

ÖZET

Bu çalışmada, fenolik bileşikler, Ahlat yapraklarından ultrason destekli yöntemle ekstrakte edildi. Ekstraksiyon parametreleri (sonikasyon sıcaklığı, süresi, metanol ve etanol konsantrasyonu) ahlat yapraklarında toplam fenolik madde, 1,1-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) belirlemek amacıyla, Yanıt Yüzey Metodolojisi (RSM) kullanılarak optimize edildi. Optimum koşullarda (60°C, 22 dakika, %50 metanol konsantrasyonu) ulaşılan maksimum toplam fenolik madde içeriği 4385.56 mgGAE/100g, DPPH inhibisyonu %51.84 ve CUPRAC 470.45 mmolTR/g olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda (60°C, 24 dakika, 41.66 etanol konsantrasyonu) ulaşılan maksimum toplam fenolik madde içeriği 4642.06 mgGAE/100g, DPPH inhibisyonu %44.61, CUPRAC 457.24 mmolTR/g. RSM. Elde edilen sonuçlar, optimize ekstraksiyon koşullarında ultrason uygulamasının ahlat yaprağı fenolik bileşenlerin geri kazanımında etkili bir yöntem olduğunu ayrıca ahlat yaprağının yüksek oranda fenolik bileşen içeren fonksiyonel bir besin kaynağı olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: ahlat yaprağı, antioksidan aktivite, ultrason destekli ekstraksiyon

GİRİŞ

Bitkiler tarih boyunca insanlar için hem besin hem de ilaç kaynağı olmuştur. Bitkiler içindeki etken maddeler sayesinde tedavi edici ve sağlıklı beslenmek için kullanılmaktadır. Ahlat bitkisi de bu bitkilerden biridir. Ülkemizde yaygın olarak yetişen ahlat bitkisi, yabancı armut olarak da bilinmektedir. Yaprakları demlenerek çay olarak tüketilmektedir. Ahlat bitkisi kalbi güçlendirmektedir. Sinir sistemine ve vücut direncine olumlu etkileri vardır. Ayrıca yorgunluğu giderdiği ve kanı sulandırdığı da bilinmektedir. Bu nedenle bitkilerdeki etken maddeler araştırılması dikkat çekici çalışmalardan biridir. Bitkilerin doğal antioksidan kaynağı olduğu bilinmektedir. Antioksidan, oksidasyonu engelleyen veya azaltan, dokularda oluşan serbest radikallerin hasarını önleyerek çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etki gösteren moleküllerdir. Antioksidanların yapılarında bulunan moleküller fenolik fonksiyon içermektedir. Fenolik bileşikler, bitkilerin acılığına, burukluğuna, rengine, aromasına, kokusuna ve oksidatif stabilitesine etki etmektedir. Bunun yanında, fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri gıdalardaki ve vücutta istenmeyen radikalleri önlemektedir. Bunlar özel ekstraksiyon yöntemleri, ayırıştırma saflaştırma işlemleri ile elde edilen bitkilerde en yaygın bulunan bileşiklerdir. Bu çalışmada ahlat bitkisi yaprağının fenolik bileşik ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.



MATERYAL VE YÖNTEM

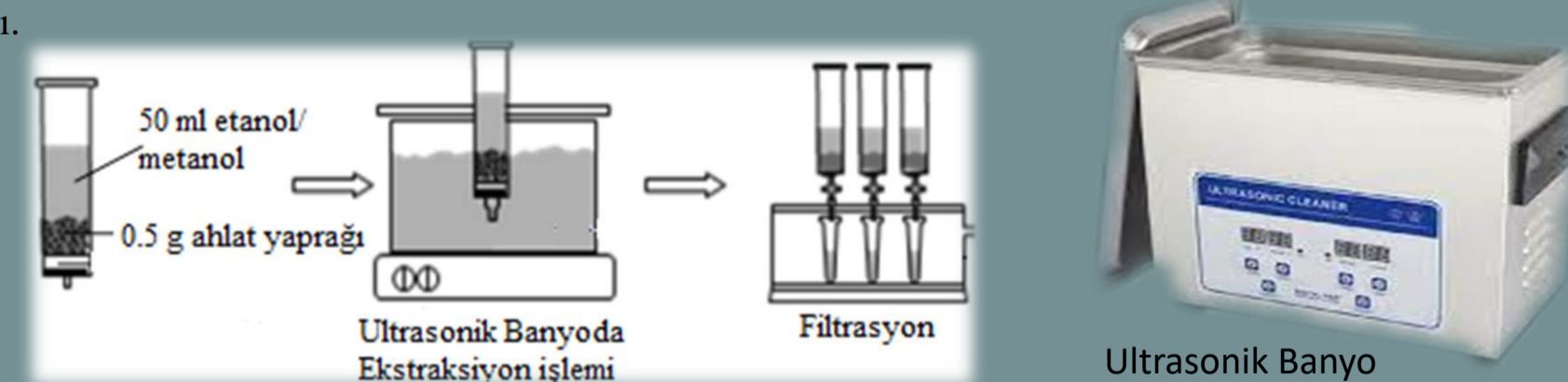
Çalışmada kullanılan ahlat yaprakları Balıkesir bölgesinde toplanmış ve güneş ışığına maruz kalmadan kurutulmuştur. Yapraklar ekstraksiyon işlemi için öğütülmüştür.

Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Kurutulan yapraklardan 0,5g/50 ml oranında numuneler hazırlanmıştır. Ekstraksiyon, sonikasyon sıcaklığı (40°C, 50°C ve 60°C), sonikasyon süresi (20, 30 ve 40 dakika) ve etanol/metanol konsantrasyonu (%25, %37.5 ve %50) parametrelerinde gerçekleştirilmiştir. Falcon tüpleri oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir. Daha sonra ekstraktlar filtre kağıdından süzülümüştür.

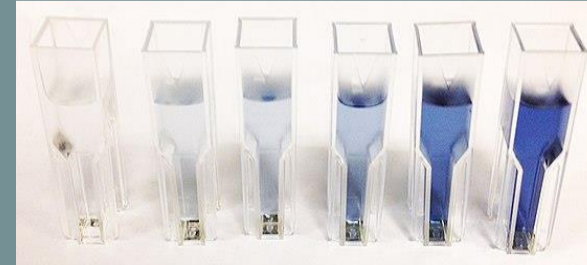
DeneySEL Tasarım

Ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen ahlat yapraklarının TPC, CUPRAC ve antioksidan aktiviteleri Minitab 18 yazılımı kullanılarak optimize edilmiştir. Ahlat yapraklarının TPC, CUPRAC ve DPPH süpürme aktivitesini maksimize etmek için gereken ekstraksiyon değişkenlerinin optimum kombinasyonlarını belirlemek amacıyla Box-Behnken faktöriyel tasarımı kullanan yanıt yüzey metodolojisi kullanıldı.



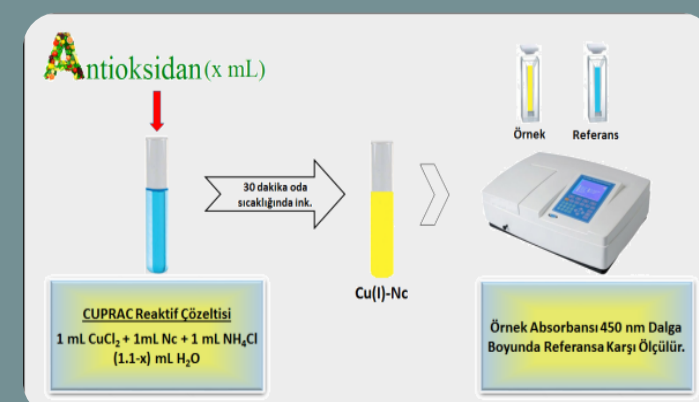
Toplam Fenolik Madde Tayini

100 µL numune analiz tüpüne konulmuştur ve 900 µL su eklenmiştir. Ardından 5 mL 0.2 N Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir ve karışım için 3 dakika tutulmuştur. Daha sonra 4 mL doymuş Na₂CO₃ solventi eklenmiştir ve karışım 90 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda köre karşı 720 nm dalga boyunda absorban ölçülmüştür. Standart eğriyi oluşturmak için %75 MeOH içindeki galik asit kullanılmıştır.



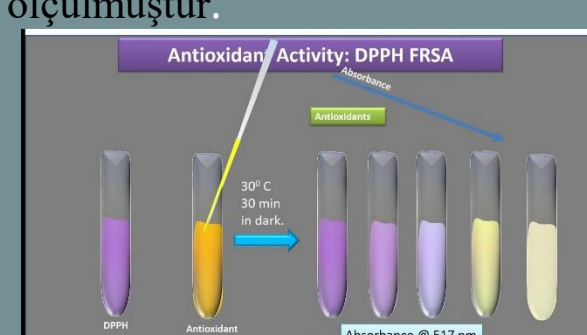
CUPRAC Metodu

Yaklaşık 100 µL numune bir analiz tüpüne alınmıştır ve 1 mL CuCl₂·2H₂O solventi, 1 mL Neocuproine, 1 mL NH₄Ac tamponu ve 1 mL saf su sırasıyla eklenmiştir. Karışım 30 dakika tutulduktan sonra 450 nm dalga boyunda bir köre karşı absorban ölçülmüştür.



DPPH Metodu

2 mL 0.1 mM DPPH, bir test tüpünde 100 µL numune ile karıştırılmıştır. Örnekler karanlık ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Absorban, metanole karşı 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür.



BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, ekstraksiyon değişkenlerinin fenolik içerik ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır ve optimum kombinasyonları belirlenmiştir.

Bağımsız Değişken	Bağımlı Değişken					
	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Metanol Konsantrasyonu (%)	DPPH (%inh)	CUPRAC (mmol TR/g)	TPC (mg GAE/100g DW)
1	40	20	37.5	41.75	444.65	2190.67
2	60	20	37.5	51.85	463.58	4142.75
3	40	40	37.5	42.17	447.07	3028.68
4	60	40	37.5	47.13	459.15	4093.46
5	50	20	25	30.97	459.15	4132.89
6	50	40	25	40.40	398.73	2742.77
7	50	20	50	40.74	466.40	3955.43
8	50	40	50	36.70	427.73	3639.94
9	40	30	25	42.76	437.40	2437.14
10	60	30	25	51.17	461.57	2713.20
11	40	30	50	42.08	545.24	2742.77
12	60	30	50	47.13	463.58	4458.24
13	50	30	37.5	38.72	422.90	4162.47
14	50	30	37.5	38.72	422.90	4162.47
15	50	30	37.5	38.72	422.90	4162.47

Tablo 1. UAE tarafından elde edilen ahlat yaprağı ekstraktlarının TPC, CUPRAC ve DPPH süpürme aktivitelerinin optimizasyonu için ekstraksiyon parametrelerinin Box-Behnken tasarımı.

Bağımsız Değişken	Bağımlı Değişken					
	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Etanol Konsantrasyonu (%)	DPPH (%inh)	CUPRAC (mmol TR/g)	TPC (mg GAE/100g DW)
1	40	20	37.5	39.05	444.65	2111.80
2	60	20	37.5	46.46	466.40	4310.36
3	40	40	37.5	42.08	449.48	2486.44
4	60	40	37.5	47.13	379.40	4251.20
5	40	30	25	41.07	454.32	3186.43
6	60	30	25	21.88	463.58	4280.78
7	40	30	50	7.74	454.32	3186.43
8	60	30	50	41.75	466.40	4359.65
9	50	20	25	46.12	459.15	3196.29
10	50	40	25	37.71	420.48	3866.70
11	50	20	50	30.97	466.40	2299.12
12	50	40	50	39.39	463.58	3166.71
13	50	30	37.5	41.75	425.32	5148.37
14	50	30	37.5	41.75	425.32	5148.37
15	50	30	37.5	41.75	425.32	5148.37

Tablo 2. UAE tarafından elde edilen ahlat yaprağı ekstraktlarının TPC, CUPRAC ve DPPH süpürme aktivitelerinin optimizasyonu için ekstraksiyon parametrelerinin Box-Behnken tasarımı.

Yanıt Değişkeni	Optimum Ekstraksiyon Koşulları			Maksimum Değerler	
	Sonikasyon Sıcaklığı (°C)	Sonikasyon Süresi (dakika)	Etanol/ Metanol Konsantrasyonu (%)	Tahmini	DeneySEL
Birleşik Yanıtlar					
TPC (mg GAE/100g DW)	60	22	50	4385.56	3496.98(355.540)
DPPH (% inhibisyon)				51.84	54.03(6.908)
CUPRAC (mmol TR/g)				470.45	355.23(71.794)
Birleşik Yanıtlar					
TPC (mg GAE/100g DW)	60	24	41.66	4642.06	3447.69(37.938)
DPPH (% inhibisyon)				44.61	52.50(8.370)
CUPRAC (mmol TR/g)				457.24	360.07(1.771)

Tablo 3. Optimum koşullar altında elde edilen tahmini ve deneySEL değerlerin doğrulanması.

Bu çalışmada etanol konsantrasyonunda TPC (46.42 mgGAE/g) ve DPPH (44.61) için optimum şartlar 60°C, 22 dakika ve %41.66 etanol konsantrasyonu iken Keçeci (2018) tarafından yapılan ahlat yaprağı çalışmasında ise ekstraksiyonun 45. dakikasında optimum değer olarak 85 mgGAE/g tespit edilmiş ve optimum ekstraksiyon süresi 45 dakika olarak belirlenmiştir. DPPH' da ise 75. dakikasında en yüksek değer olarak %60 inhibisyon tespit edilmiş ve DPPH için optimum ekstraksiyon süresi 75 dakika olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın etkisinde ise yine Keçeci (2018) TPC için optimum sıcaklığı 40°C' de 90 mgGAE/g ile belirlenmiş ve DPPH için de 40°C' de %60-65 olarak belirlenmiştir. Konsantrasyon etkisinde ise TPC için optimum konsantrasyon %60' lık konsantrasyonda 100 mgGAE/g olarak belirlenmiştir ve DPPH için de optimum konsantrasyon %60 olarak belirlenmiştir.

SONUÇ

Bu çalışmada ahlat yaprağının antioksidan özelliklerinin RSM kullanılarak optimizasyonu incelenmiştir. Bağımsız değişkenlerin (Sonikasyon sıcaklığı, Sonikasyon süresi, metanol/etanol konsantrasyonu) ahlat yaprağındaki toplam fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitesini ne ölçüde etkilediği araştırılmıştır. DPPH, CUPRAC ve TPC değerlerinin tahmini değerleri ile deneySEL değerleri arasında farklılık olup olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda optimize ekstraksiyon koşullarında ultrason uygulamasının ahlat yaprağı fenolik bileşenlerin geri kazanımında etkili bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ahlat yaprağının yüksek oranda fenolik bileşen içeren fonksiyonel bir besin kaynağı ve gıdalarda potansiyel antioksidan katkı maddesi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKÇA

- Ercişli, S. (2004). A short review of the fruit germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51(4), 419-435.
- Findıck, G. (2019). *Bazı rosaceae bitkilerinin yapraklarının antidiyabetik ve antioksidan kapasitelerinin in vitro incelenmesi* (Master's thesis, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 3954-3962.
- Keçeci, S. (2019). *Afyonkarahisar Büyükşehir Belediyesi florasına ait ahlat (pyrus elaeagnifolia) bitkisi özütünün bazı kimyasal özelliklerinin incelenmesi* (Master's thesis).
- Nacz, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Uğurtan Yılmaz, K., Ercişli, S., Cam, M., Uzun, A., Yılmaztekin, M., Kafkas, E., & Pinar, H. (2015). Fruit weight, total phenolics, acidity and sugar content of edible wild pear (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.) fruits. *Erwerbs-Obstbau*, 57(4), 179-184.