, apigenin, krisin, hesperidin, likitrigenin, izokersitrin, apigetrin, roifolin, nikotiflorin, formik asit, amonyum format, asetonitril, ultrasaf su. Çözücülerin çoğu Sigma firmasından temin edildi.

3.2.2. Kullanılan Çözeltiler

Aflatoksin Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

%10'luk H_2SO_4 çözeltisinin hazırlanması: 10 mL H_2SO_4 alınıp üzerine 90 mL saf su ilave edilerek hazırlandı

Ağır Metal Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Ağır metal tayininde çözücü olarak HNO_3 ve H_2O_2 kullanıldı.

Toplam Fenolik Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 2 g Na_2CO_3 100 mL'lik balon jojeye ilave edildi ve bir miktar saf su ile çözüldü. Çözünme bittikten sonra saf su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + $CuSO_4$) temin edildiği gibi kullanıldı.

Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1 M Potasyumasetat çözeltisinin hazırlanması: 0,9615 g CH_3COOK 10 mL'lik balon jojeye ilave edildi ve bir miktar saf su ile çözüldü. Bu işlemden sonra saf su ile hacmine tamamlandı.

% 10'luk Alüminyumnitrat çözeltisinin hazırlanması: 1,76 g $Al(NO_3)_3.9H_2O$ 10 mL'lik balon jojeye ilave edildi ve bir biktar saf su ile çözüldü. Çözünme bittikten sonra saf su ile balon hacmine tamamlandı.

β–Karoten Renk Açılım Metodunda Kullanılan Çözelti

β–Karoten reaktifinin hazırlanması: 0,2 mg β–Karoten 1 mL kloroformda çözüldükten sonra balona aktarılır ve aynı balona 200 µL Tween–40 ve 20 µL lineloik asit ilave edilip karıştırıldı. Vakum uygulanarak kloroform uçuruldu ve oksijen ile doyurulmuş 50 mL su eklendi ve karıştırıldı.

DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Metodunda Kullanılan Çözelti

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH bileşiği tartılarak 100 mL'lik balon jojede etil alkolde çözüldü.

ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Metodunda Kullanılan Çözelti

7 mM ABTS katyon radikalinin hazırlanması: 19,2 mg ABTS tartılarak 5 mL suda çözündükten sonra toz halinde 3,3 mg potasyumperoksidisülfat ($K_2S_2O_8$) ilave edilip karıştırıldı ve oda sıcaklığında 12-16 saat beklendi. Bu süre sonunda çözelti kullanılmaya başlamadan önce absorbsiyonu ~0,70 olacak şekilde UV'de seyreltildi.

CUPRAC Metodunda Kullanılan Çözeltiler

7,5 mM Neokuprin çözeltisinin hazırlanması: 76,6 mg NaH_2PO_4 tartılarak 50 mL %96'lık alkolde çözüldü.

10 mM Bakır (II) klorürdihidrat çözeltisinin hazırlanması: 42,62 mg $CuCl_2.2H_2O$ tartımı alınarak 25 mL suda çözüldü.

1 M Amonyumasetat tamponunun hazırlanması: 1,927 g NH_4OAc tartımı alınarak 25 mL suda çözüldü ve pH=7'ye ayarlandı.

Antikolinesteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

0,1 M NaH_2PO_4 Çözeltisinin hazırlanması: 1,56 g NaH_2PO_4 tartımı alıanarak 100 mL saf suda çözüldü.

0,1 M Na_2HPO_4 Çözeltisinin Hazırlanması: 3,556 g Na_2HPO_4 tartımı alınarak 200 mL saf suda çözüldü.

5 mM DTNB Çözeltisinin hazırlanması: 16 mg DTNB (5,5-ditiyobis(2-nitro benzoik asit)) 1 mL pH=7 tamponunda ve 7,5 mg $NaHCO_3$ 1 mL pH=7 tamponunda çözüldükten sonra iki çözelti karıştırılır ve yeni çözelti 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlandı. Kullanma zamanında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi eklendi.

0,1 M pH=7 Tampon çözeltisinin hazırlanması: 3,9 mL NaH_2PO_4 ve 6,1 mL Na_2HPO_4 çözeltileri alınıp 10 mL saf su ilave edilerek hazırlandı.

0,1 M pH=8 Tampon çözeltisinin hazırlanması: 94,7 mL Na_2HPO_4 ve 5,3 mL NaH_2PO_4 çözeltilerinden alınıp 100 mL saf su ilave edilerek hazırlandı.

7,1 mM Asetiltiyokoliniyodur (AcI): 32,8 mg AcI alınıp 8 mL saf su ilave edildi. Kullanma zamanında 8 mL pH=8 tampon çözeltisi ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

0,79 mM Butirilkoliniyodur (BuI): 4mg BuI alınıp 8 mL saf sui lave edildi. Kullanma zamanında 8 mL pH=8 tampon çözeltisi ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz enziminin hazırlanması: 1,17 mg (498,3498 U) AChE alınarak 5 mL pH=8 tamponunda çözüldü ve 1'er mL'lik beş kısma ayrıldı. Her biri için 99,66996 U/mL'lik konsantrasyon elde edilmiş oldu ve 1 mL'lik stoklar da 125 µL'lik 8 eşit bölüme ayrıldı (0,09966996 U/µL). 125 µL'lik enzim çözeltisine 460 µL pH=8 tampon çözeltisi eklendi (0,021297 U/µL) . 585 µL çözelti 25 µL'ik 23 tane küçük eppendorf tüplere doldurularak daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 2150 µL'ye tamamlandı ($2,476x10^{-4}$ U/µL).

Butirilkolinesteraz enziminin hazırlanması: 1 mg (11,4 U) BChE alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü (2,28 U/mL). Bu çözeltiden 300 µL'lik stoklar

oluşturulup eppendorf tüplere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi (0,00228 U/µL). Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1850 µL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıldı ($3{,}1813 \times 10^{-4}$ U/µL).

Standart Çözeltilerin Hazırlanması

1000 ppm BHA (2- t-bütil-4-hidroksianisol) çözeltisinin hazırlanması: 10 mg BHA alınıp 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik çözelti ve ayrıca 2500 ppm'lik çözelti hazırlandı.

1000 ppm BHT (2,6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisinin hazırlanması: 10 mg BHT alınıp 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik çözelti ve ayrıca 2500 ppm'lik çözelti hazırlandı.

1000 ppm Kersetin çözeltisinin hazırlanması: 25,8 mg kersetin alınıp 25 mL etil alkolde çözülerek 1000 ppm'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.

100 ppm Pirokatekol çözeltisinin hazırlanması: 10 mg pirokatekol alınıp 100 mL su ile çözülerek 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı.

1000 ppm α-Tokoferol çözeltisinin hazırlanması: %97'lik 10,31 mg α-tokoferol alınıp 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik α-tokoferol çözeltisi ve ayrıca 2500 ppm'lik α-tokoferol çözeltisi de hazırlandı.

2500 ppm Gallik asit çözeltisinin hazırlanması: 25 mg gallik asit alınıp 10 mL etanolde çözülerek 2500 ppm'lik gallik asit çözeltisi hazırlandı.

4000 µM Galantamin çözeltisinin hazırlanması: 2.3 mg galantamin alınıp 2 mL etanolde çözülerek galantamin çözeltisi hazırlandı.

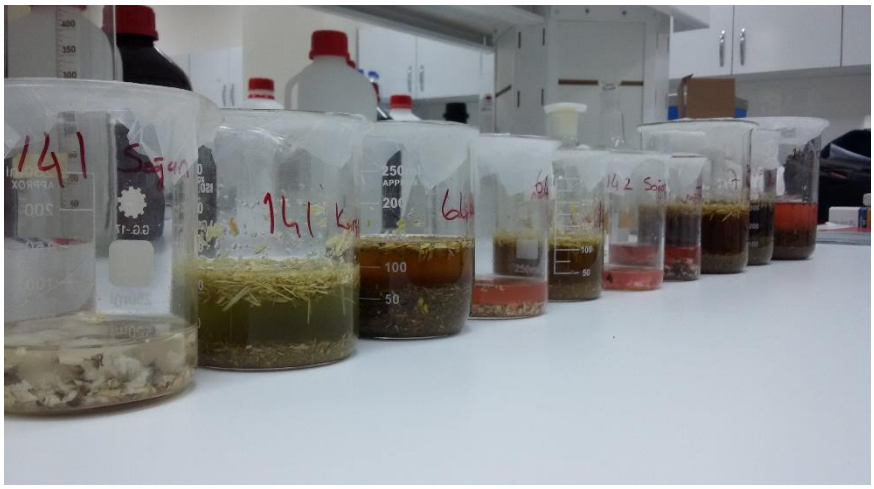
3.3. Kullanılan Cihazlar ve Araçlar

- LC-MS/MS (Shimadzu LC-MS 8040 model)
- ICP-MS
- ELISA Reader
- Rotaevaporator (Büchi, İsviçre)
- Otomatik pipetler (10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL) (Eppendorf, Almanya)
- Hassas terazi (Scaltec SBA 31)

- pH-metre (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri)
- Jeio-Tech ultrasonik banyo (Kore)
- Ultra saf su cihazı (Sartorious, Arium Pro, Almanya)
- Vortex (LMS Co. LTD, Japonya)
- UV Spektrofotometresi (Shimadzu UV-1601, Japonya)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya)
- 1 cm'lik cam küvetler
- Balon jojeler (10, 25, 50, 100, 250 mL)
- Cam ve eppendorf tüpler

3.4. Ekstrelerin Hazırlanışı

Kimyasal ve biyolojik aktivite ölçümleri için toplanan 12 farklı *Allium* türü toprak altı ve toprak üstü kısımlara ayrıldı. Her bir türden 10 gr alınarak etanol (50 mL, 4×24 saat) ile masere edildi. Süzme ve çözücü uçurma işlemlerinden sonra ham ekstreler elde edildi. Bu ekstreler etanolde çözülerek 4000 mg/Lderişiminde 4'er mL çözeltiler hazırlandı ve sonra bu çözeltilerden seyreltilerek 1000 mg/L derişiminde 2'şer mL'lik çözeltiler hazırlandı.



Şekil 3.1. Bitkilerin etanolde çözünmesi



Şekil 3.2. Süzme işlemi



Şekil 3.3. Çözücü uçurma işlemi

3.5. Ekstrelerin % Verimi

Kuru bitki miktarlarından elde edilen kuru etanol ekstrelerinin verimi aşağıdaki denklem ile hesaplandı.

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Kuru ekstre}}{\text{Kuru bitki}} \times 100$$

3.6. ELISA Cihazı ile Aflatoksin İçerik Analizi

ELISA yöntemi bir ön tarama testi olarak kullanıldı. Örnekler R-Biopharm metodu esas alınıp (R-Biopharm 2002; 2006; 2007) 1'er g tartılarak blenderdan geçirildi ve homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler %70 metanol ile ekstre edildi ve Whatman No:4 filtre kağıdından süzüldü. Filtratın 1 mL'si alınıp 1 mL distile su ile seyreltildikten sonra bu çözeltinin 50 µL'si Elisa tarama testi için kullanıldı. Standartlar ve reaktifler kullanılmadan 1 saat önce buzdolabından çıkarılıp, oda sıcaklığında bekletildi ve birkaç defa çalkalandı.

Standart ve örneklerden 50'şer µL Elisa kitlerinin (Şekil 3.4.) ilk striplerinin 8 kuyucuğuna ve ikinci stripin 8 kuyucuğuna koyuldu ve pleyt hafif vurularak karışmaları sağlandı. Konjugat ve antikor 50'şer µL standart ve örneklerin üzerine eklendi. Antikor eklemesi hızlı bir şekilde yapıldı. Her eklemeden sonra pleyt vurularak, eklenen kimyasalların karışması sağlandı. Pleytin üzeri siyah bir kapak ile kapatılarak karanlık bir ortamda toplam aflatoksin için 15 dakika-yarım saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra pleyt boşaltılıp distile su ile 3 kez yıkama yapıldı. Son olarak her bir çukura reaksiyonu durdurmak için 100 µL durdurucu reaktif (%10'luk sülfirik asit) eklendi. Durdurucu reaktif ilavesinden sonra ELISA Reader ile 450 nm'de okuma yapıldı. Sonuçlar RidaWin programı ile değerlendirildi.



Şekil 3.4. Mitotoksin ELISA test kitleri

3.7. ICP-MS Cihazı ile Ağır Metal İçerik Analizi

Allium türlerinin toz haline getirilmesi için Ultra-Turrax ile toz haline getirilen kurumuş bitki kısımları, nem geçirmeyen kilitli naylon poşetlere konularak ve üzerlerine numune numaraları yazılarak muhafaza edildi.

Allium türlerinde ağır metal analizini gerçekleştirmek için kurutulan ve öğütülmüş bitki numunelerinden yaklaşık 0,2 g tartılıp teflon tüplere konuldu. Bu teflon tüplerden biri blank için boş bırakılarak ve diğer tüplere asitlendirme işlemi yapıldı. Numunelerin yanmaması (yani kömürleşmemesi) için 5:3 oranında her bir tüpe ayrı ayrı 5 mL HNO_3 ve 3 mL H_2O_2 konuldu. 200 °C Mikrodalga Fırında (MILESTONE START D) 30 dakika süreyle kapalı sistemde çözünürleştirme yapıldı. Teflon tüplerdeki numuneler cam tüplere alınıp 1 M nitrik asitle 10 mL'ye tamamlandı. Cam tüplerin ağzı kapatılarak ölçüm gününe kadar buzdolabında bekletildi ve analizler ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma (ICP) ve Kütle Spektrometresi (MS)) ile gerçekleştirildi.

3.8. Antioksidan Tayin Metodları

Allium türlerinin antioksidan aktivite tayini etanol ekstrelerinin β-karoten-linoleik asit sistemiyle toplam antioksidan aktivitesi, DPPH serbest radikal giderim, ABTS katyon radikal giderim ve CUPRAC metotları ile belirlendi.

3.8.1. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Metodu

Ekstrelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Sashidhara ve ark., 2011). *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin 10 mg'ı 10 mL etanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL pleyte alınıp hacimleri 40 µL'ye tamamlandı ve 7 mM ABTS katyon radikali çözeltisinden 160 µL eklendi. Çözelti karanlıkta 6 dk bekletildikten sonra 734 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Numunelerin absorbans değerleri kontrol ile kıyaslanarak değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (%inhibisyon) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{kontrol} - A_{numune}) / A_{kontrol} \times 100$$

Her bir numuneden üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak ise BHT, α-Toc ve BHA kullanıldı.

3.8.2. DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Metodu

Ekstrelerin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikali kullanılarak bulundu (Blois 1958). *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin 10 mg'ı 10 mL etanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL pleyte alınıp hacimleri 40 µL'ye tamamlandı ve 0,1 mM DPPH çözeltisinden 160 µL eklendi. Hazırlanan çözeltiler karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Numunelerin absorbans değerleri kontrole karşı hesaplandı. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{kontrol} - A_{numune}) / A_{kontrol} \times 100$$

(A: Absorbans)

Her bir numuneden üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHA, BHT ve α-Toc kullanıldı.

3.8.3. β-Karoten-Linoleik Asit Metodu (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini)

β-Karoten-linoleik asit test metodu, linoleik asit oksidasyonundan oluşan konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesi temeline dayanmaktadır (Amin ve Tan, 2002). *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin 10 mg'ı 10 mL etanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL pleyte alınarak saf su ile hacimleri 40 µL'ye tamamlanarak üzerlerine β-karoten-linoleik asit çözeltisinden her bir numuneye 160 µL ilave edilir edilmez mikroplaka reader ile başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Hazırlanan çözeltiler 50 ^{o}C'de 120 dk bekletildi ve sonra absorbanslar tekrar ölçüldü. β-Karotenin renk açılım sonucu aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$R = \ln (a/b)/t$$

(In: Doğal logaritma, a: Başlangıç absorbansı, b: İnkübasyonundan sonraki absorbans, t:Zaman)

Toplam antioksidan aktivite, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki denklemden hesaplandı.

$$\text{Toplam Antioksidan Aktivite (\%İnhibisyon)} = [(R_{kontrol} - R_{numune}) / R_{kontrol}] \times 100$$

($R_{kontrol}$: Kontrolün renk açılım oranı, R_{numune}: Numunenin renk açılım oranı)

Her bir numuneden üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHA, BHT ve α-Toc kullanıldı.

3.8.4. CUPRAC Metodu

Bu metod, numunelerin antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm'de absorbansı ölçülerek uygulanır. Hazırlanan numunelere ve standartlara son derişimleri 10, 25, 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde Cu (II), neokuproin ve NH_4OAc tamponu ilave edildi. 1 saat sonra 450 nm'de absorbansları ölçüldü (Apak ve ark. 2004). Numunelerin absorbans değerleri standartlara karşı değerlendirildi. Her bir numuneden parelel üç çalışma yapıldı ve standart olarak BHA, BHT ve α-Toc kullanıldı.

3.9. Antikolinesteraz Aktivite Tayin Metodu

Bu metod Ellman metoduna göre uygulandı. Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir metoddur. 96 kuyucuğa sahip mikroplaka pleytte yapıldı.

3.9.1. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE) Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz enziminin kullanıldığı aktivite testinde substrat olarak asetiltiyokoliniyodür kullanıldı. Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun derişimi 412 nm'de mikroplaka reader ile ölçüldü. Pleytlerdeki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), ekstrelerin etanolle 4000 ppm derişiminde hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ilave edildi ve sonra 20 µL enzim çözeltisinden eklendi. Hazırlanan çözelti 10 dk süre ile 25 ºC de inkübe edildi ve 10 dk sonra 20 µL DTNB reaktifi ve subsrat eklendi. Kullanılan standart bileşik ise galantamindir. Hazırlanan pleyt ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki denklem ile hesaplandı. Her bir numuneden paralel üç çalışma yapıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{kontrol} - A_{numune}) / A_{kontrol} \times 100$$

3.9.2. Butirilkolinesteraz Enzimi (BChE) Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz enzim (AChE) aktivite testindeki metot izlendi. Farklı olarak butirilkolinesteraz aktivitesi için enzim olarak butirilkolinesteraz enzimi, substrat ise butiriltiyokolin iyodür kullanıldı. Hesaplamalar aşağıdaki denkleme göre yapıldı. Her numuneden paralel üç çalışma yapıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{kontrol} - A_{numune}) / A_{kontrol} \times 100$$

3.9.3. İstatistik Hesaplamalar

Antikolinesteraz ve antioksidan sonuçları üç parallel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak alındı. Sonuçlar Student's testine göre %95 güven aralıklarında bulundu. Anlamlılık sınırı değeri olarak $p<0,05$ kabul edildi. En küçük kareler metodunun kullanıldığı doğrusal regresyon analizi eğim, intersept ve korelasyon katsayılarının değerlendirilmesi ile yapıldı.

3.10. Sitotoksisite Testleri

Sitotoksisiteyi belirlemek için MTT testi kullanıldı. Bu test hücre proliferasyonunun ölçülmesi için 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tetrazolyumtuzu'nun kullanıldığı hassas bir metoddur. Eğer canlılık %70 in altında hesaplanırsa numune sitotoksik potansiyele sahip demektir.L929 Fibroblast hücreleri ve DLD-1 hücreleri 96 well pleytlere her bir kuyucuğa $1.0x\ 10^4$ hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Numuneler 1 mg/ mL olacak şekilde hazırlandı. UV altında sterilizasyonu yapıldı ve 0,20 µm lik filtreden geçirildi. Hazırlanan ekstrelerden belirlenen 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL hücrelere uygulanarak 24 saat inkübe edildi. Kontrol olarak sadece besi ortamı hücrelere uygulandı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 100 µL besiyeri ve 10 µL MTT çözeltisi ilave edildi. 37 ºC'de 3,5 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 150 µL DMSO eklenerek 15 dakika inkübe edildi. Hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu pleytin absorbans değerleri ELISA pleyt okuyucuda 570 nm'de okutuldu. Kontrol grupları baz alınarak % canlılık aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\text{Canlılık \%} = \frac{100 \times OD_{570e}}{OD_{570b}}$$

OD_{570e}: numunenin optik yoğunluğunun değeri

OD_{570b}: kontrol grubunun optik yoğunluğu

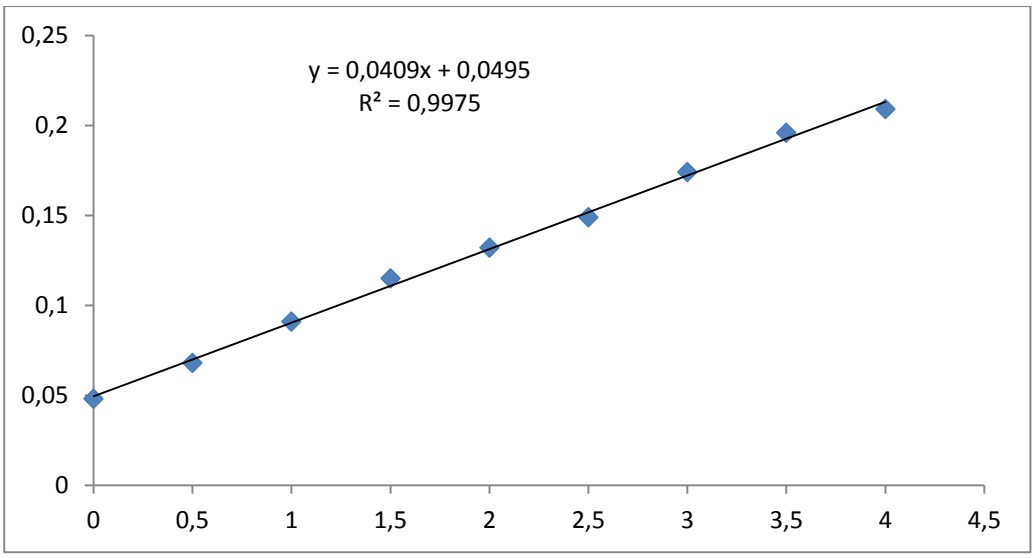
3.11. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi

3.11.1. Toplam Fenolik Miktar Tayin Metodu

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak bulundu (Slinkard ve Singleton 1977). 100 mg/kg'lık pirokatekol çözeltisi hazırlanıp ve bu çözeltiden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri saf su ile 184 µL'ye tamamlandı. *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin 1000 mg/kg derişiminde çözeltileri hazırlandı. 1 mg ekstre içeren numune çözeltilerinden 4 µL alındı, saf su ile 184 µL'ye tamamlandı. Pirokatekol çözeltileri ve numunelere 4 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve 3 dk sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 12 µL eklendi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında bekletildi ve numunelerin absorbansları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden (Şekil 3.5.) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

Ölçüm hatalarını en aza indirgemek için her bir numuneden üç paralel çalışma yapıldı.

$$\text{Absorbans} = 0{,}0409(\mu g) + 0{,}0495 \quad (R^2 = 0{,}9975)$$



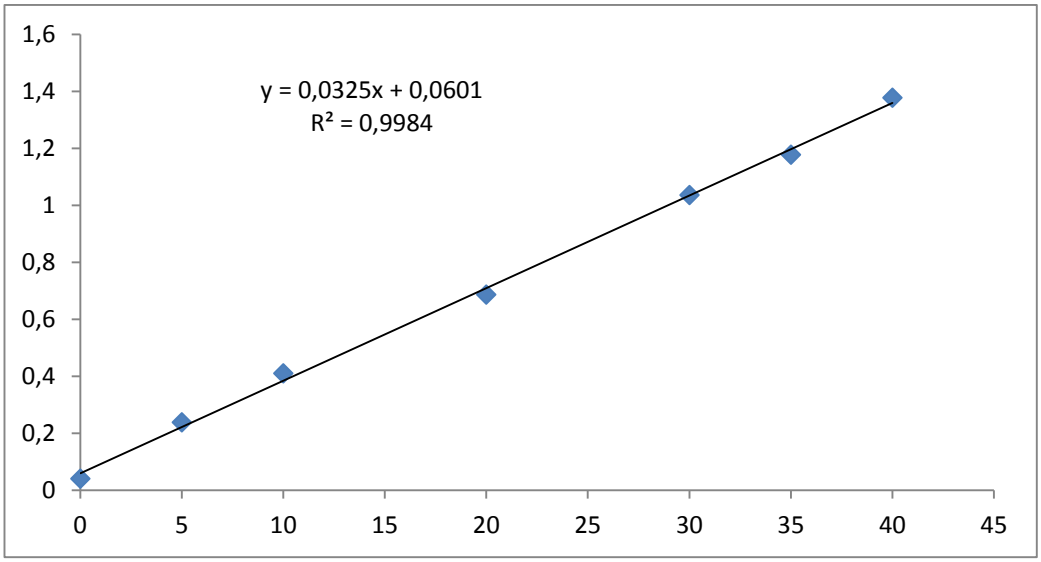
Şekil 3.5. Pirokatekolün ölçü grafiği

3.11.2. Toplam Flavonoid Miktar Tayin Metodu

Hazırlanan ekstrelerin toplam flavonoid içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile bulundu (Moreno ve ark. 2000). Derişimi 1000 mg/kg olan kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 192 µL'ye tamamlandı. 4 µL 1 M potasyum asetat ilave edildi ve bir dakika sonra 4 µL %10'luk alüminyum nitrat eklendi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de mikroplaka reader ile absorbansları okundu. Aynı şekilde *Allium* bitkilerinin etanol ekstrelerinin tek konsantrasyonda (1000 mg/kg) hazırlanan çözeltilerinin de absorbans değerleri okundu. Ekstrelerin toplam flavonoid içerikleri, standart kersetin grafiğinden (Şekil 3.6.) çıkarılan aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

Absorbans = 0,0325(µg) + 0,0601 (R^2 : 0,9984)

Her bir numuneden üç paralel çalışma yapıldı.



Şekil 3.6. Kersetinin ölçü grafiği

3.12. ELISA Reader Cihazı

ELISA Okuyucu cihazın çalışma sistemi fotoelektrik kolorimetredir. İlk olarak, tayin numunesi ve standart sıvı altında absorbanslarını saptamaktadır. Sonra, analizleri ve hesaplamaları yapmaktadır.Son olarak, numune sıvısı içinde tayin edilen madde için değer veya koşulları gösterir. Robot-uyumlu arayüz, cihaz sıcaklık kontrolü ve veri analiz yazılımı içeren mikroplaka spektrofotometre (yol kontrolü sensörlü), görünür bölgede absorbans ölçer. Her kuyucuğun kendi örnek ışını ve referans detektörü bulunmaktadır. Sekiz referans ışını ve sekiz örnek ışınından meydana gelen sekiz kanallı sistem, yüksek kesinliğe ve pleyti hızlı okumaya imkan sağlar. Yazılımı, şifre koruma verisi, dokuz farklı eğri oluşturma yolu ve kendiliğinden veri azaltma veya analiz için harici formüller oluşturma ve aynı zamanda farklı pleytlerden veri analiz etme ve birleştirmeyi sağlamaktadır.

Uygulama Alanları: ELISA/EIA, Stiproliferasyon/Sitotoksisite, Kinetik ELISAs/Enzim Testleri, Pıhtılaşma/Çöktürme, Pıhtı hücresi toplanması, IC 50s/LD 50s, KinetikTurbidimetrik/Mikrobiyal Büyüme, B - galaktozidaz Raportör Geni, Kolorimetrik Protein ve NAD(P)H- kaynaklı test.

3.13. ICP-MS Cihazı

ICP-MS (Inductively Coupled Plasma– Mass Spectrometer), indüktif eşleşmiş plazma (ICP) ve kütle spektrometrisi (MS) şeklinde iki kısımdan oluşmaktadır.

Numunelerin yüksek sıcaklıktaki plazmaya, genel olarak argon gönderilerek moleküler bağların kırıldığı ve atomların iyonlaştırıldığı bir analitik metottur. Numune, genellikle bir solüsyon halinde numune giriş sistemi aracılığıyla nebulizöre ve sprey bölümüne gönderilir. Bu bölümde yüksek hızlı argon akışı ile numune solüsyonu sisleştirilir. Yalnızca çok küçük damlacıklar argon plazmasına taşınır, diğerleri doğrudan atığa geçer. 6000 K sıcaklıklardaki plazma numuneyi buharlaştırır ve iyonize eder. İyon akışı atmosferik basınçtan örnekleyici (sampler) ve süzücü (skimmer) konlar ile yüksek vakumlu ortama geçer. Sonra iyon akımı iyon lensleri ile kuadrupola odaklanarak kütle filtresine yönlendirilir. İyonlar kütle spektrometrede kütle/ yük değerine göre ayrılırlar ve detektör ile ölçülürler.

Agilent 7700x ICP-MS cihazının ana bileşenleri şunlardır:

ORS3 (3.nesil Oktopol Reaksiyon Sistemi) standart olarak He modunda çalışır ve neredeyse her uygulamada reaktif hücre gazı ihtiyacını ortadan kaldırarak metod gelişimini ve rutin analizleri önemli ölçüde basitleştirir.

Helyum modu, kompleks ve farklı numuneler için en güvenilir hücre metodu olarak iyi bir şekilde yapılandırılmıştır ve bilinmeyen ya da farklı numune matrislerinde bile tüm spektral müdahaleleri ortadan kaldırmaktadır.

Yeni iyon lensleri yüksek hassasiyet sağlar ve gelişigüzel arkaplan sinyallerini düşürerek kütle alanında üstün bir dedeksiyon limiti sağlar.

Yeni kullanıcı dostu ICP-MS MassHunter yazılımının tek tuşla plazma kurulumu ve Uzman Otomatik Düzenleme gibi özellikleri rutin optimizasyonu basitleştirir ve böylece eğitim masraflarını azaltarak verimliliği arttırır.

Tek dokunuşla gerçekleşen numune arayüzü erişimi ve dişli arayüz hunilerinin kolay çıkartılıp takılabilmesi rutin bakımı kolaylaştırır.

Güçlü MassHunter yazılım platformu ile geliştirilmiş data analizi ve raporlama imkanı sunar.

7700x'i, kromatografil çiftleme, organik solvent analizi, izotop oranı analizi, yüksek korozif asitler gibi pek çok uygulama için düzenlemeyi sağlayan pek çok seçenek ve aksesuarı mevcuttur.

Kompakt tezgah üstü dizaynı 7700 ‘ı dünyanın en küçük ticari ICP-MS cihazlarından biri yapar ve böylece değerli çalışma ve laboratuvar alanından tasarruf sağlar.

3.14. LC-MS/MS Cihazı

Bitki ekstrelerinin kalitatif ve kantitatif analizinde kullunulan LC-MS/MS cihazının genel sistemi: Shimadzu Neexera model UHPLC cihazı ile Shimadzu LCMS 8040 model üçlü kuadrupol kütle spektrometre cihazının birleşiminden oluşmaktadır. Kullanılan sıvı kromatografi sistemi LC-30 AD model gradient pompa, DGU-20A3R model degazer, SIL-30AC model otoörnekleyici ve CTO-10ASvp model kolon fırınından oluşmaktadır. Kromatografik ayrım, Inertsil ODS-4 model C18 (100 mm×2,1 mm, 2μm) kolonda yapılmıştır. Kolon fırını 35 ºC’a ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyentinde hareketli faz A için ultrasaf su ve hareketli faz B için asetonitril kullanılmıştır. Ek olarak, daha iyi bir kromatografik ayrım ve iyonlaştırmayı kolaylaştırmak için su fazına 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit eklenmiştir. Analitlerin optimum ayrımının gerçekleşmesi için yapılan pek çok denemenin ardından en uygun UHPLC gradiyent profili 5-20% B (0-10 dk), 20% B (10-22 dk), 20-50% B (22-36 dk), 95% B (36-40), 5% B (40-50 dk) şeklinde optimize edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,25 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 4 µL olarak belirlenmiştir.

Üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (MS) hem negatif hem de pozitif modda çalışan bir ESI (elektrosprey iyonlaştırma) kaynağı ile donanımlıdır. LC-ESI-MS/MS verileri cihazda kayıtlı olan by LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonya) yazılımı ile toplanarak işlenmiştir. Analitlerin miktarsal tayini için cihaz ile MRM (multiple reaction monitoring) modunda çalışılmış ve moleküler (parent) iyonlar bir veya iki parçalanma ürünü (product ions) (ilki kantitatif amaçlı diğeri kalitatif amaçlı kullanılmıştır) ile kombine edilmiştir. Kütle spektrometresinde opimize edilen diğer parametreler şunlardır: arayüz (interface) sıcaklığı; 350 ºC, DL sıcaklığı; 250 ºC, heat block sıcaklığı; 400 ºC, nebulizer gaz (N_2) akışı; 3L/dk ve kurutma gazı (N_2) sıcaklığı; 15L/dk.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ekstrelerin % Verim Sonuçları

Elde edilen ekstrelerin %verim hesabı ve ekstrelere verilen kodlar Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir. Genel olarak toprak üstü ekstrelerin verimi toprak altı ekstrelerinden çok daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Ekstrelerin % Verim sonuçları ve *Allium* türlerinin kodlandırılması

Bitki Türü ve Kısmı	% Verim	Kodu[1]
Allium akaka (Van) toprak üstü	11.74	AAVtü
Allium akaka (Hakkâri) toprak üstü	5.98	AAHtü
Allium akaka (Hakkâri) toprak altı	3.67	AAHta
Allium atroviolaceum toprak üstü	10.91	AAtü
Allium atroviolaceum toprak altı	1.76	AAta
Allium chrysantherum toprak üstü	9.05	ACtü
Allium chrysantherum toprak altı	3.29	ACta
Allium kharputense toprak üstü	14.42	AKtü
Allium kharputense toprak altı	4.36	AKta
Allium rhetoreanum toprak üstü	9.97	ARtü
Allium scabriscapum toprak üstü	7.37	AStü
Allium scabriscapum toprak altı	1.66	ASta
Allium schoenoprasum toprak üstü	5.16	AScTü
Allium scorodoprasum subsp. *roturdum* toprak üstü	6.98	ASRtü
Allium scorodoprasum subsp. roturdum toprak altı	4.63	ASRta
Allium shatakiense toprak üstü	7.27	AShtü
Allium shatakiense toprak altı	6.19	AShta
Allium shirnakiense toprak üstü	10.78	ASitü
Allium shirnakiense toprak altı	3.01	ASita

Çizelge 4.1. Devamı. Ekstrelerin % Verim sonuçları ve *Allium* türlerinin kodlandırılması

Allium tripedale toprak üstü	7.87	ATtü
Allium vineale (Van) toprak üstü	10.96	AVtü
Allium vineale (Malatya) toprak üstü	2.04	AVitü
Allium vineale (Malatya) toprak altı	3.1	AVita
Allium ssp. toprak üstü	5.9	Asstü
Allium ssp. toprak altı	2.35	Assta

1: Bitki isimleri sonraki sonuçlarda burdaki kodlandırmaya göre verilmiştir.

4.2. Aflatoksin Sonuçları

Toplam aflatoksin sonuçları µg/kg olarak Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Aflatoksin sonuçları

Numuneler	**Tartılan miktar (g)**	**Toplam Aflatoksin (µg/kg)**
***Allium akaka* (Hakkâri)**	2,08	33,43
***Allium akaka* (Van)**	2,44	13,3
Allium atroviolaceum	1,79	3,54
Allium chrysantherum	1,11	10,11
Allium kharputense	2,48	9,21
Allium rhetoreanum	1,11	10,11
Allium scabriscapum	3,02	16,85
Allium schoenoprasum	1,21	31,02
Allium scorodoprasum* subsp. *roturdum	1,41	15,24
Allium shatakiense	1,74	8,18
Allium shirnakiense	1,65	10,62
Allium tripedale	1,71	9,27
***Allium vineale* (Malatya)**	1,22	10,78
***Allium vineale* (Van)**	1	3,51
Allium ssp.	2,04	11,07

Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ'de yayınlanan verilerde gıda maddelerindeki toplam aflatoksin limitinin maksimum olması gereken değer 10 µg/kg olarak verilmiştir. İncelenen türlerin toplam aflatoksin değerlerinin genellikle orta düzeyde olduğu görülmektedir. *Allium akaka* (Hakkâri) türünde toplam aflatoksin değerinin en yüksek (33,43 µg/kg) olduğu belirlenmiştir. *Allium vineale* (Van) türünde toplam aflatoksin miktarının en az (3,51 µg/kg) olduğu belirlenmiştir. Genel olarak incelenen dört türün 10 µg/kg'dan düşük olduğu diğer türlerin ise yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.3. ICP-MS Ağır Metal Sonuçları

Ağır metal analiz sonuçları µg/kg olarak Çizelge 4.3. ve 4.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Ağır metal analiz sonuçları

Bitki türü	^{51}V (µg/kg)	^{59}Co (µg/kg)	^{60}Ni (µg/kg)	^{63}Cu (µg/kg)	^{66}Zn (µg/kg)
AAHtü	77±1	37,00±0,39	340±1	1642±1	3734±1
AAHta	123±1	87±1	899±3	2940±3	13422±2
AAVtü	1405±5	291±6	1904±5	7601±4	20793±4
AAtü	949±4	189±4	1019±5	5989±5	30091±5
AAta	305±12	50,00±0,14	386±4	5968±10	26656±12
ACtü	2444±2	488±1	2507±1	4166±1	64639±1
ACta	162±13	58±1	575±7	2676±26	27276±26
AKtü	2333±4	575±4	3626±5	4001±5	18003±4
AKta	6790±8	1482±8	6934±8	5984±8	16885±8
ARtü	684±1	151±1	1128±1	2970±1	12386±1
AStü	944±4	217±4	903±2	3175±2	9703±2
ASta	4359±2	847±1	2702±1	3975±1	10178±1
ASctü	1854±5	892±5	14114±9	3327±6	4787±1
ASRtü	302±3	70,00±0,53	767±3	3740±2	8922±2
ASRta	947±2	230±1	1227±2	3109±1	4225±2
AShtü	811±3	175±1	1306±4	3568±4	9241±1
AShta	381±3	107±1	977±7	5639±2	10654±2
ASitü	2592±4	603±3	3582±4	6316±4	20071±4
ASita	1277±3	288±4	1977±3	3102±5	10575±3
ATtü	637±1	135±1	1285±1	3153±1	14292±1
AVtü	479±3	114±1	1581±4	8686±4	18447±1
AVitü	1287±2	477±1	3626±1	263918±1	14992±2
AVita	627±1	231±1	2021±2	4816±2	14341±1
Asstü	3400±6	853±6	2513±6	4563±6	8486±6
Assta	1433±8	515±6	1977±8	2966±7	10605±7

Çizelge 4.4. Ağır metal analiz sonuçları

Bitki türü	^{75}As (µg/kg)	^{107}Ag (µg/kg)	^{111}Cd (µg/kg)	^{205}Tl (µg/kg)	^{208}Pb (µg/kg)
AAHtü	13,00±0,01	7,00±0,01	17,00±0,02	2,00±0,001	132±1
AAHta	27,00±0,21	11,00±0,12	49,00±0,37	5,00±0,003	80±1
AAVtü	209±2	1649±4	184±1	15,00±0,12	799±4
AAtü	214±2	127±1	84±1	13,00±0,09	1028±4
AAta	58±1	76±1	43,00±0,37	2,00±0,01	131±1
ACtü	921±1	266±2	1552±3	294±2	13292±2
ACta	73±1	111±2	703±7	71±1	1736±15
AKtü	225±2	119±1	59,00±0,51	15,00±0,13	493±4
AKta	842±8	183±1	200±2	50,00±0,35	1911±16
ARtü	89±1	13,00±0,11	378±3	7,00±0,05	416±1
AStü	101±2	55,00±0,51	43,00±0,35	10,00±0,10	282±2
ASta	325±3	117±1	59,00±0,42	24,00±0,17	867±3
ASctü	222±2	13,00±0,12	102±1	26,00±2,13	542±4
ASRtü	57±1	21,00±0,15	138±1	5,00±0,003	478±
ASRta	167±1	14,00±0,11	174±1	7,00±0,004	626±1
AShtü	238±2	9,00±0,07	88±1	11,00±0,07	479±1
AShta	107±1	10,00±0,11	46,00±0,21	5,00±0,003	317±1
ASitü	319±4	501±5	181±2	26,00±0,12	1373±5
ASita	162±3	221±3	88±2	15,00±0,03	813±3
ATtü	97±1	14,00±0,13	368±3	7,00±0,05	303±1
AVtü	52±1	17,00±0,11	106±1	25,00±0,17	668±1
AVitü	181±1	292±1,14	102±1	25,00±0,21	26716±1
AVita	63,00±0,13	10,00±0,07	63,00±0,45	12,00±0,08	344±1
Asstü	170±4	167±12,34	71,00±5,92	16,00±0,32	384±12
Assta	54,00±2,01	64,00±3,21	59,00±3,23	5,00±0,01	80±2

Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı ve Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ'de verilen ağır metallerin yenilen bitkilerdeki maksimum limitler şöyledir: Kurşun (Pb):300 µg/kg, Kadmiyum (Cd):50 µg/kg, Arsenik (Ar):200 µg/kg, Bakır (Cu):400 µg/kg. En yüksek Pb bulunduran ACtü (13292±2 µg/kg) türü olduğu belirlenmiştir. En düşük Pb bulunduran ise AAHta ve Assta (80±2) türleridir. En yüksek Cd bulunduran ACtü (1552±3) türü olduğu belirlenmiştir. En düşük Cd bulunduran ise AAHtü (17,00±0,02) türüdür. En yüksek As bulunduran ACtü (921±1) türüdür. En düşük As bulunduran ise AAHtü (13,00±0,01) türüdür. En yüksek Cu bulunduran AVtü (8686±4) türüdür. En düşük Cu bulunduran türün ise AAHtü (1642±1) olduğu belirlenmiştir.

4.4. Antioksidan Aktivite Sonuçları

Allium cinsinin farklı türlerinin toprak altı ve toprak üstü ekstrelerinin antioksidan aktivite sonuçları dört metod kullanılarak belirlendi. Bu metodlar: β-karoten renk açılımı, ABTS katyon radikali giderim aktivitesi, DPPH serbest radikali giderim aktivitesi ve CUPRAC metodudur. Bu metodlarda standart olarak α-TOC, BHA ve BHT kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.'de verilmiştir. CUPRAC sonuçları ise absorbans olarak verilmiştir. Genel olarak çalışılan *Allium* türlerinin antioksidan kapasitelerinin kullanılan dört yönteme göre düşük veya orta derecede olduğu tespit edilmiştir. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi metodunda en yüksek aktiviteyi *A. akaka* (IC_{50}: 302,20±14,72) türünün toprak altı ve β-karoten renk açılımı metodunda ise bu türün toprak üstü kısmının (IC_{50} 186,3±6,7) en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemine göre ise çalışılan türlerin çoğunun orta derecede aktif olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntemde en yüksek aktiviteyi *A. scabriscapum türü* (IC_{50}: 79,03± 0,84) ve *A. akaka* türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarının gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Ekstrelerin β-Karoten, DPPH ve ABTS yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri IC_{50} Sonuçları[1]

Bitki türü	β-Karoten-linoleik asit	DPPH Serbest Radikal	ABTS Katyon Radikal
AAHtü	**186,33±6,70**	420,26±7,65	**83,55± 1,39**
AAHta	246,12± 9,83	**302,20±14,72**	**80,81± 2,18**
AAVtü	914,01±11,4	648,74±15,44	145,37± 1,29
AAtü	≥1000	685,13±5,64	128,44± 0,54
AAta	438,35±12,33	786,54±13,87	108,64± 1,25
ACtü	678,90±4,68	591,41±19,50	209,06± 2,01
ACta	548,30±20,08	573,58±12,69	551,38± 14,34
AKtü	625,29±10,38	726,14± 21,79	260,15±10,84
AKta	≥1000	≥1000	253,06±3,71
ARtü	224,26±4,85	528,44±14,35	384,46±42,34
AStü	733,99± 14,69	516,24±17,78	115,90± 0,71
ASta	426,45± 16,14	470,93±11,36	**79,03± 0,84**
ASctü	149,52±9,40	650,70±17,08	118,40± 2,62
ASRtü	211,30± 2,73	≥1000	285,31± 3,70
ASRta	221,72± 2,34	728,73±13,41	131,55± 0,83
AShtü	231,07±0,20	757,55±11,69	394,31±11,21
AShta	180,22± 1,47	462,86±16,53	156,40± 2,77
ASitü	152,03±3,17	525,81±14,28	173,52± 0,00
ASita	173,58±5,41	688,23±18,28	265,08± 11,47
ATtü	637,03±14,59	≥1000	215,28± 4,65

Çizelge 4.5. Devamı. Ekstrelerin β-Karoten, DPPH ve ABTS yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri IC_{50} Sonuçları[1]

AVtü	226,84± 6,20	910,62±14,54	218,18± 2,42
AVitü	364,08±17,06	518,13±13,96	162,90± 0,57
AVita	197,86± 17,17	369,07±4,61	**91,02± 0,83**
Asstü	452,16±10,14	≥1000	141,60± 1,13
Assta	≥1000	611,68±20,53	112,58±1,38
BHA	1,5±0,01	7,88±0,20	17,59±0,10
BHT	1,3±0,03	58,86±0,50	12,29±0,67
α-TOC	2,1±0,10	16,30±0,79	9,88±0,23

1:Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak hesaplanmıştır.

CUPRAC antioksidan tayin metodu dört derişimde (10, 25, 50, 100 µg/mL) yapıldı. Bu metoda göre antioksidan aktivite değerleri düşük olduğu belirlenmiştir. CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktivite sonuçları Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Bitki ekstrelerinin CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri[1]

Eksrteler	**10 µg/mL**	**25 µg/mL**	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**
AAHtü	0,115±0,008	0,168±0,004	0,267±0,007	0,456±0,033
AAHta	0,119±0,004	0,174±0,006	0,282±0,014	0,457±0,015
AAVtü	0,136±0,009	0,211±0,023	0,348±0,022	0,545±0,031
AAtü	0,103±0,007	0,138±0,018	0,234±0,006	0,4±0,04
AAta	0,096±0,003	0,13±0,003	0,191±0,002	0,319±0,014
ACtü	0,098±0,001	0,129±0,009	0,195±0,015	0,283±0,016
ACta	0,089±0,002	0,112±0,006	0,169±0,006	0,246±0,018
AKtü	0,108±0,004	0,157±0,006	0,226±0,011	0,357±0,028
AKta	0,088±0,007	0,106±0,001	0,143±0,006	0,2±0,007
ARtü	0,11±0,004	0,163±0,006	0,338±0,167	0,376±0,018
AStü	0,115±0,003	0,174±0,008	0,286±0,012	0,45±0,019
ASta	0,162±0,06	0,19±0,003	0,332±0,024	0,511±0,025
AScstü	0,132±0,011	0,199±0,01	0,316±0,013	0,545±0,017
ASRtü	0,1±0,004	0,13±0,004	0,173±0,009	0,266±0,004
ASRta	0,103±0,006	0,143±0,007	0,207±0,011	0,3±0,007
AShtü	0,094±0,001	0,121±0,004	0,17±0,011	0,24±0,009
AShta	0,088±0,005	0,118±0,005	0,157±0,003	0,229±0,01
ASitü	0,096±0,001	0,131±0,003	0,188±0,005	0,278±0,03
ASita	0,081±0,004	0,093±0,006	0,117±0,004	0,159±0,006

Çizelge 4.6. Devamı. Bitki ekstrelerinin CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri[a]

ATtü	0,106±0,002	0,136±0,003	0,297±0,159	0,321±0,004
AVtü	0,109±0,006	0,137±0,002	0,210±0,04	0,321±0,025
AVitü	0,122±0,006	0,157±0,006	0,258±0,003	0,409±0,017
AVita	0,242±0,209	0,171±0,021	0,268±0,033	0,446±0,065
Asstü	0,096±0,009	0,149±0,004	0,229±0,004	0,349±0,011
Assta	0,161±0,032	0,168±0,011	0,245±0,015	0,342±0,017
BHA	**0,205±0,014**	**0,365±0,027**	**0,616±0,029**	**1,171±0,110**
BHT	**0,491±0,065**	**1,117±0,098**	**1,887±0,045**	**3,637±0,184**

1: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak hesaplanmıştır.

4.5. Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Antikolinesteraz aktivite sonuçlarına göre (Çizelge 4.7.) test edilen ekstrelerin asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir. Butirilkolinesteraz enzim inhibisyonunda ise en yüksek aktivite gösteren *A. kharputense* (% İnhibisyon: 16,67±1,01) türünün toprak üstü kısmı olduğu belirlenmiştir. Bitki türlerinin butirilkolinesteraz enzim inhibisyon test sonuçlarında toprak üstü kısımların daha aktif olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7. Bitki ekstrelerinin antikolinesteraz aktivite sonuçları[1]

Ekstreler	AChE(%İnhibisyon)	BChE (%İnhibisyon)
AAHtü	A.D.	AD
AAHta	A.D.	16,67±1,01
AAVtü	A.D.	A.D.
AAtü	A.D.	A.D.
AAta	A.D.	A.D.
ACtü	A.D.	A.D.
ACta	A.D.	12,33±0,66
AKtü	A.D.	A.D.
AKta	A.D.	A.D.
ARtü	A.D.	A.D.
AStü	A.D.	A.D.
ASta	A.D.	A.D.
ASctü	A.D.	15,42±1,86
ASRtü	A.D.	5,00±0,18
ASRta	A.D.	A.D.
AShtü	A.D.	5,30±0,08
AShta	A.D.	A.D.

Çizelge 4.7. Devamı. Bitki ekstrelerinin antikolinesteraz aktivite sonuçları[1]

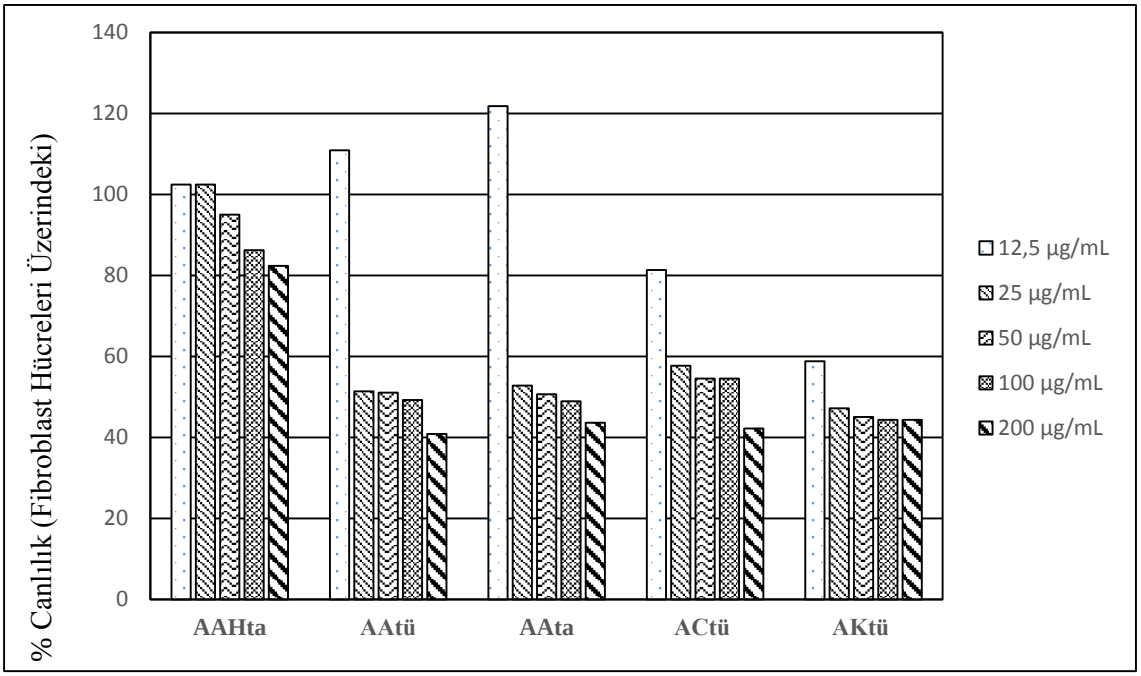
ASitü	A.D.	3,62±0,17
ASita	A.D.	A.D.
ATtü	A.D.	9,30±0,73
AVtü	A.D.	A.D.
AVitü	A.D.	A.D.
AVita	A.D.	A.D.
Asstü	A.D.	19,90 ± 1,95
Assta	A.D.	A.D.
Galantamin[2]	76,08 ± 0,39	76,52 ± 0,41

1: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (200 µg/mL).

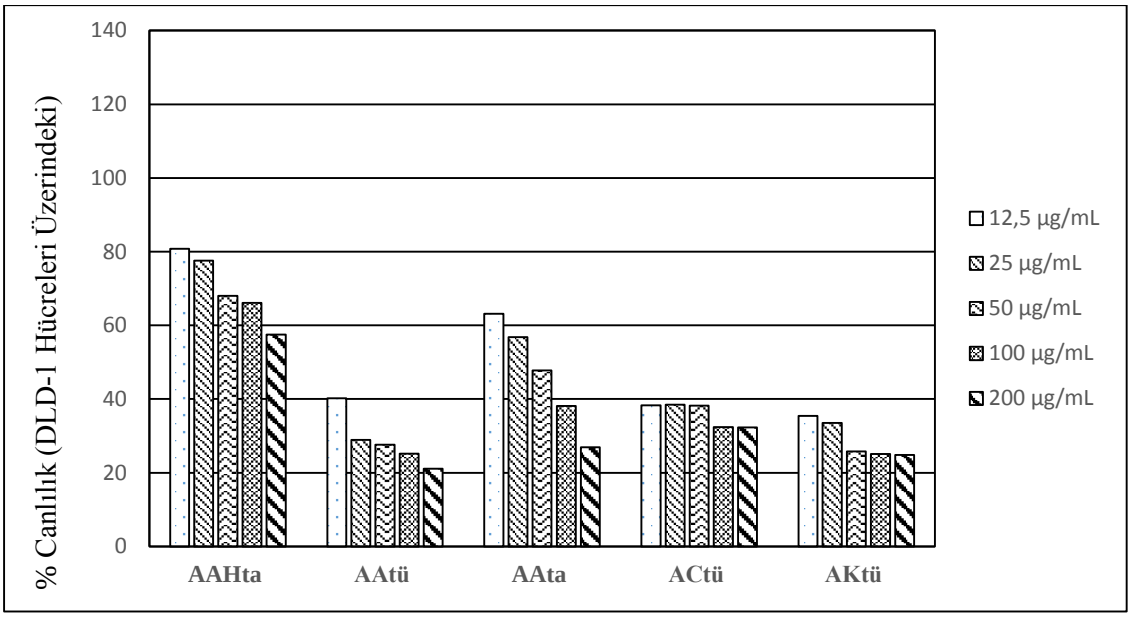
2: Standart madde, A.D.: Aktif değil

4.6. Sitotoksisite Sonuçları

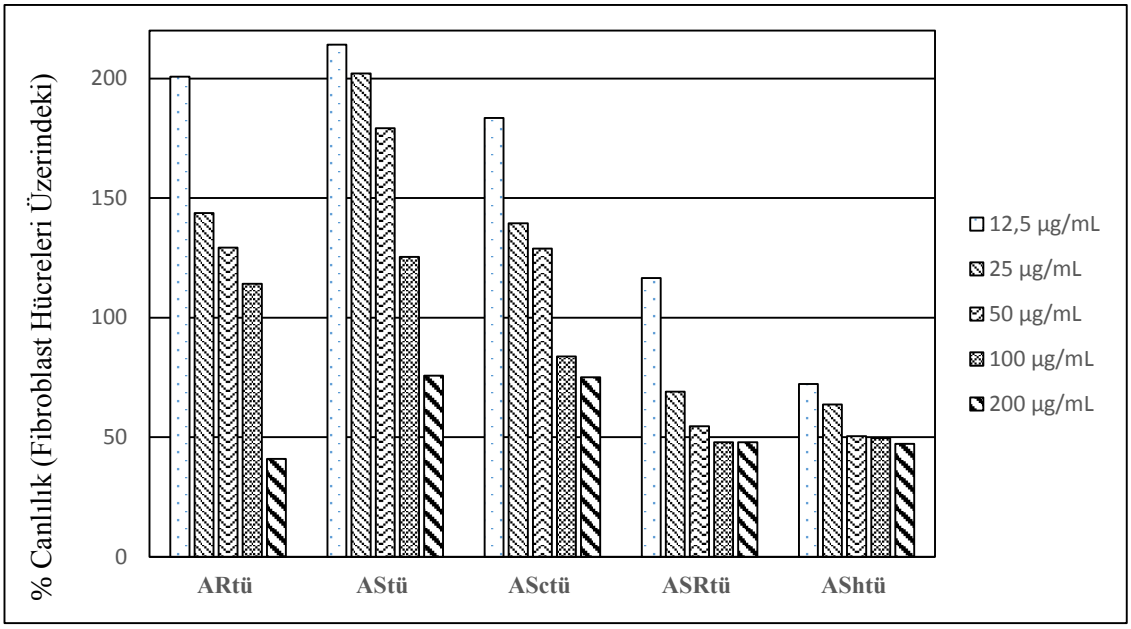
Sitotoksisite sonuçları Şekil 4.1. – 4.6.'da verilmiştir. Genel olarak çalışılan *Allium* türlerinin antioksidan aktivitelerinin aksine sitotoksik aktivitelerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle AAtü ekstresinin (Şekil 4.1. ve 4.2.) fibroblast canlı hücre çeşidi üzerinde 12,5 µg/mL konsantrasyonda hiç toksik etki (canlılık %110,92) göstermemesine rağmen aynı konsantrasyonda DLD-1 (kolon kanser hücresi) hücrelerinin üzerinde yüksek toksik etki (canlılık %40,18) gösterdiği belirlenmiştir. Aynı şekilde ACtü ve AVitü ekstrelerinin 12,5 µg/mL konsantrasyonda canlı hücre üzerinde düşük toksik etki gösterirken kanserli hücre üzerinde yüksek toksik etki göstermiştir.



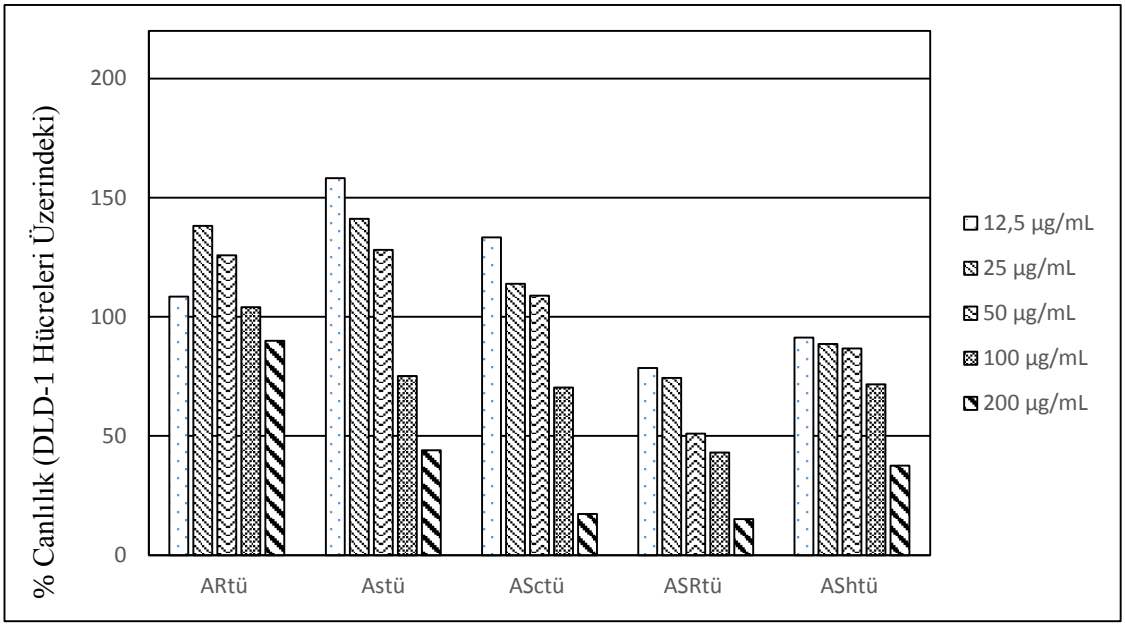
Şekil 4.1. AAHta, AAtü, AAta, ACtü, AKtü türlerinin canlı hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları



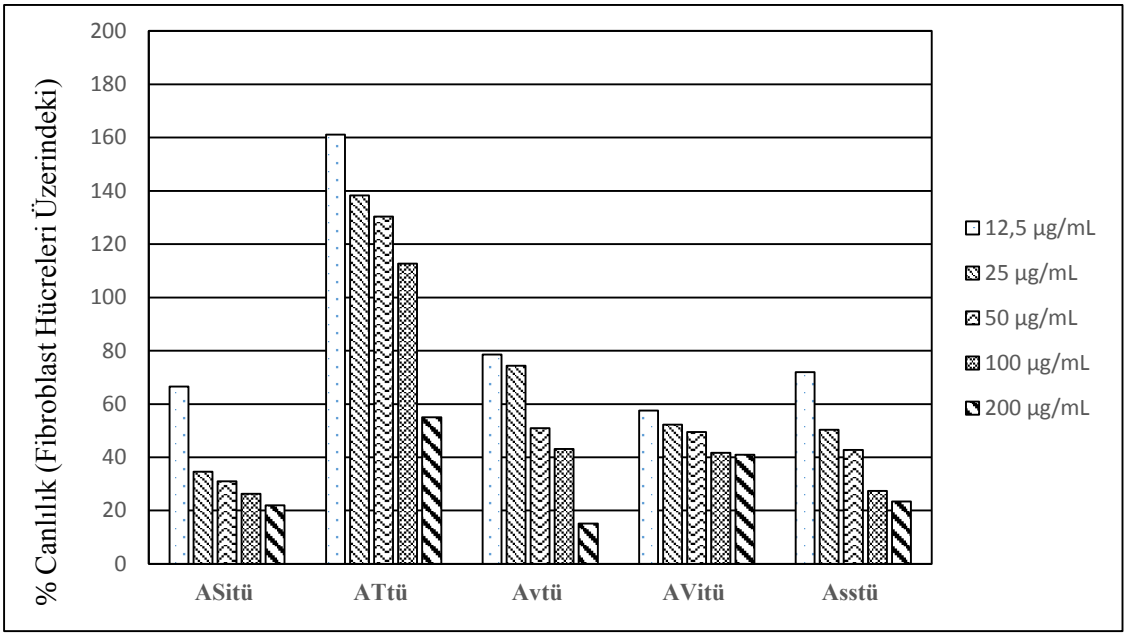
Şekil 4.2. AAHta, AAtü, AAta, ACtü, AKtü türlerinin kanserli hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları



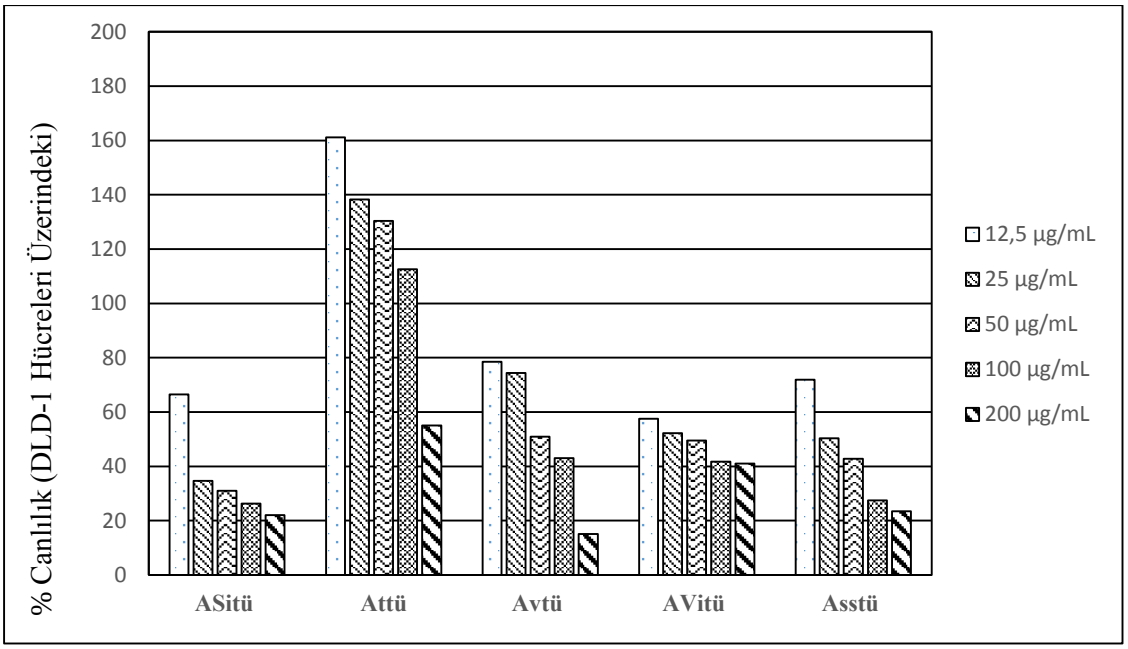
Şekil 4.3. ARtü, AStü, ASctü, ASRtü, AShtü türlerinin canlı hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları



Şekil 4.4. ARtü, Astü, ASctü, ASRtü, AShtü türlerinin kanserli hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları



Şekil 4.5. ASitü, ATtü, Avtü, AVitü, Asstü türlerinin canlı hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları



Şekil 4.6. ASitü, ATtü, Avtü, AVitü, Asstü türlerinin kanserli hücredeki sitotoksik aktivite sonuçları

4.7. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktar Tayin Sonuçları

Çalışılan *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarlarının tayini pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik ve falvonoid miktarları Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. *Allium* türlerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri[1]

Ekstreler	Toplam Fenolik (µg pirokatekole eşdeğer)/mg Ekstre[2]	Toplam Flavonoid (µg kersetine eşdeğer)/mg Ekstre[3]
AAHtü	79,37 ± 1,78	15,04 ± 0,37
AAHta	89,73 ± 1,97	19,13 ± 0,59
AAVtü	85,19 ± 1,81	17,15 ± 0,33
AAtü	107,43 ± 1,50	11,31 ± 0,03
AAta	89,75 ± 1,37	10,13 ± 0,01
ACtü	75,25 ± 1,00	12,16 ± 0,08
ACta	62,05 ± 1,15	11,03 ± 0,09
AKtü	61,63 ± 1,25	13,62 ± 0,34
AKta	54,21 ± 1,75	10,99 ± 0,03
ARtü	67,82 ± 1,29	14,09 ± 0,17
AStü	63,70 ± 1,43	14,54 ± 0,27
ASta	70,30 ± 0,95	12,00 ± 0,87
AScTü	69,52 ± 1,38	15,11 ± 0,33
ASRtü	58,75 ± 0,86	12,37 ± 0,87
ASRta	68,65 ± 1,43	11,06 ± 0,22
AShtü	51,32 ± 0,86	12,16 ± 0,31
AShta	57,10 ± 1,43	11,34 ± 0,14
ASitü	56,68 ± 0,75	12,64 ± 0,28
ASita	49,67 ± 1,43	11,10 ± 0,17
ATtü	57,92 ± 1,00	13,10 ± 0,03
AVtü	71,12 ± 0,86	11,32 ± 0,60
AVitü	75,58 ± 0,75	12,56 ± 0,13
AVita	68,19 ± 0,76	10,15 ± 0,16
Asstü	61,51 ± 0,57	11,13 ± 0,17
Assta	57,73 ± 0,39	10,11 ± 0,21

1: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.
2: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik. ($y=0,0409x+0,0495$ $R^2 = 0,9975$)
3: Kersetine eşdeğer flavonoit içerik. ($y=0,0325x+0,0601$ $R^2 = 0,9984$)

İncelenen türler arasında toplam fenolik miktarının en yüksek olan ekstrenin AAtü (107,43 ± 1,50 µg pirokatekole eşdeğer/mg ekstre) olduğu belirlenmiştir. ASita ekstresinin ise toplam fenolik miktarının (49,67 ± 1,43 µg pirokatekole eşdeğer/mg ekstre) en az olduğu görülmektedir. Toplam flavonoid miktarının (19,13 ± 0,59 µg kersetine eşdeğer/mg ekstre) en fazla olduğu tür ise AAHta olduğu belirlenmiştir. Toplam flavonoid miktarının en az olduğu tür ise AAta olduğu belirlenmiştir. Ekstrelerin geneline bakıldığında toprak üstü kısımların fenolik ve flavonoid miktarlarının daha fazla olduğu görülmektedir. Genel olarak bitki türlerinin hepsinde fenolik içeriğin flavonoid içerikten daha fazla bulunduğu görülmektedir.

4.8. LC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerinin Belirlenmesi ve Kantitatif Analizi

Allium türlerinin etanol ekstrelerinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarının fenolik profilleri LC-MS/MS cihazı ile belirlendi. LC-MS/MS çalışmasında 27 fitokimyasal standart bileşiğin analizi yapıldı. Bu çalışmada kullanılan kimyasallar şunlardır:

- Fenolik asitler: Gallik asit, p-kumarik asit, salisilik asit, kafeik asit, 4-hidroksi benzoik asit, rozmarinik asit, klorojenik asit, protokateşik asit
- Flavonoitler: Kesretin, naringenin, fisetin, hesperetin, rutin, kamferol, luteolin, mirisetin, apigenin, hespererin
- Fenolik olmayan organik asitler: Kinik asit, malik asit
- Fenolik aldehit: Vanilin
- Benzopiran: Kumarin

LC-MS/MS analiz metodunda kullanılan analitik parametler Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler ([a]RT: Alıkonma zamanı, [b]Ana iyon(*m/z):*Standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), [c]R^2: Belirleme katsayısı, [d]RSD: Bağıl standart sapma, [e]LOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayin sınırı, [f] U (%): 95% güven seviyesinde bağıl standart belirsizlik (k=2)

No	Analitler	RT[a]	Ana İyon (m/z)[b]	İyon Modu	R^{2c}	RSD%[d]
1	Kinik asit	3.32	190.95	Neg	0.9927	0.0388
2	Malik asit	3.54	133.05	Neg	0.9975	0.1214
3	Tr-Asonitik asit	4.13	172.85	Neg	0.9933	0.3908
4	Gallik asit	4.29	169.05	Neg	0.9901	0.4734
5	Klorojenik asit	5.43	353	Neg	0.9932	0.1882
6	Protokateşik asit	5.63	152.95	Neg	0.9991	0.5958
7	Tannik asit	6.46	182.95	Neg	0.9955	0.9075
8	Tr-Kafeik asit	7.37	178.95	Neg	0.9942	1.0080
9	Vanilin	8.77	151.05	Neg	0.9995	0.4094
10	p-Kumarik asit	9.53	162.95	Neg	0.9909	1.1358
11	Rozmarinik asit	9.57	358.9	Neg	0.9992	0.5220

Çizelge 4.9. Devamı. LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler

12	Rutin	10.18	609.1	Neg	0.9971	0.8146
13	Hesperidin	9.69	611.1	Poz	0.9973	0.1363
14	Hiperosid	10.43	463.1	Neg	0.9549	0.2135
15	4-OH-benzoik asit	11.72	136.95	Neg	0.9925	1.4013
16	Sinapinik asit	11.72	136.95	Neg	0.9904	0.6619
17	Mirisetin	11.94	317	Neg	0.9991	2.8247
18	Fisetin	12.61	151,00	Neg	0.9988	2.4262
19	Kumarin	12.52	146.95	Poz	0.9924	0.4203
20	Kersetin	14.48	300.9	Neg	0.9995	4.3149
21	Naringenin	14.66	270.95	Neg	0.9956	2.0200
22	Hesperetin	15.29	300.95	Neg	0.9961	1.0164
23	Luteolin	15.43	284.95	Neg	0.9992	3.9487
24	Kamferol	15.43	284.95	Neg	0.9917	0.5885
25	Apigenin	17,31	268.95	Neg	0.9954	0.6782
26	Ramnetin	18.94	314.95	Neg	0.9994	2.5678
27	Krisin	21.18	253	Neg	0.9965	1.5530

Çizelge 4.9. Devamı. LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler ([a]RT: Alıkonma zamanı, [b]Ana iyon(*m/z):*Standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), [c]R^2: Belirleme katsayısı, [d]RSD: Bağıl standart sapma, [e]LOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayin sınırı, [f] U (%): 95% güven seviyesinde bağıl standart belirsizlik (k=2)

No	Analitler	Lineerite Aralığı (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L)[e]	Geri Kazanım (%)	U[f]
1	Kinik asit	250-10000	22.3 / 74.5	103.3	4.8
2	Malik asit	250-10000	19.2 / 64.1	101.4	5.3
3	Tr-Asonitik asit	250-10000	15.6 / 51.9	102.8	4.9
4	Gallik asit	25-1000	4.8 / 15.9	102.3	5.1
5	Klorojenik asit	250-10000	7.3 / 24.3	99.7	4.9
6	Protokateşik asit	100-4000	25.8 / 85.9	100.2	5.1
7	Tannik asit	100-4000	10.2 / 34.2	97.8	5.1
8	Tr-Kafeik asit	25-1000	4.4 / 14.7	98.6	5.2
9	Vanilin	250-10000	10.1 / 33.7	99.2	4.9
10	p-Kumarik asit	100-4000	15.2 / 50.8	98.4	5.1
11	Rozmarinik asit	250-10000	10.4 / 34.8	101.7	4.9
12	Rutin	250-10000	17.0 / 56.6	102.2	5.0
13	Hesperidin	250-10000	21.6 / 71.9	100.2	4.9
14	Hiperosid	100-4000	12.4 / 41.4	98.5	4.9
15	4-OH-benzoik asit	25-1000	3.0 / 10.0	106.2	5.2
16	Sinapinik asit	25-1000	4 / 13.3	106.2	5.0
17	Mirisetin	100-4000	9.9 / 32.9	106.0	5.9
18	Fisetin	100-4000	10.7 / 35.6	96.9	5.5
19	Kumarin	100-4000	9.1 / 30.4	104.4	4.9
20	Kersetin	100-4000	9.1 / 30.4	104.4	4.9
21	Naringenin	25-1000	2.0 / 6.8	98.9	7.1
22	Hesperetin	25-1000	2.6 / 8.8	97.0	5.5
23	Luteolin	25-1000	3.3/ 11.0	102.4	5.3
24	Kamferol	25-1000	5.8 / 19.4	105.4	6.9
25	Apigenin	25-1000	2.0 / 6.6	99.1	5.2
26	Ramnetin	25-1000	0.1 / 0.3	98.9	5.3
27	Krisin	25-1000	0.2 / 0.7	100.8	6.1

4.8.1. LC-MS/MS ile Çalışılan *Allium* Türlerindeki Fitokimyasallların Kantitatif Analizi

Allium türlerinin fitokimyasal madde içerikleri kantitatif olarak LC-MS/MS cihazında belirlendi. İncelenen bitki türlerinin etanol ekstreleri analiz edildi. Sonuçlar, Çizelge 4.10.- 4.13.'de gösterilmiştir. Genel olarak çalışılan *Allium* türlerinin daha önce grubumuz tarafından yapılan ve 27 bileşen içeren metoda göre fenolik içerik bakımından fakir oldukları tespit edilmiştir. Bitki türlerinin bazılarının fenolik ve flavonoid bileşiklerinin zengin, bazı türlerinin ise fakir olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile kantitatif analizi (Fitokimyasallar analitik parametreler çizelgesindeki numaralar ile yazılmıştır: 1: Kinik asit, 2: Malik asit, 3: Tr-Asonitik asit, 4: Gallik asit, 5: Klorojenik asit, 6: Protokateşik asit, 7: Tannik asit, 8: Tr-Kafeik asit, 9: Vanilin, 10: p-Kumarik asit)

	Konsantrasyon (µg analit/g ekstre)									
Ekstreler	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
AAHtü	10.43	88.19	6.69	-	-	5.68	-	-	10.66	78.0
AAHta	13	144.71	-	-	-	-	-	251.02	344.86	158.12
AAVtü	75.49	441.2	4.51	-	-	104.41	-	13.08	24.83	151.81
AAtü	43.43	611.31	-	-	-	40.72	-	14.61	61	247.90
AAta	-	1980.31	-	-	-	110.99	-	138.75	183.34	124.88
ACtü	691.42	726.95	4.2	5.19	28.13	87.47	-	8.35	11.47	68.53
ACta	396.29	889.21	9.22	-	-	7.33	-	25.06	348.61	42.14
AKtü	38.72	283.8	5.45	-	-	45.02	-	-	11.39	67.39
AKta	8.91	60.94	11.21	-	-	-	-	59.63	172.58	40.08
ARtü	12.14	235.8	5.22	-	-	21.36	-	-	14.83	351.76
AStü	144.93	339.31	11.44	-	-	15.2	-	-	-	235.58
ASta	132.76	171.24	-	-	-	6.36	-	42.35	465.91	53.70
AScтü	257.26	1138.65	11.95	-	54.18	6.67	-	-	10.59	330.54
ASRtü	32.36	787.6	19.25	-	-	-	-	-	22.92	263.61
ASRta	29.76	787.56	-	-	-	-	-	296.76	678.21	741.13
AShtü	18.88	302.36	22.62	-	-	9.78	-	-	-	106.77
AShta	27.32	292.66	4.92	-	-	-	-	104.54	184.46	200.97
ASitü	262.5	771.89	7.4	-	-	25.45	-	-	-	130.70
ASita	14.47	66.24	4.62	-	-	-	-	52.32	110.74	69.13
ATtü	10.57	618.51	4.31	-	-	-	-	-	10.34	961.07
AVtü	52.36	457.6	-	-	-	5.98	-	-	13.49	512.21
AVitü	47.56	3358.81	-	-	-	13.58	-	9.01	20.82	225.12
AVita	24.79	3304.12	7.44	-	-	6.01	-	372.1	334.45	166.16
Asstü	13.09	-	10.68	-	-	23.84	-	-	13.6	25.95
Assta	18.93	588.76	12.09	-	-	-	-	41.03	1112.57	69.46

Çizelge 4.11. *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile kantitatif analizi (Fitokimyasallar:, 11: Rozmarinik asit, 12: Rutin, 13: Hesperidin, 14: Hiperosid, 15: 4-OH-benzoik asit, 16: Sinapinik asit, 17: Mirisetin, 18: Fisetin, 19: Kumarin)

	Konsantrasyon (µg analit/g ekstre)								
Ekstreler	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**
AAHtü	-	-	-	52.48	-	-	-	-	-
AAHta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AAVtü	-	3015.87	3700.94	116.12	-	-	-	-	-
AAtü	-	-	36.3	-	-	-	-	-	-
AAta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACtü	-	13.66	28.96	-	-	-	-	-	-
ACta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AKtü	-	50.55	113.8	29.71	-	-	-	-	-
AKta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARtü	-	-	-	32.48	-	-	-	-	-
AStü	-	542.35	1182.64	24.20	-	-	-	-	-
ASta	-	89.42	222.03	-	-	-	-	-	-
ASctü	-	-	-	275.50	-	-	-	-	-
ASRtü	-	-	-	127.9	-	-	-	-	-
ASRta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AShtü	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AShta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASitü	-	-	19.33	15.93	-	-	-	-	-
ASita	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ATtü	-	-	-	16.20	-	-	-	-	-
AVtü	-	-	-	25.80	-	-	-	-	-
AVitü	-	-	-	81.32	-	-	-	-	-
AVita	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asstü	-	-	-	11.72	-	-	-	-	-
Assta	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.12. *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile kantitatif analizi (Fitokimyasallar:, 20: Kersetin, 21: Naringenin, 22: Hesperetin, 23: Luteolin, 24: Kamferol, 25: Apigenin, 26: Ramnetin, 27: Krisin)

	Konsantrasyon (µg analit/g ekstre)							
Ekstreler	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**
AAHtü	-	-	-	26.87	93.42	103.61	-	-
AAHta	-	-	-	-	-	-	-	-
AAVtü	399.87	-	-	-	-	-	-	399,87
AAtü	-	-	-	-	27.04	210.81	-	-
AAta	-	-	-	-	-	-	-	-
ACtü	-	-	-	-	34.1	200.71	-	-
ACta	-	-	-	-	-	-	-	-
AKtü	37.28	-	-	-	-	-	-	37.28
AKta	-	-	-	-	-	-	-	-
ARtü	43.04	-	-	-	-	-	-	43.04
AStü	80.18	-	-	-	-	-	-	80.18
ASta	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.12. Devamı. *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile kantitatif analizi

ASctü	-	-	-	-	230.75	146.88	-	-
ASRtü	-	-	-	-	-	-	-	-
ASRta	-	-	-	-	-	-	-	-
AShtü	-	-	-	-	53.99	141.73	-	-
AShta	-	-	-	-	-	-	-	-
ASitü	18,26	-	-	-	-	-	-	18,26
ASita	-	-	-	-	-	-	-	-
ATtü	-	-	-	107.37	245.11	454.33	-	-
AVtü	-	-	-	-	-	-	-	-
AVitü	-	-	-	-	73.84	57.7	-	-
AVita	-	-	-	-	-	-	-	-
Asstü	-	-	-	-	-	-	-	-
Assta	-	-	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.13. Analit miktarının (µg analit/g ekstre) en çok bulunduğu türler (TÜ: Toprak üstü, TA: Toprak altı)

Analit	**Miktarı en fazla bulunduğu tür**	**Miktar**
Kinik asit	ACtü	**691.42**
Malik asit	AVitü	**3358.81**
Tr-Asonitik asit	AShtü	22.62
Gallik asit	ACtü	5.19
Klorojenik asit	AShtü	54.18
Protokateşik asit	AAta	110.99
Tr-Kafeik asit	AVita	372.1
Vanilin	Assta	**1112.57**
p-Kumarik asit	ATtü	**961.07**
Rutin	AAVtü	**3015.87**
Hesperidin	AAVtü	**3700.94**
Hiperosid	ASctü	275.5
Kersetin	AAVtü	399.87
Luteolin	ATtü	107.37
Kamferol	ATtü	245.11
Apigenin	ATtü	454.33
Krisin	AAVtü	399.87

Allium türlerinin LC-MS/MS ile elde edilen sonuçlara göre genel olarak fitokimyasalların toprak üstü kısımları daha zengin olduğu görülmüştür. Değerler µg analit/g ekstre cinsinden verilmiştir.

Allium akaka türünün toprak altı (AAHta) ve toprak üstü (AAHtü), ayrıca AAVtü sonuçlarında en fazla görünen AAVtü'dır. Bu türde en yüksek analit değerleri, hesperidin (3700.94) ve rutindir (3015.87).

Allium atroviolaceum türünün toprak üstü ve toprak altı kısımlarının sonuçlarına baktığımızda toprak altı kısmında analitlerden malik asidin (1980,31) en yüksek değerde bulunduğu tespit edilmiştir.

Allium chrysantherum türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarının sonuçlarına göre toprak altı kısmının en yüksek analit değerinin yine malik asit (889,21) olduğu görülmüştür ve toprak üstü kısmının toprak altı kısmına yakın bir değerde malik asit (726.95) bulunduğu tespit edilmiştir.

Allium kharputense türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarının sonuçlarına göre çok yüksek değerde analit bulunmamaktadır. Toprak altı kısmında vanilin (172.58) miktarının en yüksek olduğu görülmektedir.

Allium rhetoreanum türünün sadece toprak üstü değerlerine bakılmıştır ve en fazla bulunan analitin malik asit (235.8) olduğu görülmektedir. Genel olarak bu türde fazla analit bulunmadığı görülmüştür.

Allium scabriscapum türünün toprak üstü ve toprak altı kısımlarının sonuçlarına bakıldığında en yüksek analit miktarının toprak üstü kısmında bulunan hesperidin (1182.64) olduğu görülmektedir.

Allium schoenoprasum türünün sadece toprak üstü kısmına bakılmıştır ve en yüksek analit değerinin malik asit (1138.65) olduğu tespit edilmiştir. Bu türün önceki türlerden daha fazla analit bulundurduğu görülmüştür.

Allium scorodoprasum subsp. *roturdum* türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarının sonuçlarına göre en yüksek analit değerinin malik asit (787.6) olduğu ve toprak altı ve toprak üstü kısımlarında eşit miktarda olduğu görülmektedir.

Allium shatakiense türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarının sonuçlarına bakıldığında en yüksek değerde bulunan analitin toprak üstü kısmında bulunan malik asit (302.36) olduğu görülmektedir. Toprak altı kısmında bulunan malik asit (292.66) değerinin toprak üstü kısmındakine yakın olduğu görülmüştür.

Allium shirnakiense türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarının sonuçlarına bakıldığında en yüksek değerde bulunan analitin toprak üstü kısmında bulunan malik asit (771.89) olduğu görülmektedir.

Allium tripedale türünün sadece toprak üstü kısmına bakılmıştır ve en yüksek miktarda bulunan analitin p-kumarik asit (961.07) olduğu görülmektedir. Malik asit (618.51) değerinin de en yüksek ikinci değer olduğu görülmektedir.

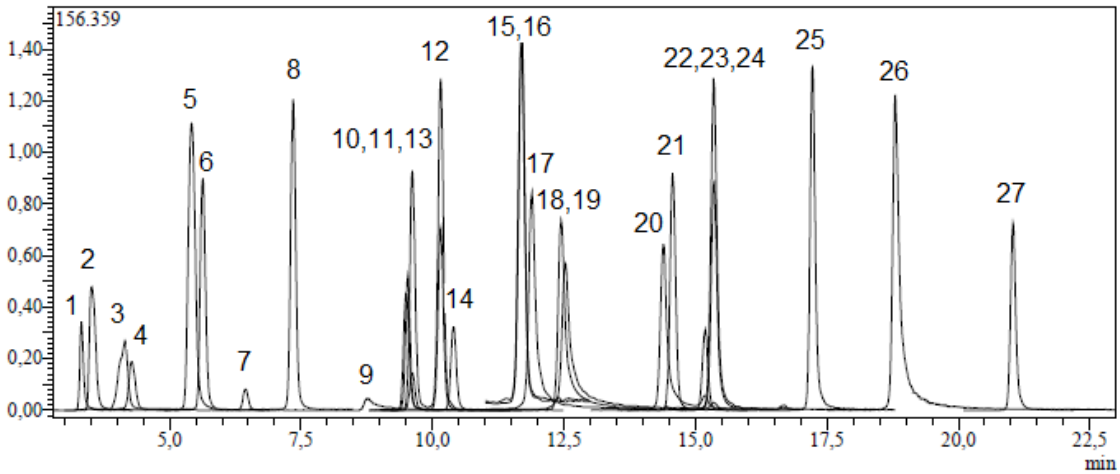
Allium vineale türünün toprak üstü ve toprak altı kısımları ve farklı ilden toplanan toprak üstü kısımlarının sonuçlarına bakılmıştır. En yüksek analit miktarının toprak üstü ve toprak altı kısımlarının birbirine yakın bulunan malik asit (toprak üstü: 3358.81, toprak altı: 3304.12) olduğu belirlenmiştir.

Allium ssp. türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarının sonuçlarına bakıldığında en yüksek analitin toprak altı kısmında bulunan vanilin (1112.57) olduğu görülmektedir. Yine aynı kısımda malik asit (588.76) değerinin en yüksek ikinci değer olduğu görülmektedir.

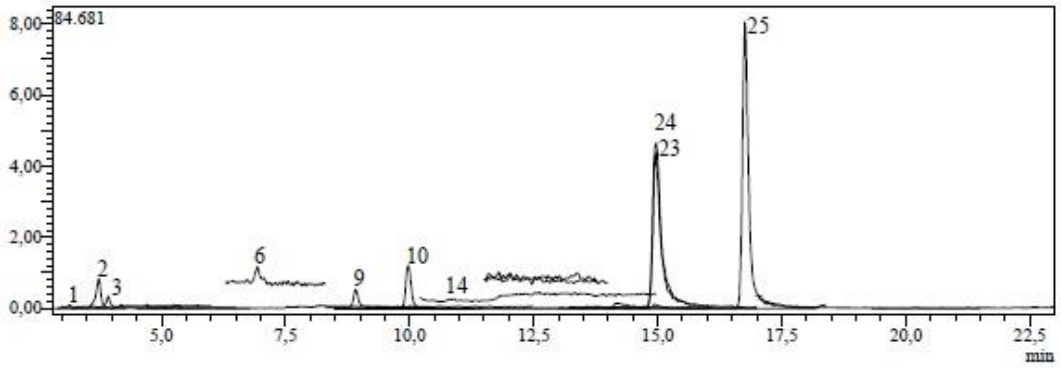
Genel olarak *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarında en yüksek miktarda bulunan analitin çoğunlukla bitkilerde rastlanan malik asit olduğu görülmüştür.

4.8.2. LC-MS/MS Analizindeki Standart ve Numune Kromatogramları

Allium türlerinin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS yöntemi ile taranmasında oluşan kromotogramlar Şekil 4.7- 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7. LC-MS/MS standart kromatogramı



Şekil 4.8. AAHtü kısmının LC-MS/MS standart kromatogramı

Diğer kromatogramlar EKLER bölümünde verilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Alliaceae familyasına ait olan 12 *Allium* türünün (*A. akaka, A. atroviolaceum, A. chrysantherum, A. kharputense, A. rhetoreanum, A. scabriscapum, A. schoenoprasum, A. scorodoprasum* subsp. *roturdum, A. shatakiense, A. shirnakiense, A. tripedale, A. vineale*) toprak altı ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstreler kimyasal içerik ve biyolojik aktivite açısından detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Çalışılan türlerin etanol ekstrelerinin LC-MS/MS ile daha çok fenolik yapıdaki 27 bileşiğin kalitatif ve kantitatif analizi yapılmıştır. ICP-MS ile ise bu türlerin ağır metal içeriği tespit edilmiştir. Bunun yanısıra bu türlerin toksik içeriğini ortaya koymak için total aflatoksin içerikleride belirlenmiştir. Ayrıca, çalışılan *Allium* türlerinin etanol ekstrelerinin toplam fenolik ve flavonoid içeriği belirlendikten sonra DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali giderim aktivitesi, β-Karoten lipit peroksidasyon test sistemi ve CUPRAC bakır indirgeme kapasitesi yöntemleriyle antioksidan aktiviteleri ve Ellman yöntemi ile antikolinesteraz etkileri belirlenmiştir. Çalışılan *Allium* türlerinden hazırlanan etanol ekstrelernin fibroblast canlı hücre ve kolon kanser hücresi olan DLD-1 hücre serileri üzerinde sitotoksik aktivitelerine bakılmıştır.

Aflatoksin sonuçlarına göre en yüksek total aflatoksin içerik (33,43 µg/kg) bulunduran türün *Allium akaka* (Hakkâri) olduğu belirlenmiştir. Genel olarak diğer türlerin total aflatoksin düzeyleri belirlenen maksimum limitin altında ve düzeyinde olduğu saptanmıştır. *Allium akaka* (Hakkâri) türünün gıda olarak kullanıldığı zaman tüketim sıklığının azaltılması veya kontrollü kullanılması gerekmektedir.

ICP-MS ile bakılan ağır metal miktarlarından en yüksek Pb bulunduran türün ACtü (13292±2 µg/kg) olduğu görülmüştür. Türk Gıda Kodeksi verilerine göre bu Pb miktarının çok yüksek olduğu görülmektedir. Aynı şekilde en yüksek Cd (1552±3 µg/kg) ve As (921±1 µg/kg) bulunduran türün ACtü olduğu belirlenmiştir. Bu ağır metal içerğinden dolayı ACtü'nün de gıda olarak tüketimine dikkat edilmeli ve tüketim sıklığı azaltılmalıdır.

Antioksidan aktivite ise dört farklı metodla belirlenmiştir. β-karoten renk açılımı metoduna göre tüm ekstrelerin düşük ve orta seviyede aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu yöntemde en yüksek aktiflik gösteren ekstrenin AAHtü (IC_{50}: 186,33±6,70) olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak çalışılan tüm türlerin CUPRAC ve DPPH aktivitelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemine göre, en yüksek aktiviteyi AAHta (IC_{50}: 302,20±14,72) ekstresi göstermiştir.

Bunun yanında çalışılan *Allium* türlerinin genel olarak ABTS katyon radikali giderim metodunda orta düzeyde aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bu metoda göre en yüksek aktiviteyi (IC_{50}: 79,03± 0,84), ASta ekstresi göstermiştir.

Antikolinesteraz aktivite sonuçlarına göre ekstrelerin asetilkolinesteraz testinde aktivite göstermediği, butirilkolinesteraz testinde ise aktivitelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek butirilkolinesteraz aktivite gösteren ekstrenin Asstü (19,90 ± 1,95) olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak çalışılan *Allium* türlerinin antioksidan aktivitelerinin aksine sitotoksik aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Özellikle AAtü ekstresinin fibroblast canlı hücre çeşidi üzerinde 12,5 µg/mL konsantrasyonda hiç toksik etki (canlılık %110,92) göstermemesine rağmen aynı konsantrasyonda DLD-1 (kolon kanser hücresi) hücrelerinin üzerinde yüksek toksik etki (canlılık %40,18) gösterdiği belirlenmiştir. Aynı şekilde ACtü ve AVitü ekstrelerinin 12,5 µg/mL konsantrasyonda canlı hücre üzerinde düşük toksik etki gösterirken kanserli hücre üzerinde yüksek toksik etki göstermiştir.

Çalışılan 12 farklı *Allium* türünün genel olarak total fenolik içerik bakımından flavonoid içeriğe göre daha zengin olduğu belirlenmiştir. Total fenolik içerik bakımından en zengin ekstre AAtü (107,43 ± 1,50) olmakla beraber AAta (89,75 ± 1,37), AAHtü (79,37 ± 1,78), AAHta (89,73 ± 1,97) ve AAVtü (85,19 ± 1,81) ekstrelerinde zengin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Total flavonoid içerik bakımından ise yine AAHta (19,13 ± 0,59), AAHtü (15,04 ± 0,37) ve AAVtü (17,15 ± 0,33) ekstrelerinin en yüksek içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir.

LC-MS/MS ile 27 fitokimyasalın kalitatif ve kantitatif analizine ilişkin grubumuz tarafından oluşturulan metot ile bitkilerin toprak üstü ve toprak altı kısımlarının etanol ekstrelerinin analizleri yapıldı. LC-MS/MS sonuçlarına göre kinik asit en yüksek (691.42 µg analit/g ekstre) ACtü türünde, malik asidin en yüksek (3358.81 µg analit/g ekstre) AVitü ekstresinde, tr-kafeik asidin en fazla (296.76 µg analit/g ekstre) ASRta ekstresinde, vanilin en fazla (1112.57 µg analit/g ekstre) Assta ekstresinde, p-kumarik asit en fazla

(741.13) ASRta ekstresinde, rutinin en fazla (3015.87 µg analit/g ekstre) AAVtü ekstresinde, hesperidin maksimum (3700.94 µg analit/g ekstre) AAVtü ekstresinde, hiperosidin en yüksek (275.50 µg analit/g ekstre) ASctü ekstresinde, kersetin en fazla (399.87 µg analit/g ekstre) AAVtü ekstresinde, kamferol en yüksek (245.11 µg analit/g ekstre) ATtü ekstresinde, apigenin maksimum (454.33 µg analit/g ekstre) ATtü ekstresinde ve krisin en yüksek (399.87 µg analit/g ekstre) AAVtü ekstresinde olduğu belirlenmiştir.

Genel olarak çalıştığımız türlerden toplam fenolik ve flavonoid içerik bakımından zengin olan türlerin LC-MS/MS taramasında benzer sonuçlar göstermediği tespit edilmiştir. Buda bu türlerin LC-MS/MS'te kullandığımız mettotta bulunan fenolik bileşikler dışında bazı fenolik bileşiklerce zengin olduğu sonucuna varılabilineceğini göstermektedir.

Halk arasında *Allium* türleri hem gıda ve kozmetik hem de tıbbi uygulamalar için kullanılan en eski kültür bitkileri arasında yer almaktadır. Bu çalışma ile değerli bu türlerden 12 tanesi biyolojik ve kimyasal yönden taranmış ve daha detaylı çalışmalar için önemli veriler ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

Ağbaş B., Karakuş D., Adıgüzel R., Keser S., Demir E., 2013. Tunceli Sarımsağının (*Allium tuncelianum*) Toplam Antioksidan Özelliklerinin ve Kuru Madde İçeriğinin Normal Sarımsak (*Allium sativum*) ile Karşılaştırılması. Bilim ve Gençlik Dergisi Cilt 1, Sayı 2

Al-Fraihat, A.H. 2009. Effect of Different Sulfur and Nitrogen Fertilizer Levels on Growth, Yield and Quality of Onion, *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, Volume 5, No:2.

Allen-Diaz B. 2000. Biodiversty is critical to future healt of California's ecology and economy. California Agriculture 54,2, 26-34.

Alena T., Branimir P., Jelena V., Milica R., Ján B., Senka V. 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.) Ultrasonics Sonochemistry 29: 502‑511

Amin İ, Tan, SH. 2002. Antioxidant activity of selected commercial seaweeds, Malays. J. Nutr. 8: 167-177.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981

Arzanlou, M., Bohlooli, S., Jannati, E., Mirzanejad-Asl, H. 2011. Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extra-cellular pneumolysin O in vitro. Toxicon. 57: 540-545.

Banerjee, S.K., Bonde, C.G. 2011. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa Spreng* Bark: Impact of dielectric constant and geographical location. J. Med. Plants Res.5: 817-822.

Benkeblia N. 2005. Free- radikal scavenging capacity and properties of some selected onions (*Allium cepa L.*) and garlic (*Allium sativum L.*) extracts. An International Journal, 48, 753-759.

Benzie, I. F. F. ve Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medical Plants*, Paris, Lavoisier Publishing, pp. 280-288.

Blakely T, Hales S, Woodward A, Prüss-Üstün A, Campbell-Lendrum D, Corvalan C. 2004. Assessing the distibution of health risks by socioeconomic position at national and local levels. World Health Organization, 11-66.

Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200.

Ceylan O. and Alic H. 2015. Antibiofilm, Antioxidant, Antimutagenic Activities and Phenolic Compounds of *Allium orientale* BOISS. Brazılıan Archıves of Bıology and Technology 58: 935-943.

Chu Q, Lee DTW, Tsao SW, Wang X, Wong YC. 2007. S-allylcysteine, a watersoluble garlic derivative, suppresses the growth of a human androgenindependent prostate cancer xenograft, CWR22R, under in vivo conditions. BJU Int.;99(4):925–32.

Dar, N, 2004. Isolation and Caracterizations of Havy Metal Resistant Yeast from Industrial Effluents and Their Use In Evironmental Clean Up. University of the Punjab, Department of Zoology/ Pakistan (MSc theies, 212s).

Davis, P.H. 1984. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Vol. 8, Edinburgh, Edinburgh University Pres

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315: 161-169.

Doğmuş, D., Durucasu, İ. 2013. Keten tohumu çeşitlerinin n-bütanol fraksiyonlarının fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitesi. C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi. 9.1:47-56.

Erik, S., Tarıkahya, B. 2004. Kebikeç. Türkiye Florası Üzerine. 17; 139-163.

Farombi EO. 2006. Aflatoxin contamination of foods in developing countries: implications for hepatocellular carcinoma and chemopreventive strategies. Afr J Biotechnol, 5 (1): 001–14.

Fırat, M., Karavelioğulları, F. A., Aziret A. 2015. Geophytes of East Anatolia (Turkey), Manas Journal of Agriculture and Life Sciense MJAL 5 (1):38-53

Fırat M., Aziret, A. 2016. Edible *Allium* L. species that are sold as fresh vegetables in public bazaars of Hakkâri province and its surroundings in Turkey, Acta Biologica Turcica 29(1): 14-19.

Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Kumagai H, Seki T, Ariga T. 2008. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *J Agric Food Chem* 56: 4229–4235

Frıtsch, R.M. Blattner, F.R. Gurushidze, M. 2010. New classification of *Allium L*. subg. Melanocrommyum (Webb&Berthel) Rouy (Alliaceae) based on molecularand morphologicalcharacters. Phyton 49: 145-220

Güner, A., Türkiye Bitkiler Listesi(Damarlı Bitkiler), ANG Vakfı / Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi, Kasım 2012.

Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. ve Ferro-Luzzi, A. 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. Free Radical Biology and Medicine, 18: 29-36.

Haber, D., Suschetet, M., Berges, R., Astorg, P., Siess, M.H., 1996. Inhibition of aflatoxin B1- and Nnitrosodiethylamine-induced liver preneoplastic fociin rats fed naturally occurring allyl sulfides. Nutr. Cancer. 25: 61-70

Haris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, S., Lloyd, D. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum (garlic). Appl. Microbiol. Biotechnol*. 57: 282-286.

Hoppe, L., Bahadır, M., and Haneklaus, S. 1996, Sulphur supply and Alliin content on Allium species, http://www.pb.fal.de/en/library/ publications/pb1091.htm, Erişim Tarihi: 17 Mart 2011.

Huang, D., Ou, B. ve Prior, RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1841–1856

Hyun-II Jun, Hana Jang, Dalrae Ahn, Dae Keun Kim, Jae-Heon Yang, Bong-Sik Yun, and Young-Soo Kim 2015. Isolation and Characterization of Phenolic Compound from *Allium hookeri* Root for Potential Use as Antioxidant in Foods. Food Sci. Biotechnol. 24(6): 2031-2034

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2004. Metallerin Çevresel Etkileri I-II, _TÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü (Seminer çalışması 24s).

Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A. 2002. Mikotoksinler. In Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A, eds. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji: 537-574

Kameda K, Matsunaga T, Abe N, et al. 2003. Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. Eur Heart J 24: 2180–2185.

Koç, H. 2002 Bitkilerle Sağlıklı Yaşama, T.C.Kültür Bakanlığı Yayınları No:2883, Kültür Eserleri Dizisi No:373, Ankara, s.314.

Kohen, R., Beit-Yannai, E., Berry, E. M. ve Tirosh, O. 1999. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. Methods in Enzymology, 300: 285-296.

Koirala P, Kumar S, Yadav BK, Premarajan KC. 2005. Occurrence of aflatoxin in some of the food and feed in Nepal. Indian J Med Sci; 59 (8): 331–6.

Koyuncu M. 2012. *Allium* L. In: Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT. (Eds) Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry, 85: 633–640.

Lardos, A. and Kreuter, M.H. 2001. Garlic. R& D Depertment , Flachsmann AG,Zurich.

Lee Y.K., Bone N.D., Streg A.K., Jelinek D.F., Kay N.E., 2004. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3- gallate (ECCG) in B cell chronic lymphocytic leukemia, Blood 104: 788–794.

Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. The Journal of Nutrition, 134, 3479-3485.

Liu, F., Ooi, V. E. C. ve Chang, S. T. 1997. Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. Life Sciences, 60, 763–771.

Losling, P. 2003. Alicin the heart of garlic. NWI Publishing, Callahan Florida, 6-158.

Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K. 1996. Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspectives, Markel Dekker, Newyork.

Martha T., Khaled K. Al-Qattan, Divya JS and Muslim A. 2016. Anti-diabetic and anti-oxidant potential of aged garlic extract (AGE) in streptozotocin induced diabetic rats. Thomson et al. BMC Complementary and Alternative Medicine 16:17

Miller, H.E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. Journal of the American Oil Chemist's Society, 48: 91.

Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R. ve Vattueno, M.A. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology, 71, 109-114.

Naczk, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054, 95-111.

Natasa Simin, Dejan Orcic, Dragana Cetojevic-Simin, Neda Mimica-Dukic ,Goran Anackov , Ivana Beara, Dragana Mitic-Culafic, Biljana Bozin. 2013. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae) LWT - Food Science and Technology 54: 139-146

Okada Y, Tanaka K, Fujita I, Sato E, Okajima H. 2005. Antioxidant activity of thiosulfinates derived from garlic. Redox Rep10: 96–102.

Onda M, Wang Q, Guo H, Cheung NKV, Pastan I. 2004. In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9 (Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. Cancer Research, 64: 1419-1424.

Özdemir, C., Aktaş, K., Altan,Y. 2011. Morphological and anatomical investigations on three *Allium L. (Liliaceae)* Species of East Anatolia Turkey. Bangladesh J. Bot. 40 (1): 9-15.

Özhatay, N. 1996. Türkiye' nin Güzel Kokulu Soğanlı Bitkileri. *XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, (s.541-546). Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi: Ankara.

Özhatay, N., Kültür, Ş., Gürdal, M. N. 2011. Checklist of Additional Taxa to the Supplement Flora of Turkey V. Turk J. Bot., 35, 1-36.

Parihar, M.S. and T. Hemnani. 2004. "Alzheimer's Disease Pathogenesis and Therapeutic Interventions", Journal of Clinical Neuroscience, Vol. 11, No. 5, pp. 456–467.

Prior, R.L. ve Cao, G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radical Biology & Medicine, 27: 1173-1181.

Prior, R.L. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. The American Journal of Clinical Nutrition, 78, 570S–8S.

Putrı Wıdyantı Harlına1, Raheel Shahzad, Meıhu Ma1, Fang Geng1, Qınglıng Wang1, Lıyuan He1, Shuqı Dıng1 And Nıng Qıu 2015. Effect of Garlıc Oıl on Lıpıd Oxıdatıon, Fatty Acıd Profiles and Mıcrostructure of Salted Duck Eggs. Journal of Food Processing and Preservation 39 2897–2911

Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E. 2005. Biology of Plants. W. H. Freeman and Company, 7th ed, New York.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine, 26: 1231-1237.

Saldamlı, İ. 2005. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 587s, Ankara.

Sashidhara, K. V., Singh, S. P., Srivastava, A. and Puri, A. (2011). Identification of the antioxidant principles of Polyalthia longifolia var. pendula using TEAC assay. Natural Product Research, 25(9), 918 926.

Selekler K. 2010. Alois Alzheimer ve Alzheimer hastalığı. Türk Geriatri Dergisi:13.

Seyed Hamdollah Mosavata, Leila Ghahramanib, Zahra Sobhanic, Ehsan Rahmanian Haghighid, Mahsa Rostami Chaijane, Mojtaba Heydarie 2015. The effect of leek (*Allium iranicum* (Wendelbo)) leaves extract cream onhemorrhoid patients: A double blind randomized controlled clinical trial. European Journal of Integrative Medicine 7: 669–673

Shahidi, F. 1996. Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications. AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.

Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in grape seedsbiochemistry and functionality. Journal of Medicinal Food, 6, 291-299.

Sho Hirata, Mostafa Abdelrahman, Naoki Yamauchi, Masayoshi Shigyo 2016. Characteristics of chemical components in genetic resources of garlic *Allium sativum* collected from all over the world Genet Resour Crop Evol 63: 35–45

Singleton, V.L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Oxidants and Antioxidants, 299: 152-178.

Slinkard, K. ve Singleton, V. L. 1977. Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49–55.

Sobenin, I.A., Pryanishnikov, V.V., Kunnova, L.M., Rabinovich, Y.A., Martirosyan, D.M., Orekhov, A.N. 2010. The effects of time-released garlic powder tablets on multifunctional cardiovascular risk in patients with coronary artery disease. Lipids Health Dis. 9: 119.

Tang, F.Y., Chiang, E.P., Pai, M.H. 2010. Consumption of S-allylcysteine inhibits the growth of human non-small-cell lung carcinoma in a mouse xenograft model. *J. Agric. Food Chem.* 58: 1156-1164.

Tsan-Chang Chang , Hung-Der Jang , Wang-De Lin , Peng-Fu Duan. 2016. Antioxidant and antimicrobial activities of commercial rice wine extracts of Taiwanese Allium fistulosum. Food Chemistry 190: 724‑729

Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F. 1998. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. Free Radical Biology & Medicine, 24: 1228-1234.

Ulukaya E, Ari F, Dimas K, Ikitimur EI, Guney E, Yilmaz VT. 2011. Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. Eur J Med Chem. 46(10):4957-63

Xiao, D., Lew, K.L., Kimi, Y.A., Zeng, Y., Hahm, E.R., Dhir, R. 2006. Diallyl trisulfide suppresses growth of PC-3 human prostate cancer xenograft in vivo in association with Bax and Bak induction. Clin. Cancer Res. 12: 6836-6843.

Xuhui Li, Qixing Zhou, Xiaoyin Sun, Wenjie Ren, 2016. Effects of cadmium on uptake and translocation of nutrient elements in different welsh onion (*Allium fistulosum* L.) cultivars. Food Chemistry 194: 101–110

Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U. ve Locke, S. 1985. Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. FEBS Letters, 187: 33-37.

Wang, H.C., Pao, J., Lin, S.Y,, Sheen, L.Y. 2012. Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1271: 44-52.

Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G. ve Maxwell, S.R.J. 1992. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. Analytica Chimica Acta, 266: 265-277.

W.H.O, 1996 Trace Elements In Human Nutrition and Health", World Health Organization, (Congress Book: V : 12 , P: 6-12) Geneva,

World Health Organization. 2011. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241 564373_eng.pdf. Erisim Tarihi: 05.04.2013

W.H.O. 2007 WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues(P:24)

Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J.H. ve Blanchard, K.A. 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. Free Radical Biology and Medicine, 24: 480-493.

Valentina G., Federica T., Carlo La V., Carlotta G. and Alessandra T. 2016. *Allium* vegetables and upper aerodigestive tract cancers: a meta-analysis of observational studies. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 212–222

Valkonen, M. ve Kuusi, T. 1997. Spectrophotometric assay for total peroxyl radical-trapping antioxidant potential in human serum. Journal of Lipid Research, 38: 823-833.

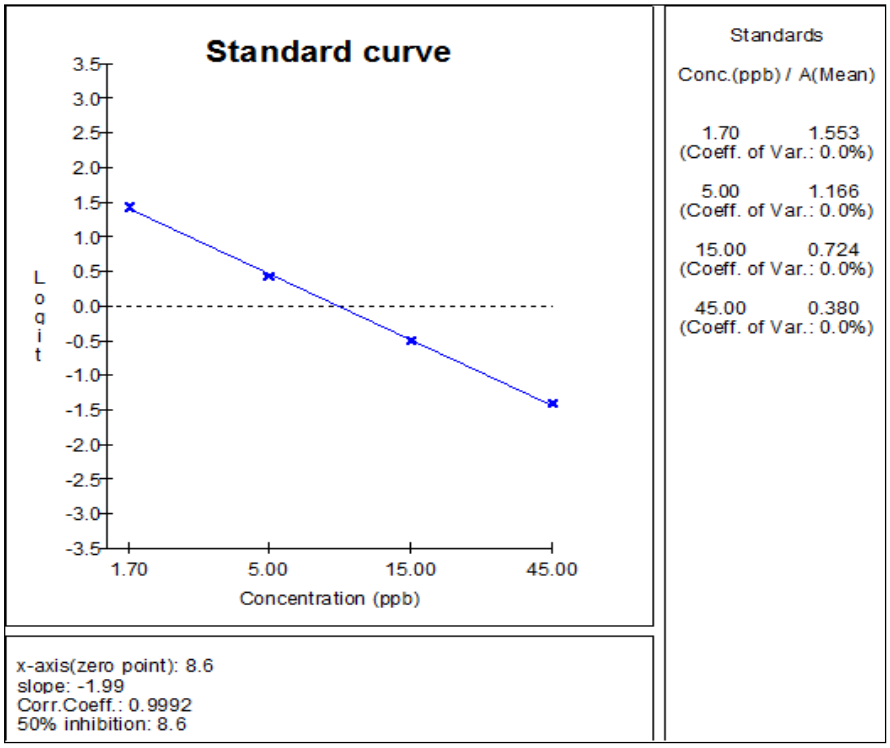
Vermerris W., Nicholson R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry,Springer, Dordrecht, Netherlands, 285 s.

Villamiel, M., Corzo-Martinez, M., Corzo, N. 2007. Biological properties of onions and garlic. Trends in Food Science & Technology, 18, 609-625.

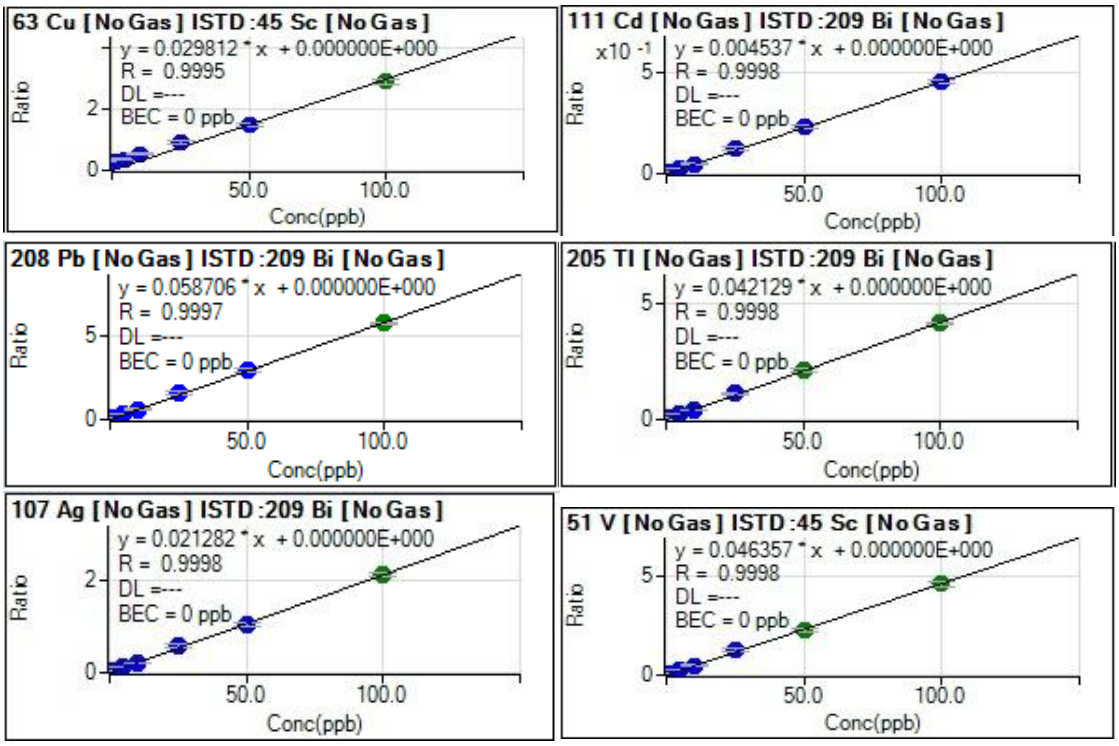
Yıldız, N. 2003. Toprak kirletici ağır metaller ve toprak bitki ilişkileri. 1. Ulusal Çevre Sempozyumu. Atatürk Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Müdürlüğü. Erzurum.

Zinedine A. González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Idrissi L, Mañes J. 2007. Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. Int J Food Microbiol; 114 (1): 25–9.

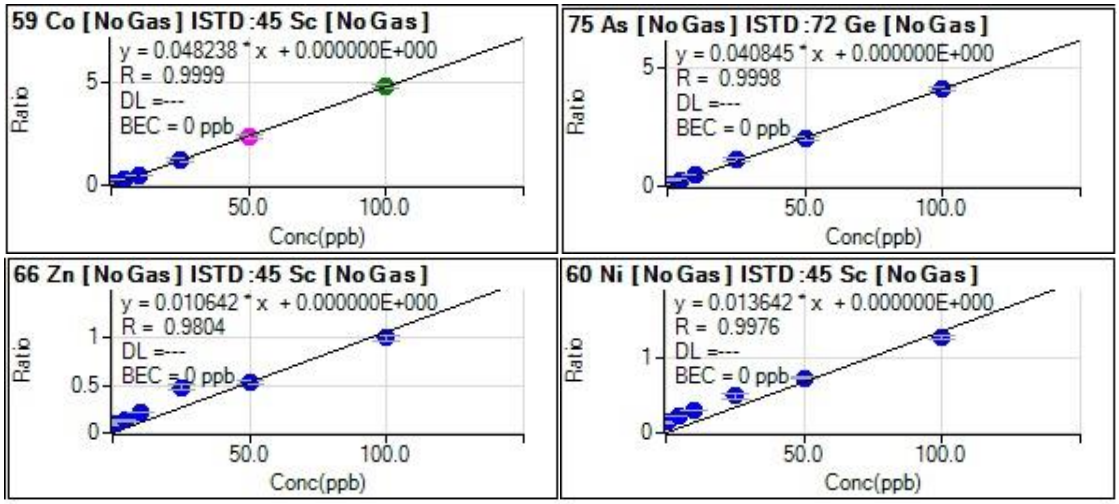
EKLER



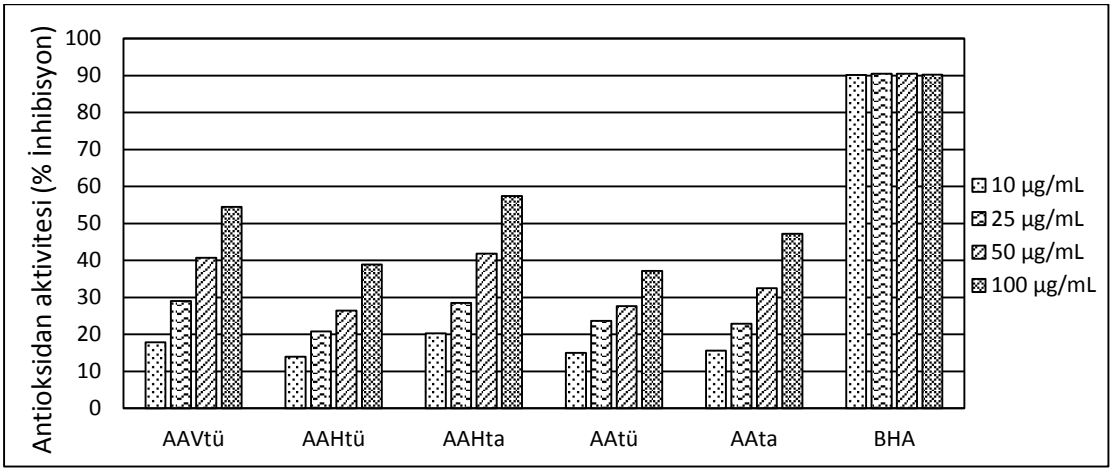
Ek 1. ELISA yöntemi toplam aflatoksin kalibrasyon eğrisi



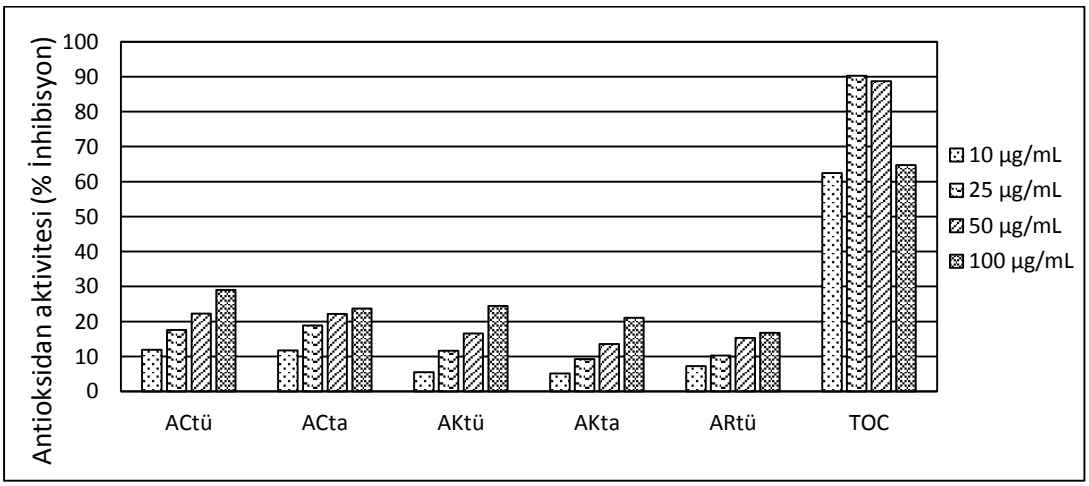
Ek 2. Ağır metal analizi kalibrasyon grafikleri



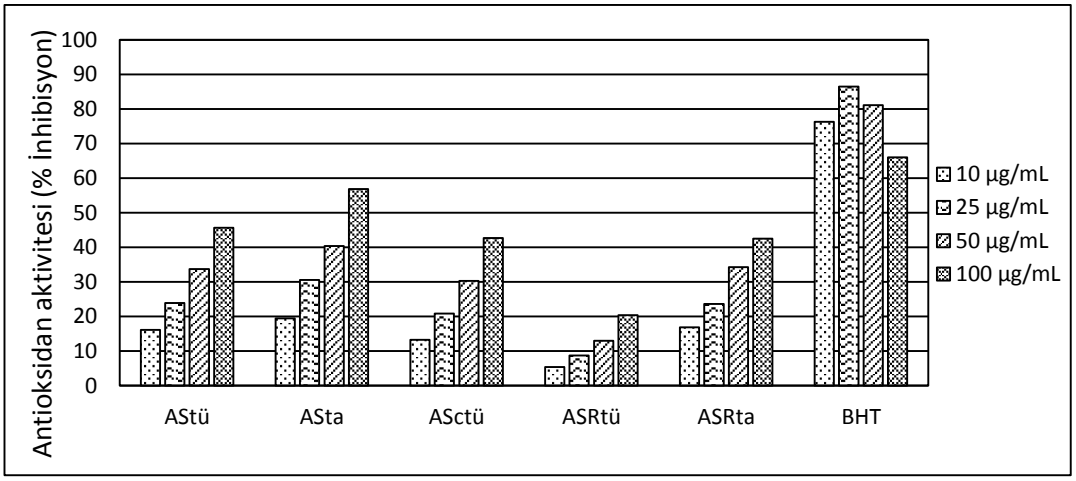
Ek 2. Devamı. Ağır metal analizi kalibrasyon grafikleri



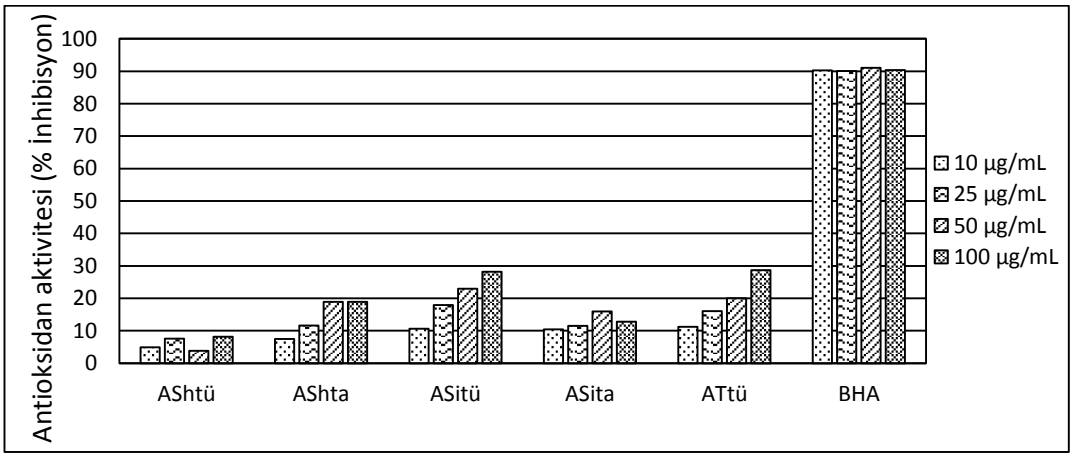
Ek 3. AAVtü, AAHtü, AAHta, AAtü, AAta türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



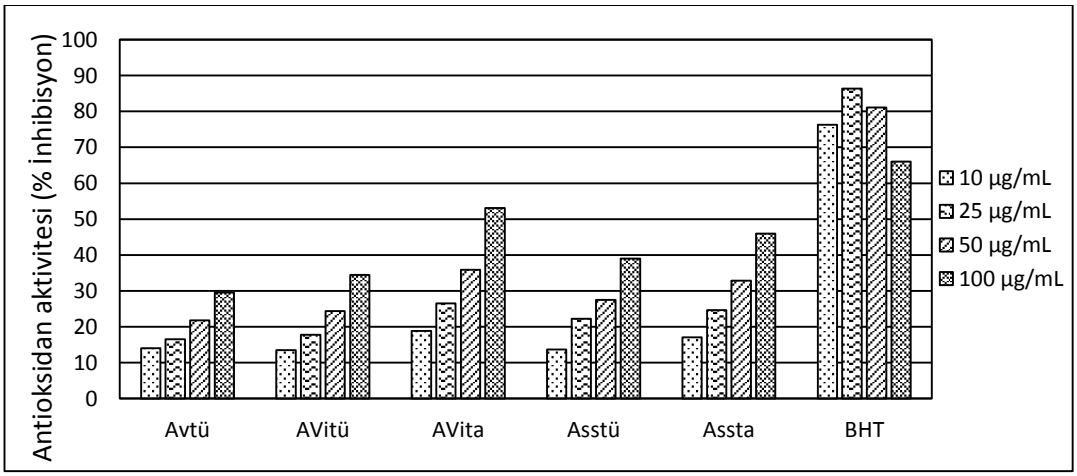
Ek 4. ACtü, ACta, AKtü, AKta, ARtü türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



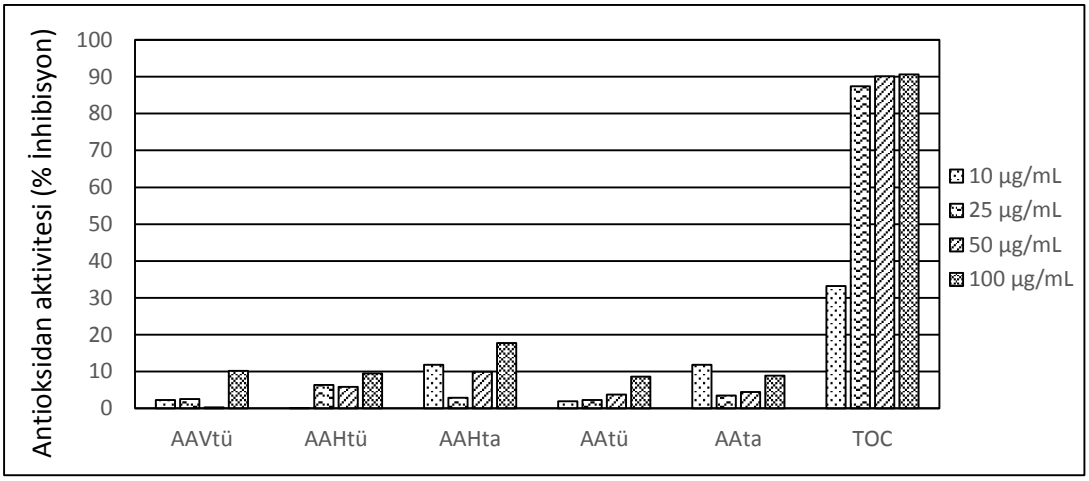
Ek 5. AStü, ASta, ASctü, ASRtü, ASRta türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



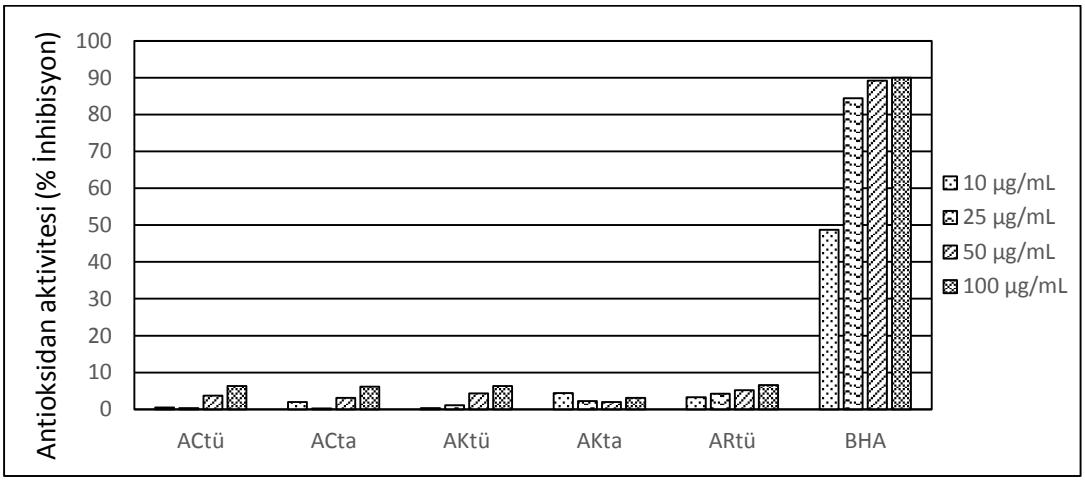
Ek 6. AShtü, AShta, ASitü, ASita, ATtü türlerinin türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



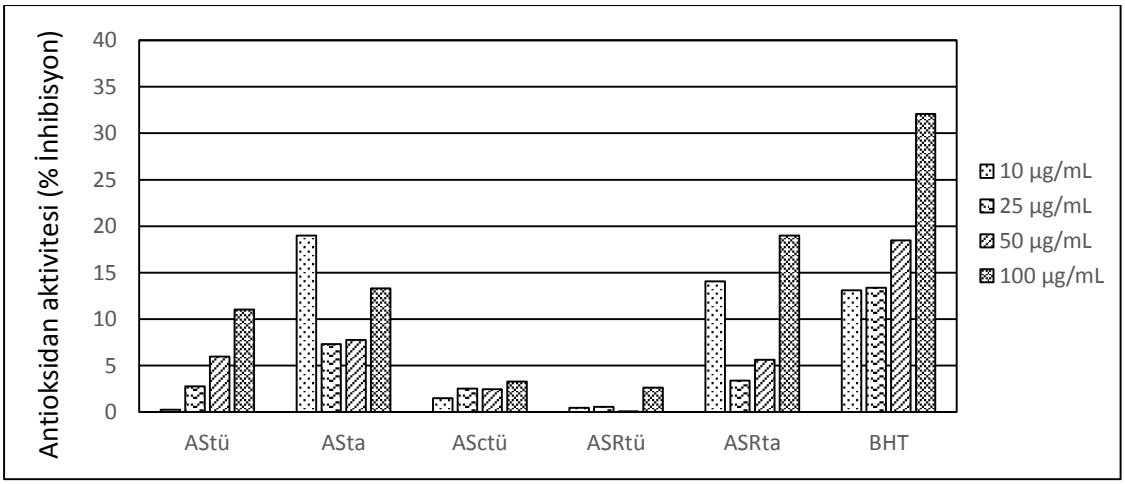
Ek 7. Avtü, AVitü, AVita, Asstü, Assta türlerinin ABTS antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



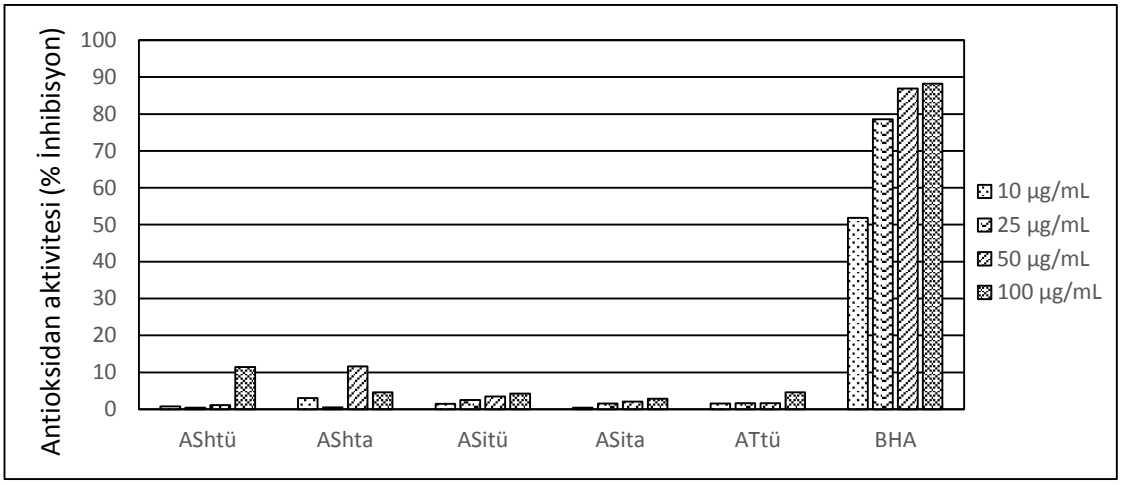
Ek 8. AAVtü, AAHtü, AAHta, AAtü, AAta türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



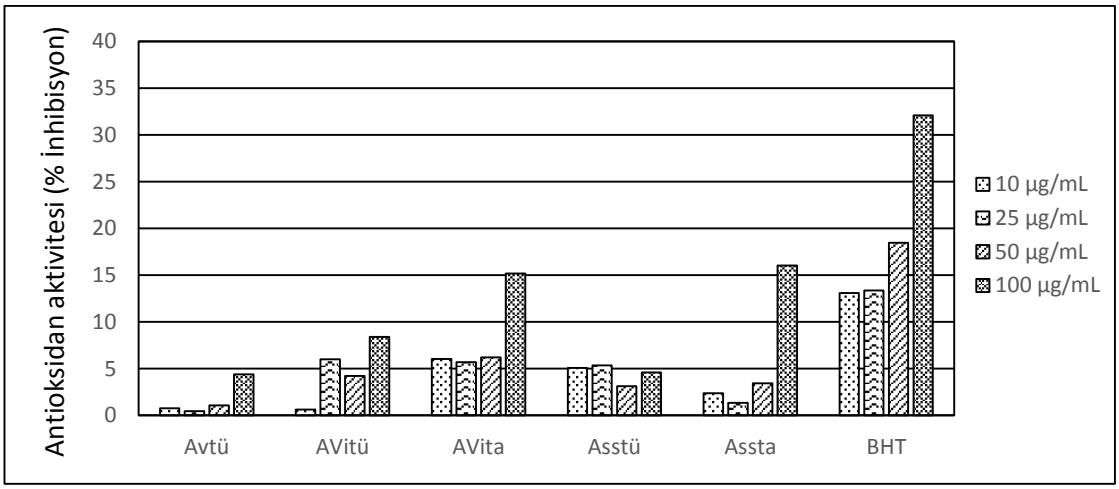
Ek 9. ACtü, ACta, AKtü, Akta, ARtü türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



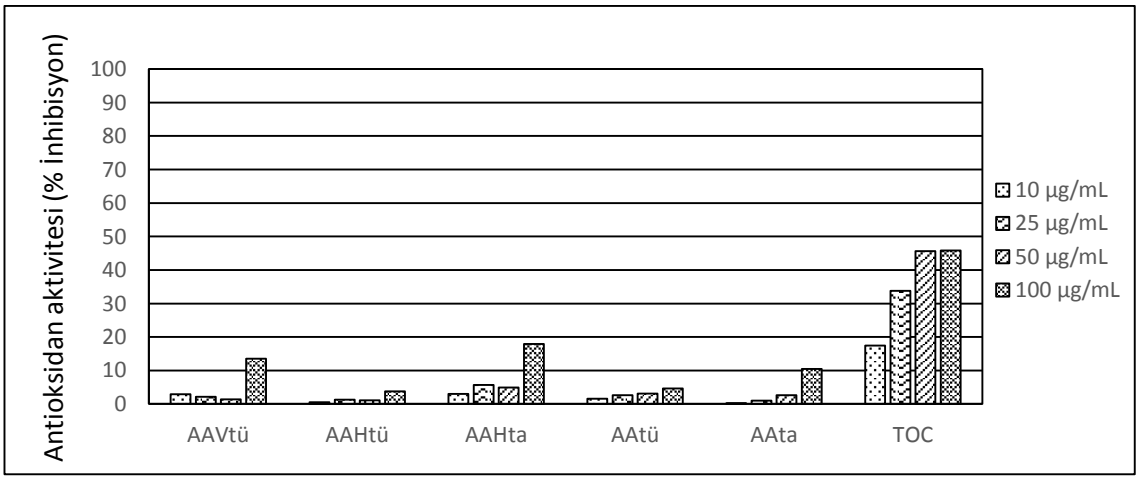
Ek 10. AStü, Asta, ASctü, ASRtü, ASRta türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



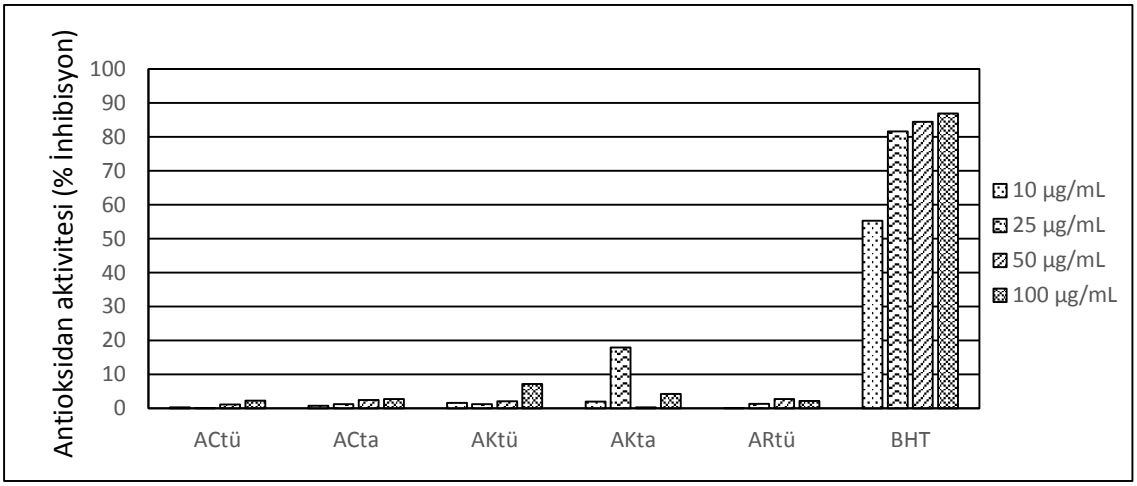
Ek 11. AShtü, AShta, ASitü, ASita, ATtü türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



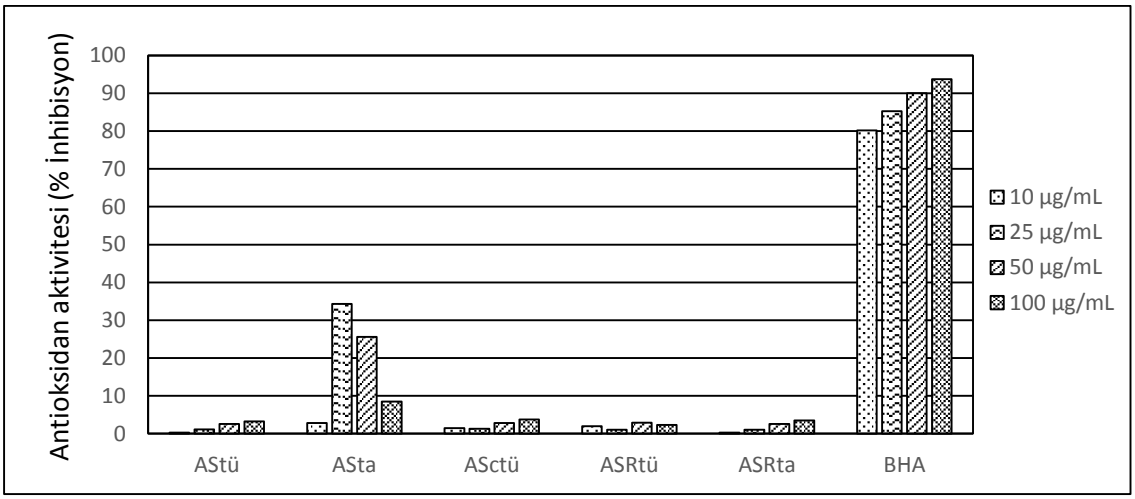
Ek 12. Avtü, AVitü, AVita, Asstü, Assta türlerinin DPPH antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



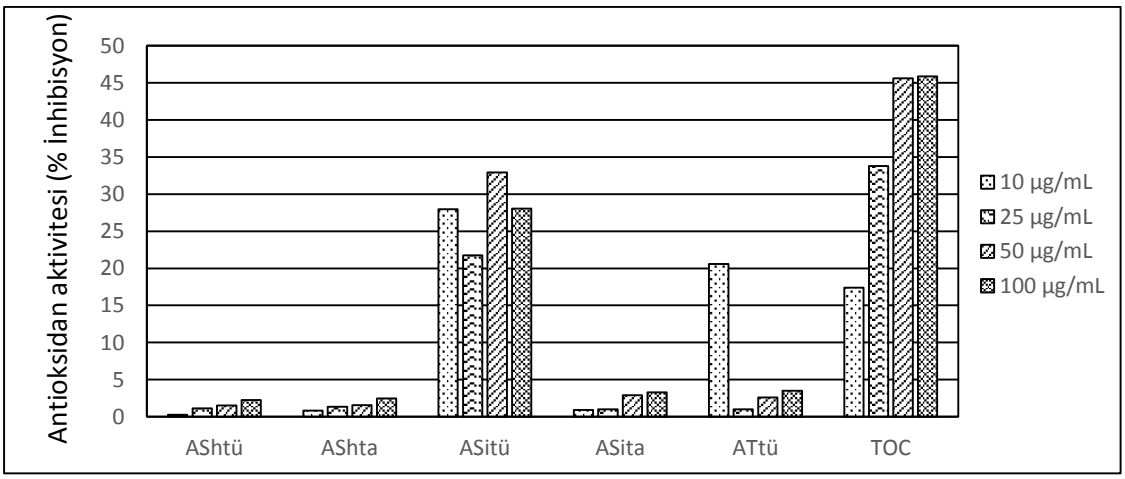
Ek 13. AAVtü, AAHtü, AAHta, AAtü, AAta türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



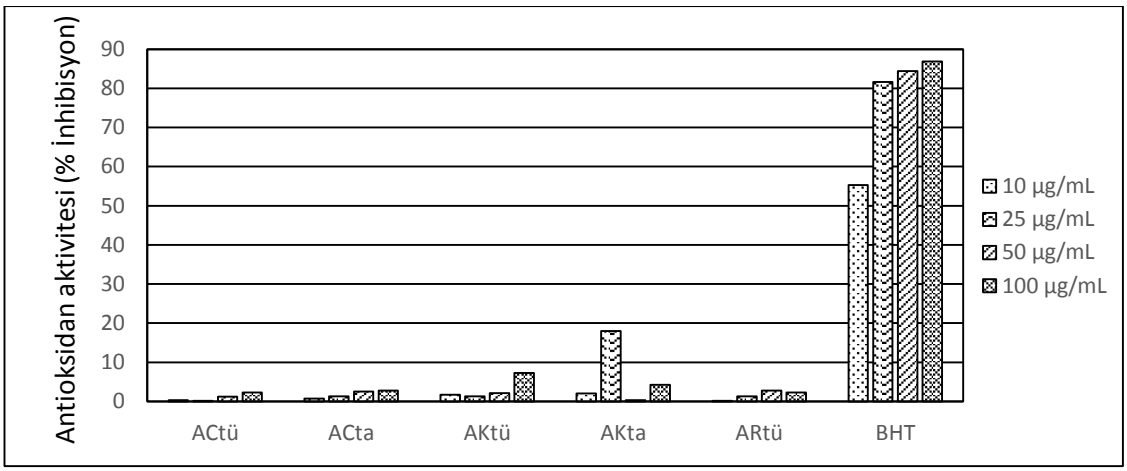
Ek 14. ACtü, ACta, AKtü, AKta, ARtü türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



Ek 15. AStü, ASts, ASctü, ASRtü, ASRta türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



Ek 16. AShtü, AShta, ASitü, ASita, ATtü türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği



Ek 17. ACtü, ACta, AKtü, AKta, ARtü türlerinin β-Karoten antioksidan aktivitesi inhibisyon grafiği

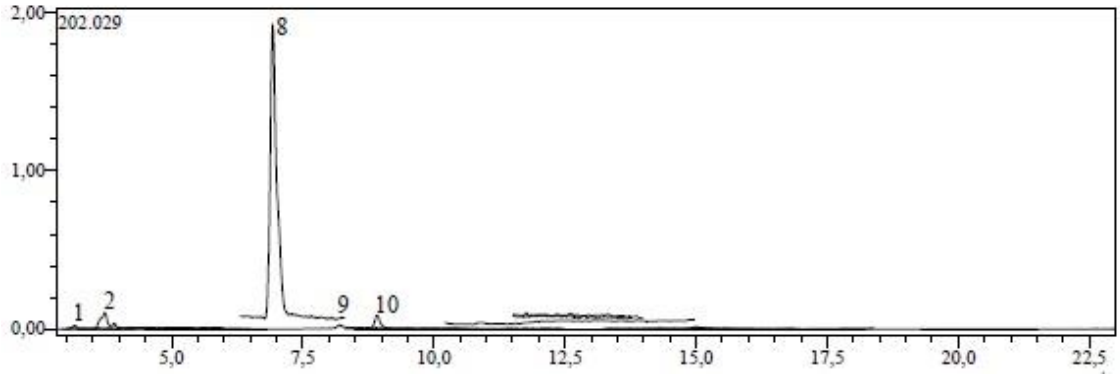
Ek 18. Sitotoksisite % canlılık değerleri (Fibroblast hücreler üzerindeki)

% Canlılık (Fibroblast Hücreleri Üzerindeki)

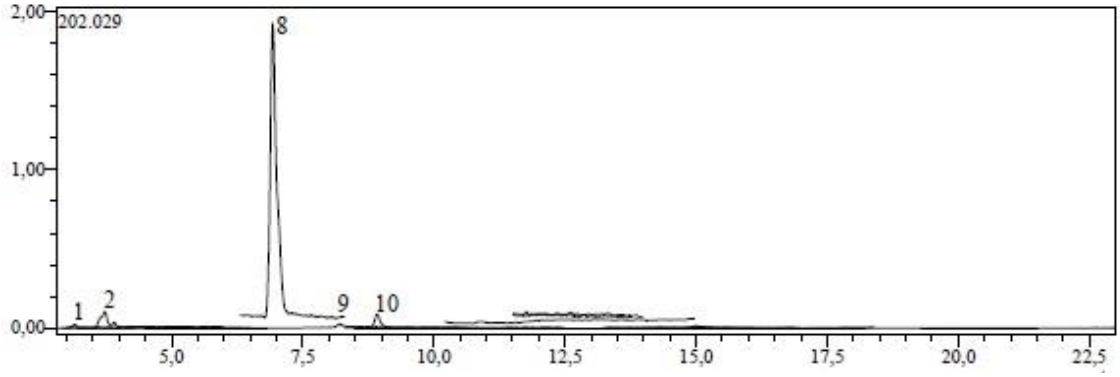
Ekstreler	12,5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
AAHta	102,46	102,46	95,07	86,27	82,39
AAtü	110,92	51,41	51,06	49,30	40,85
AAta	121,83	52,82	50,70	48,94	43,66
ACtü	81,34	57,75	54,58	54,58	42,25
AKtü	58,80	47,18	45,07	44,37	44,37
ARtü	200,70	143,66	129,23	114,08	40,85
AStü	214,08	202,11	179,23	125,35	75,70
ASctü	183,45	139,44	128,87	83,80	75,00
ASRtü	116,55	69,01	54,58	47,89	47,89
AShtü	72,18	63,73	50,35	49,65	47,18
ASitü	68,31	51,06	48,59	47,54	47,18
ATtü	215,14	204,58	185,92	179,58	172,54
Avtü	116,55	76,76	74,30	62,68	62,68
AVitü	160,92	84,51	76,76	52,82	45,42
Asstü	175,35	54,58	53,17	51,76	48,59

Ek 19. Sitotoksisite % canlılık değerleri (DLD-1 kanser hücreleri üzerindeki)

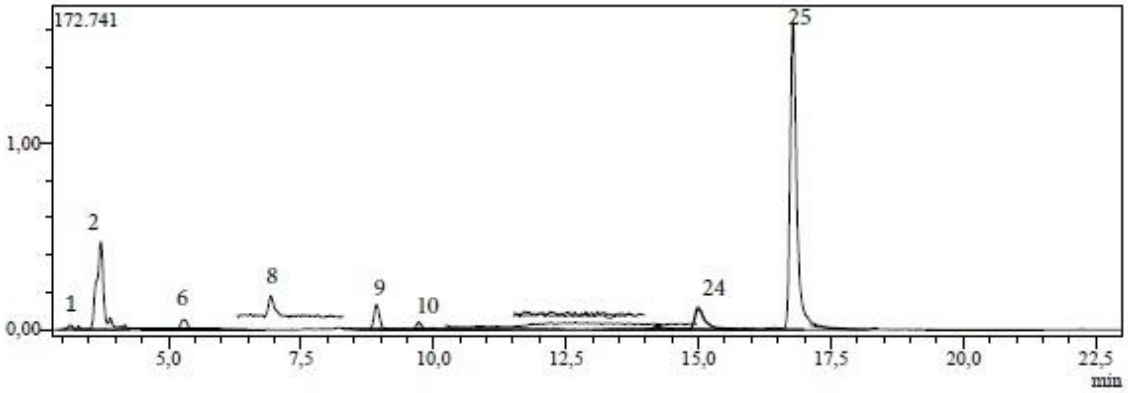
% Canlılık (DLD-1 Hücreleri Üzerindeki)					
Ekstreler	**12,5 µg/mL**	**25 µg/mL**	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**	**200 µg/mL**
AAHta	80,77	77,58	68,02	66,08	57,49
AAtü	40,18	28,95	27,57	25,21	21,06
AAta	63,17	56,80	47,79	38,10	26,88
ACtü	38,30	38,51	38,24	32,42	32,28
AKtü	35,47	33,53	25,77	25,08	24,80
ARtü	108,47	138,12	125,79	104,04	89,91
AStü	158,21	141,17	128,15	75,23	44,05
ASctü	133,27	113,88	108,89	70,38	17,32
ASRtü	78,55	74,39	50,98	43,08	15,10
AShtü	91,30	88,66	86,72	71,62	37,54
ASitü	66,50	34,63	31,03	26,32	22,03
ATtü	161,12	138,26	130,36	112,63	55,00
Avtü	78,55	74,39	50,98	43,08	15,10
AVitü	57,49	52,23	49,46	41,70	41,01
Asstü	71,90	50,29	42,81	27,43	23,41



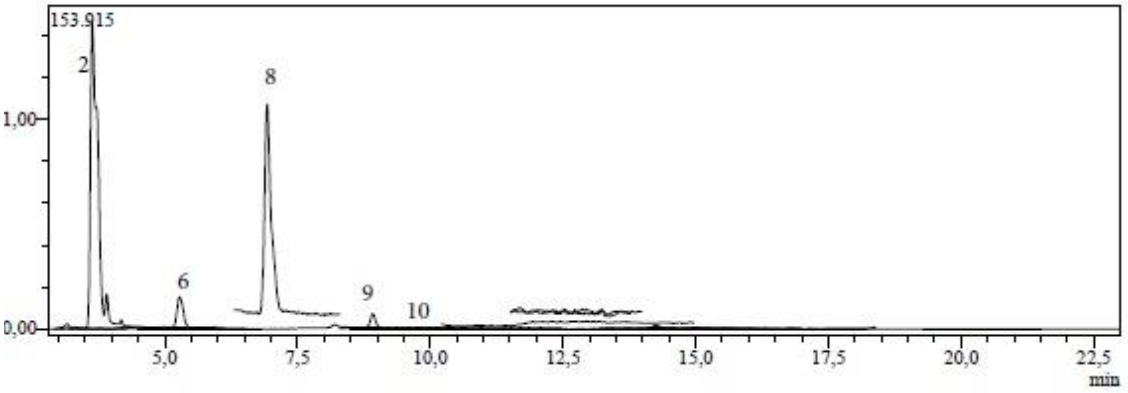
Ek 20. AAHta kısmının LC-MS/MS kromatogramı



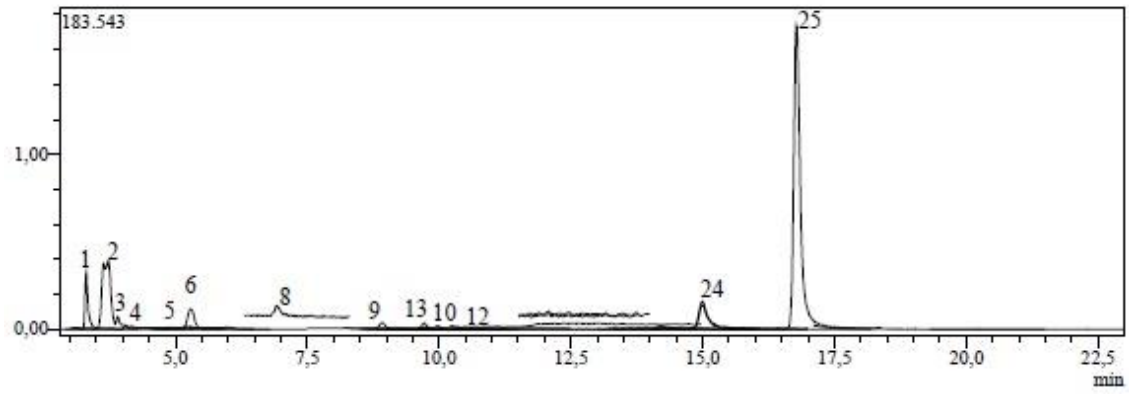
Ek 21. AAVtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



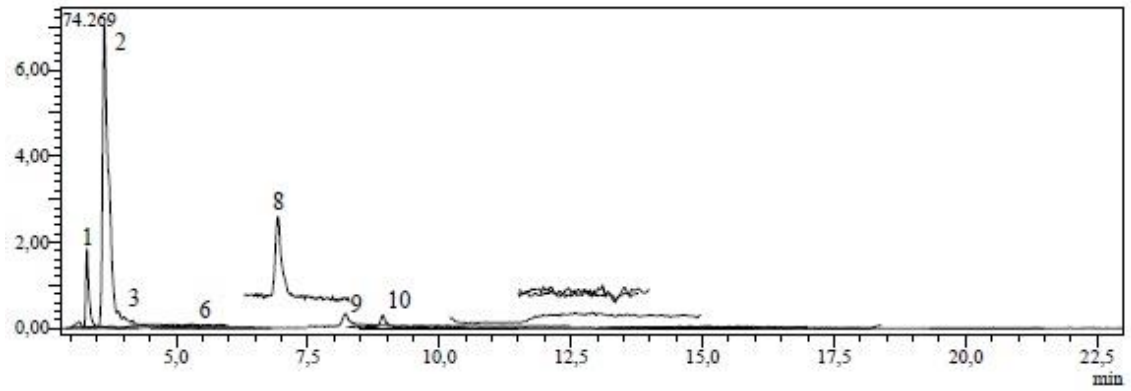
Ek 22. AAtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



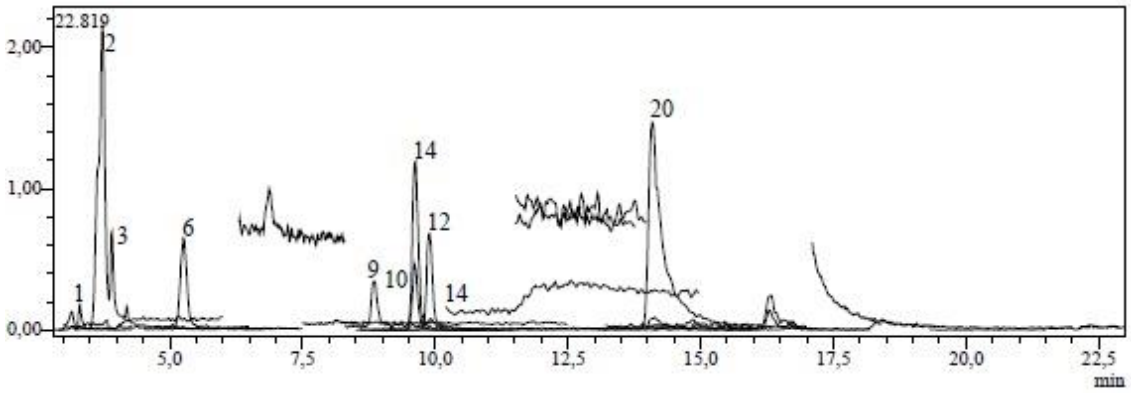
Ek 23. AAta kısmının LC-MS/MS kromatogramı



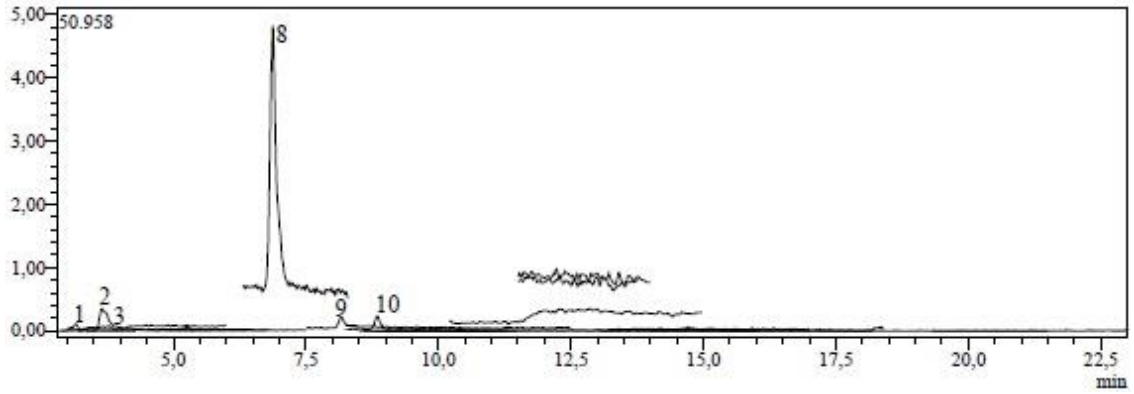
Ek 24. ACtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



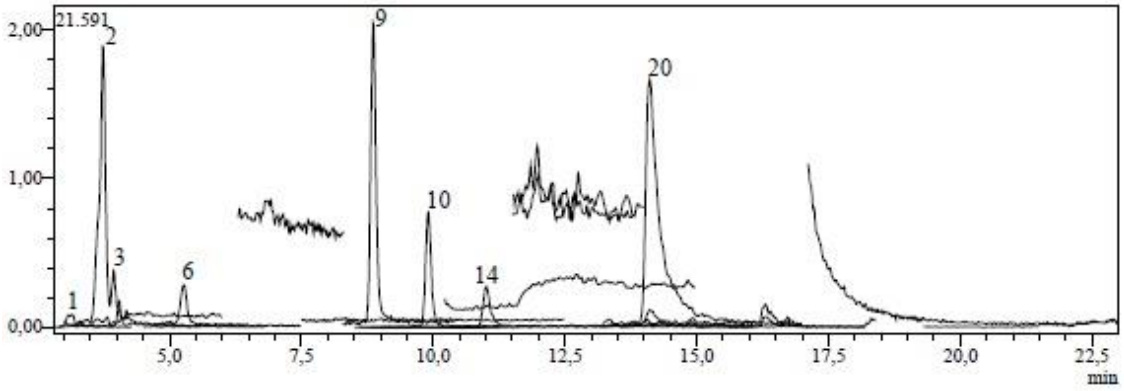
Ek 25. ACta kısmının LC-MS/MS kromatogramı



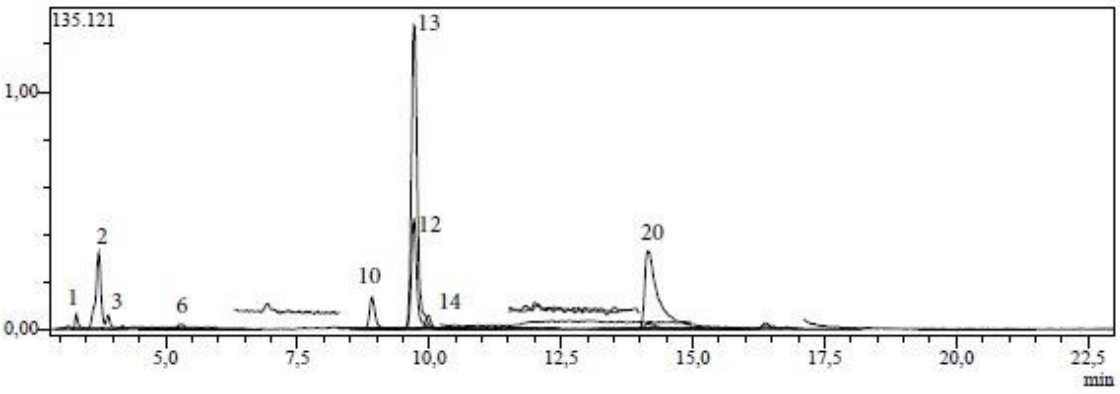
Ek 26. AKtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



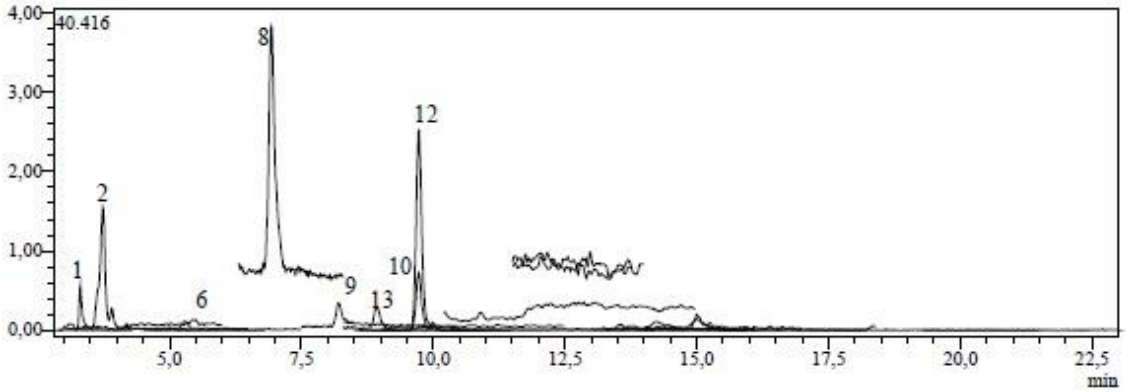
Ek 27. AKta kısmının LC-MS/MS kromatogramı



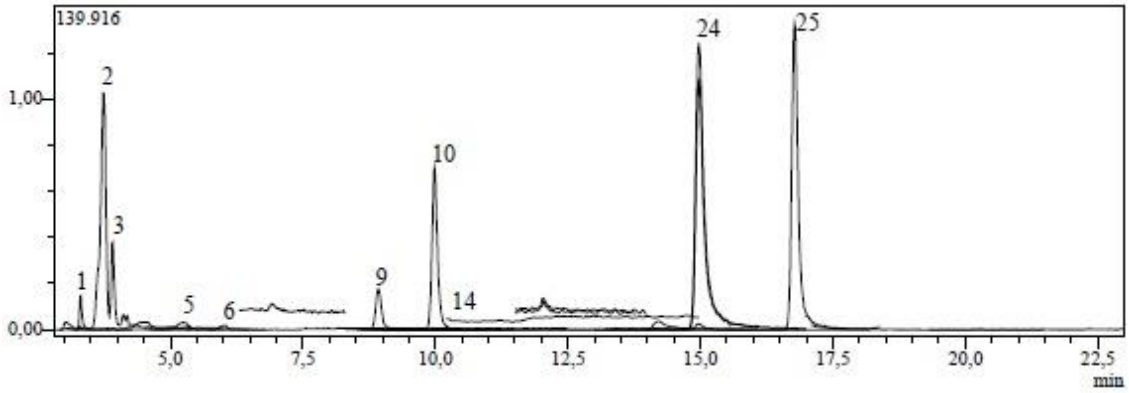
Ek 28. ARtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



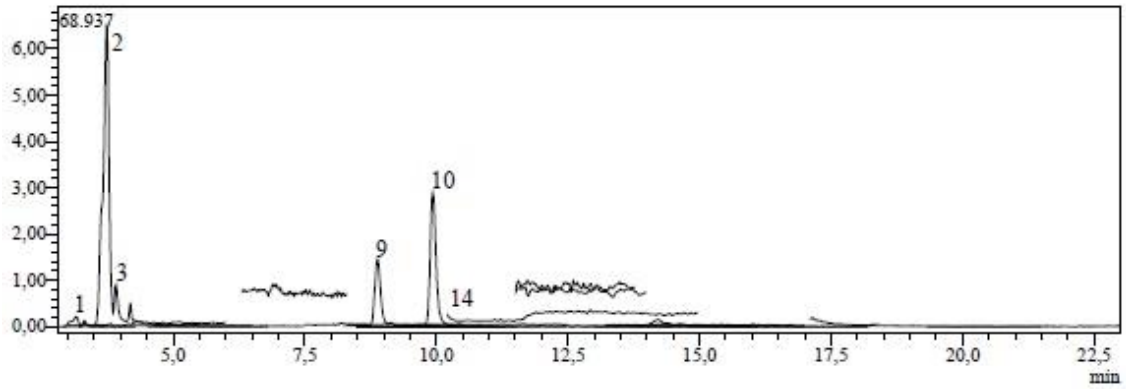
Ek 29. AStü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



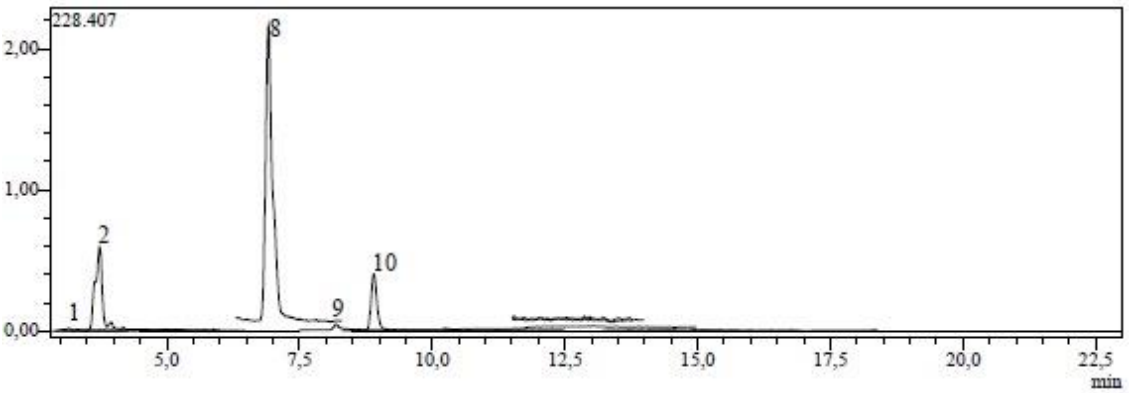
Ek 30. ASta kısmının LC-MS/MS kromatogramı



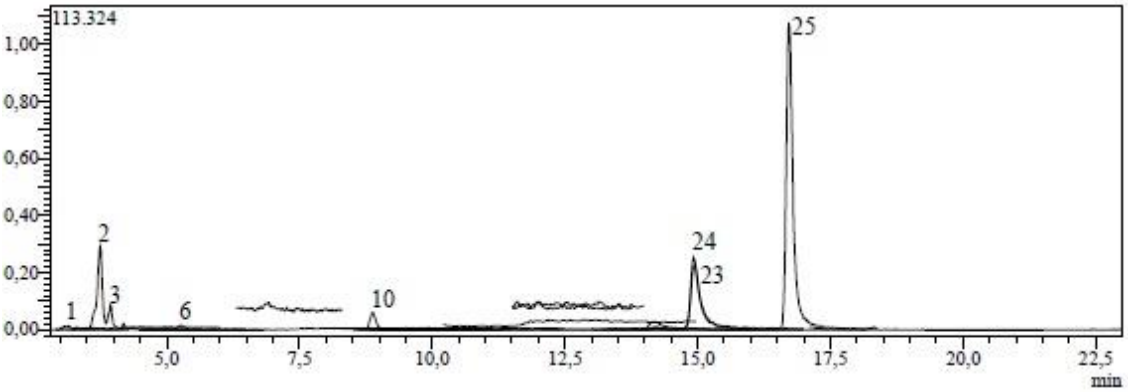
Ek 31. ASctü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



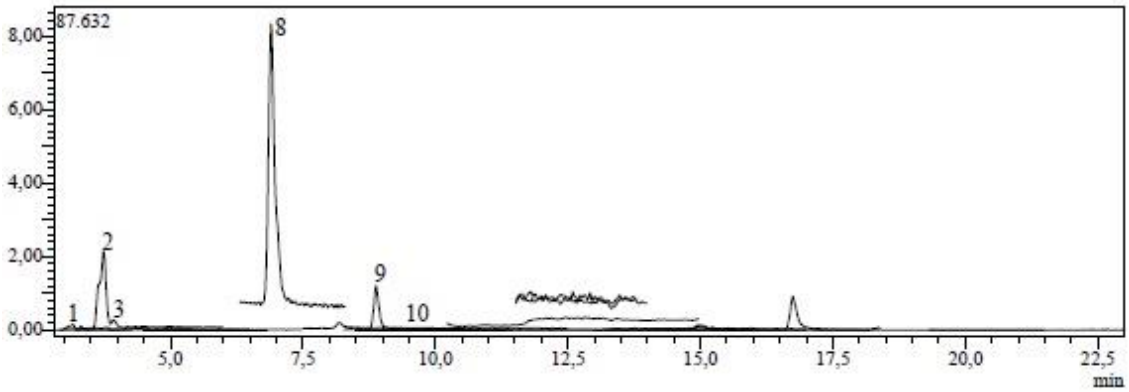
Ek 32. ASRtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



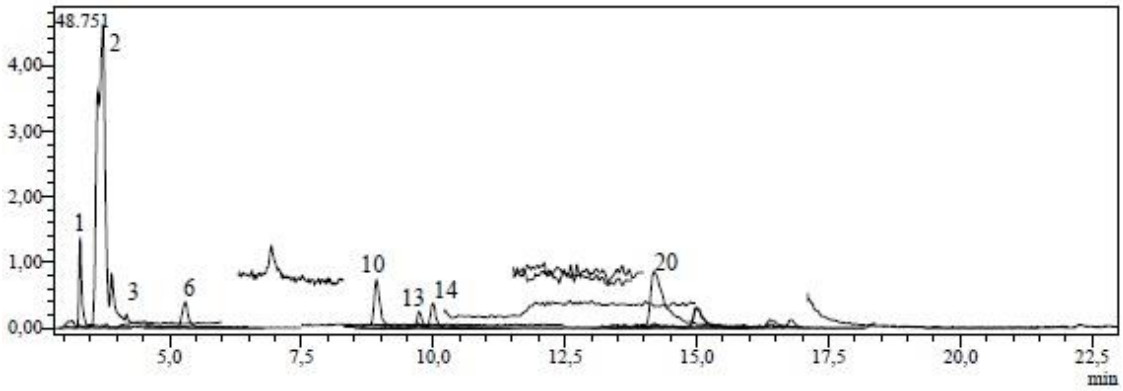
Ek 33. ASRta kısmının LC-MS/MS kromatogramı



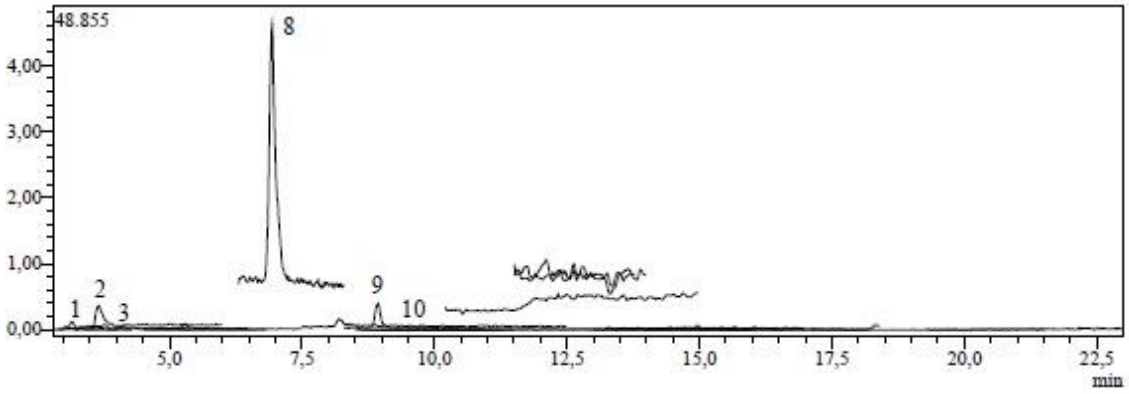
Ek 34. AShtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



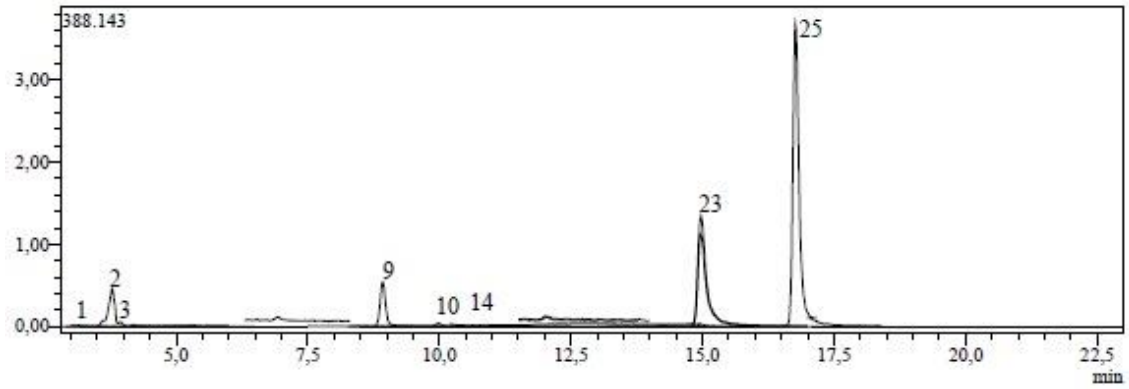
Ek 35. AShta kısmının LC-MS/MS kromatogramı



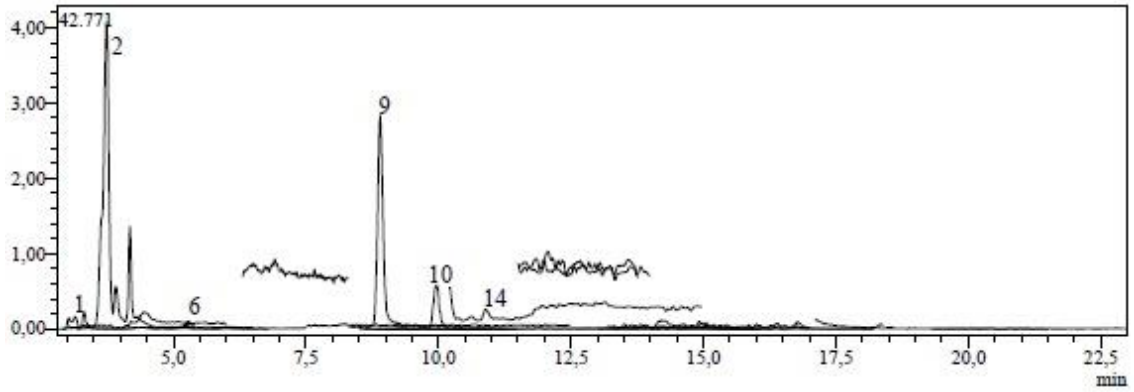
Ek 36. ASitü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



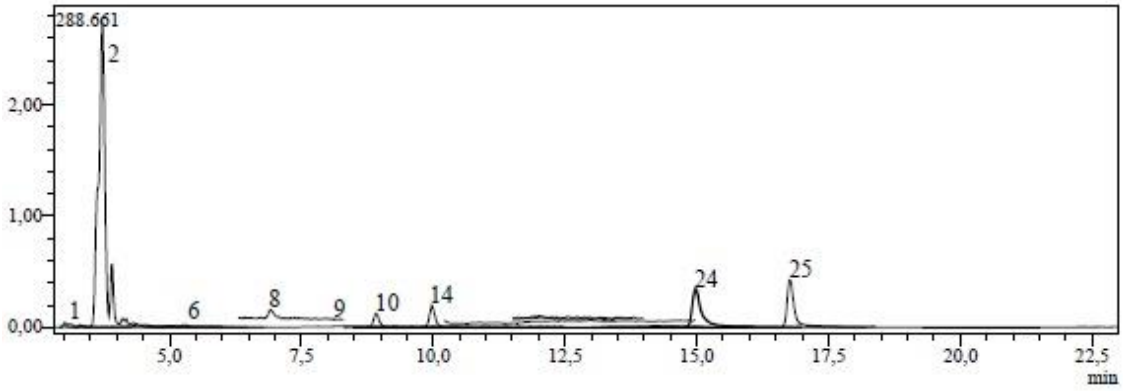
Ek 37. ASita kısmının LC-MS/MS kromatogramı



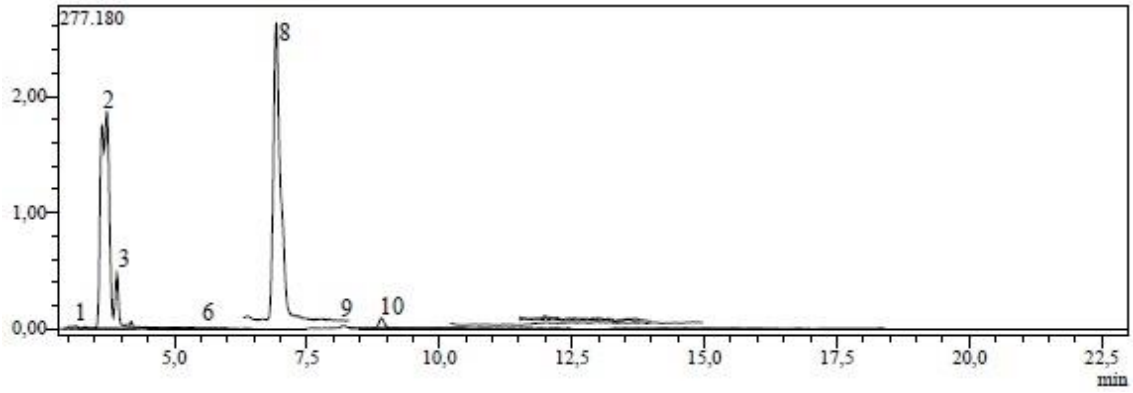
Ek 38. ATtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



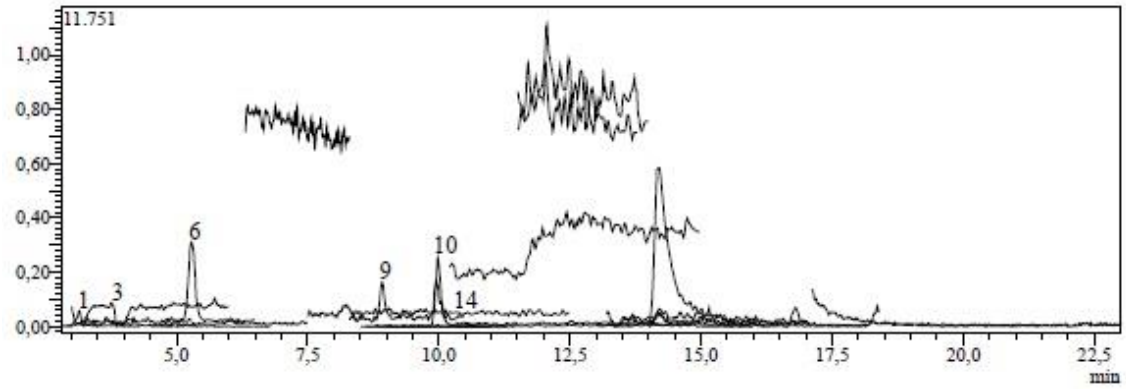
Ek 39. AVtü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



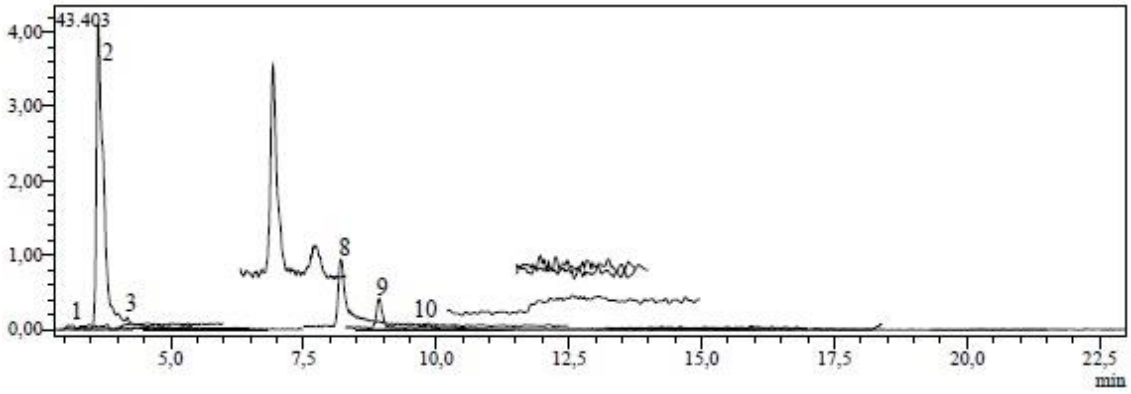
Ek 40. AVitü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



Ek 41. AVita kısmının LC-MS/MS kromatogramı



Ek 42. Asstü kısmının LC-MS/MS kromatogramı



Ek 43. Assta kısmının LC-MS/MS kromatogramı

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı	**:**	Ebubekir İZOL
Doğum Yeri / Tarihi	**:**	Diyarbakır / 7 Ekim 1987
Medeni Hali	**:**	Bekar
Tel	**:**	+90 507 638 99 48
E- mail	**:**	izolebubekir@gmail.com

Eğitim Durumu:

Derece	**Bölüm**	**Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Lisans	Kimya	Dicle Üniversitesi	2012

İş Durumu:

Kurum	**Durum**	**Yıl**
Kalkınma Bakanlığı	Eğitmen	2012-2014
Özel	Mesul Müdür	2014-2016

Çalışmalarımın Sunulduğu Kongreler

Fırat Üniversitesi XIV. Ulusal Spektroskopi Kongresi (Elazığ 2015)

İsops Uluslararası Eczacılık Bilimleri Kongresi (Ankara 2015)

2.İvek Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi (İstanbul 2015)