

ADAÇAYI UÇUCU YAĞ ELDESİNDEN SONRA ARTA KALAN ÜRÜNLERİN BİYOAKTİF POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Yasemin İncegöl^{1*}, Mustafa Çam²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri, Türkiye

Geliş / Received: 06.02.2019; Kabul / Accepted: 24.06.2019; Online baskı / Published online: 19.07.2019

İncegöl, Y., Çam, M. (2019). Adaçayı uçucu yağ eldesinden sonra arta kalan ürünlerin biyoaktif potansiyellerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (4): 629-640 doi: 10.15237/gida.GD19038

İncegöl, Y., Çam, M. (2019). Determination of the bioactive potentials of sage (*Salvia officinalis* L.) by product after removal of essential oil. *GIDA* (2019) 44 (4): 629-640 doi: 10.15237/gida.GD19038

ÖZ

Adaçayı (*Salvia officinalis* L.), bitkisel çay, baharat ve gıda tatlandırıcısı olarak kullanılan, çok sayıda biyoaktif bileşen içeren, *Lamiaceae* familyasından önemli bir tıbbi bitkidir. Bu çalışmada, hidrodistilasyon ile adaçayı uçucu yağları uzaklaştırılıp, arta kalan sulu kısım ve atık yaprakların bileşimi incelenmiştir. Kurutulmuş adaçayı yaprakları 1 ve 2 saat olarak hidrodistilasyon yöntemi ile ekstrakte edilip arta kalan yapraklar tekrar kurutulmuş sırasıyla etil asetat ve etanol çözümleri ile Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen sulu (Hidrosol1, Hidrosol2), etanollü (Etanol1, Etanol2) ve etil asetatlı (Etilasetat1, Etilasetat2) ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri, DPPH, ABTS ve β -karoten ağartma metodları kullanılarak antioksidan aktiviteleri kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Test edilen ekstraktlar arasında toplam fenolik madde miktarı (60.63 mg GAE/g), toplam flavonoid miktarı (40.23 mg KE/g), radikal süpürme gücü ((DPPH (95.00 mg TEAC/g) ve ABTS (92.00 mg TEAC/g)) açısından en yüksek değer 2 saat hidrodistilasyon sonucu elde edilen Hidrosol2 örneğine ait bulunurken en yüksek antidiyabetik aktivitenin IC₅₀ (1.32) Etil asetat1 örneğine ait olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Adaçayı, ekstraksiyon, fenolik, antioksidan, antidiyabetik

DETERMINATION OF THE BIOACTIVE POTENTIALS OF SAGE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) BY PRODUCT AFTER REMOVAL OF ESSENTIAL OIL

ABSTRACT

Sage (*Salvia officinalis* L.) is an important medicinal plant of the *Lamiaceae* family, which is contains many bioactive components and is used as herbal tea, spice and food seasoning. In this study, the essential oils of sage were removed by hydrodistillation and the composition of the remaining residual floral water and waste leaves were investigated. Dried sage leaves were extracted with hydrodistillation method for 1 and 2 hours and the remaining leaves were dried again and subjected to Soxhlet extraction first with ethyl acetate and then ethanol. Total phenolic, flavonoid contents, α -glucosidase inhibition activities and antioxidant activities by using DPPH, ABTS, and β -carotene methods in aqueous (Hydrosol1, Hydrosol2), ethanolic (Ethanol1, Ethanol2) and ethyl acetate (Ethyl acetate1, Ethyl acetate2) extracts were determined by colorimetric methods. Among the different extracts tested, Hydrosol2, obtained from 2 h distillation, displayed the highest scores in terms of the total amount of phenolics (60.63 mg GAE/g), the total flavonoid content (40.23 mg CE/g), radical scavenging power ((DPPH (95.00 mg TEAC/g) and ABTS (92.00 mg TEAC/g)), while the highest antidiabetic activity (as IC₅₀ value) was determined in Ethyl acetate1 sample as 1.32.

Keywords: Sage, extraction, phenolic, antioxidant, antidiabetic

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ yaseminincegul@sdu.edu.tr,

☎ (+90) 246 211 16 32

☎ (+90) 246 237 08 59

GİRİŞ

Türkiye, zengin florası ile birçok tıbbi ve aromatik bitkiye ev sahipliği yapmaktadır. İnsanlığın varoluşundan beri, bitkiler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel ilaçlarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Bitkilerin ürettiği primer ve sekonder metabolitler ilaç endüstrisinin en temel bileşenleridir. Tıbbi ve aromatik bitkiler çok büyük bir sınıfları kapsamakta ve genel olarak bünyelerinde bulundukları etken madde, kullanım alanı ve farmakolojik etkilerine göre sınıflandırılmaktadırlar (Bayram vd., 2010). Adaçayı (*Salvia officinalis*) Balıbabagiller (*Lamiaceae*) familyasına ait hoş kokulu, tek, iki veya çok yıllık otsu veya çalimsı bitkilerdir. Uçucu yağlar, alkoloider ve tanenler bitki bünyesinde bulunan etken maddelerin bazı önemli gruplarıdır (Şenkal vd., 2016). *Salvia officinalis* bitkisinin yaprakları, çiçekleri ve uçucu yağı kullanılan kısımlarıdır. Yapraklarda bulunan salgı tüyleri uçucu yağların yoğun olarak bulunduğu kısımdır ve yağ oranı % 0.5-2.5 aralığındadır. Tıbbi adaçayı uçucu yağının en önemli bileşenleri α -tuyon, β -tuyon, 1,8-sineol ve kamfordur. Uçucu yağın α -tuyon oranı % 1-45, β -tuyon oranı % 1-40 ve kamfor oranı % 0.4-44 olarak belirlenmiştir (Başyigit ve Baydar, 2017). Adaçayı içerdiği flavonoid, fenolik glikozit, fenolik asit türevleri ve uçucu yağ bileşenleri sayesinde antioksidan ve antimikrobiyal özellik göstermektedir (Torun vd., 2008; Emir Çoban ve Patır, 2010). Yürütülen çalışmalarda adaçayı antioksidan özelliğinin, karnosik asit, rosmarinik asite ilaveten flavonoidler, terpenler ve fenolik asitlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Lu ve Yeap Foo, 2001).

Adaçayı, gerek geleneksel demleme yöntemiyle gerekse süzen poşet şeklinde bitkisel çay olarak tüketimine ek olarak uçucu yağları da ayrıldıktan sonra değişik amaçlarla da kullanılan bir üründür. Ancak uçucu yağ uzaklaştırıldıktan sonra arta kalan kısım biyolojik öneme sahip fenolik madde, aminoasit ve monosakkarit türevleri içermektedir (Torun vd., 2008). Sulu kısımda bulunan materyaller biyolojik olarak aktif bileşikler

oldukları için atık olarak değil gıda, ilaç, kozmetik gibi sektörlerde yardımcı madde olarak değerlendirilmeye uygun gözükmektedir. Bu çalışma ile, adaçayı uçucu yağları alındıktan sonra arta kalan sulu kısmın ve atık yaprakların biyolojik potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

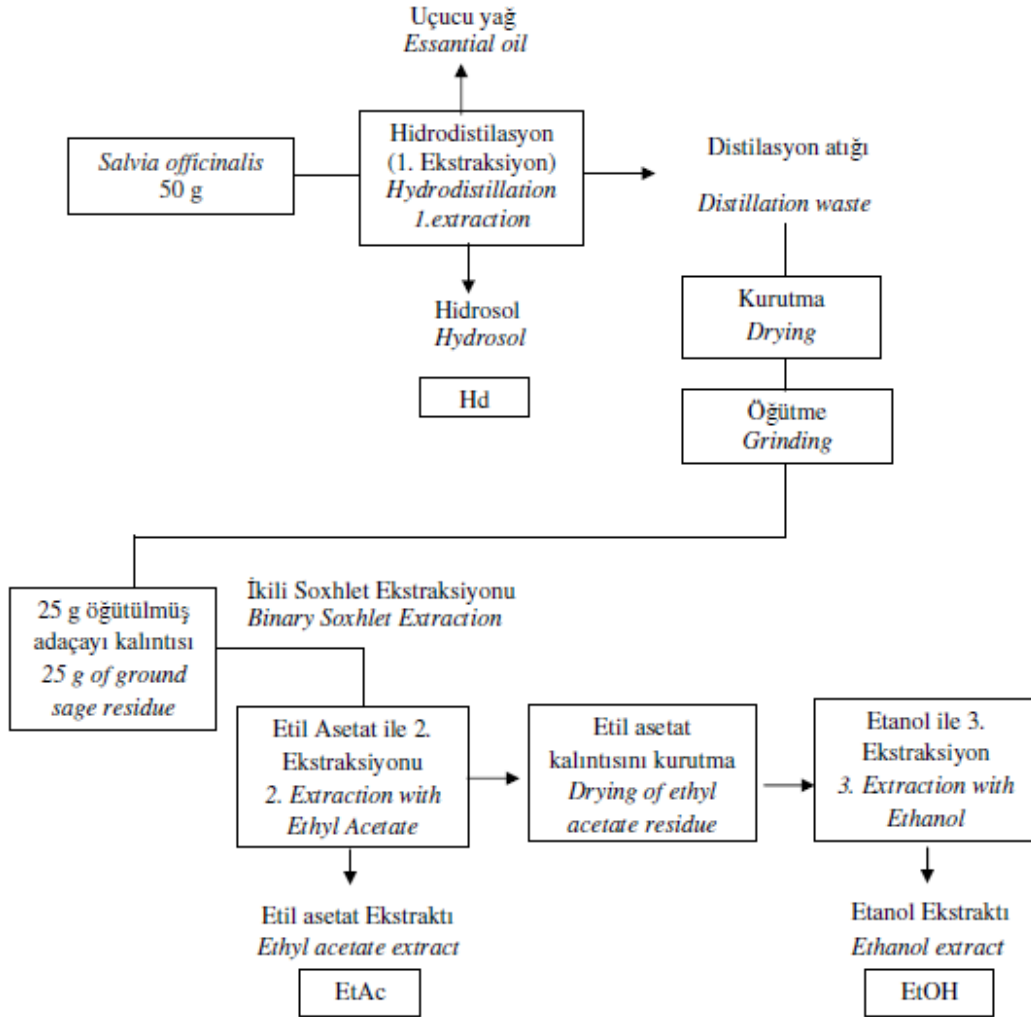
Çalışmada kullanılan adaçayı (*Salvia L.*) ulusal çapta bayilikleri bulunan Arifoğlu firmasından kuru formda temin edilmiştir. Bitkisel materyaldeki kusurlu yapraklar ayıklanmış ve saplarından ayrılarak kullanılmıştır.

Bitkisel Materyalin Ekstraksiyonu

50 g adaçayı yaprağı üzerine 500 mL saf su eklenerek Clevenger düzeneğinde 1 ve 2 sa hidrodilasyon işlemi uygulanarak sulu ekstraktlar (Hd₁ ve Hd₂) elde edilmiş ve hacimleri saf su ile 350 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen retant (adaçayı yaprakları) 50 °C'de etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş yapraklardan 25 g tartılıp üzerlerine 250 mL etil asetat (EtAc) çözgeni ilave edilerek Soxhlet cihazında 6 sa ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Etil asetat çözgeni kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası elde edilen kalıntı yapraklar etüvde tekrar kurutulmuş ve 25 g kalıntı üzerine 250 mL etanol (EtOH) çözgeni ilave edilerek Soxhlet cihazında 6 sa ekstraksiyon işlemine tabi tutularak süzümüştür (Tsimogiannis vd., 2017). Alınan ekstraktlardaki etil asetat ve etanol döner evaporatörde uçurularak son hacimleri etil asetat ve etanol ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Ekstraksiyon prosedürü akış şeması Şekil 1'de gösterilmiştir.

Toplam Fenolik Madde Tayini

Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (TFMM) Folin-Ciocalteu fenol ayırıcı kullanılarak Singleton ve Rossi., (1965) tarafından tanımlanan Li vd. (2006) tarafından modifiye edilen metot ile belirlenmiştir (Li vd., 2006). Folin-Ciocalteu fenol ayırıcı (2 mL), örnek (0.4 mL) veya standart gallik asit çözeltileri (0.4 mL) ve % 7.5 Na₂CO₃ çözeltisi (1.6 mL) karıştırılıp, oda sıcaklığında 1 sa bekletildikten sonra 765 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüş ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek olarak hesaplanmıştır.



Şekil 1. Ekstraksiyon prosedürü akış şeması
Figure 1. Flow chart of extraction procedure

Toplam Flavonoid Tayini

Örneklerin toplam flavonoid miktar (TFM) analizi Zhinsen vd. (1999) metodu temel alınarak yapılmıştır (Zhishen vd., 1999). Saf su (4 mL) bulunan tüplere ekstrakt (1 mL) ve %5'lik NaNO₂ (0.3 mL) ilave edilerek 5 dk beklenmiştir. Bekleme sonunda %10'luk AlCl₃ (0.3 mL) eklenip 6. dk'da 1 M NaOH (1 mL) ile karıştırıldıktan sonra hacimler saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Pembe renkli bir karışım elde edilmiş ve absorbans değerleri 510 nm'de spektrofotometrede okunarak toplam flavonoid

miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar mg kateşin eşdeğeri (KE)/g örnek olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan Aktivite

DPPH ile Antioksidan Aktivite Analizi

Örneklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde DPPH radikali kullanılmıştır. Singh vd. (2002) tarafından geliştirilen, Çam vd. (2009) tarafından düzenlenen metot tercih edilmiştir (Çam vd., 2009). Metanol içerisinde çözüldürülen 0.1 mM DPPH (3.9 mL) tüplere aktararak üzerine ekstrakt (0.1 mL) eklenip 30 dk karanlık ortamda bekletilerek süre sonunda 517

nm dalga boyunda absorbanans değerleri okunmuştur. Örneklerin radikal süpürme aktiviteleri % olarak hesaplanıp, sonuçlar mg trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC)/g örnek olarak verilmiştir.

ABTS Metoduyla Antioksidan Aktivite Analizi

Örneklerin antioksidan aktivite tayini ABTS radikal katyonu kullanılarak Re vd. (1999) metoduna göre yapılmıştır (Re vd., 1999). ABTS⁺ stok çözeltisi hazırlanarak fosfat tamponu ile seyreltilip 734 nm dalga boyunda absorbanansı 0.7'ye ayarlanmıştır, 2 mL hacimli küvetlere örnek (20-40-60-80 µL, kör çözelti için 20 µL tampon) ve ABTS⁺ (2 mL) eklenerek karanlık ortamda 6 dk bekletildikten sonra 734 nm'de absorbananslar okunmuştur. Örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplanıp, mg trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC)/g örnek şeklinde ifade edilmiştir.

β-karoten Ağartma Testi ile Antioksidan Aktivite Analizi

Adaçayından alınan ekstraktların antioksidan aktivite (AA) analizi Singh vd. (2002) metoduna göre yapılmıştır (Singh vd., 2002). Sonuçlar % AA şeklinde belirtilmiştir. Metot uygulanırken ilk olarak β-karoten (0.2 mg), linoleik asit (20 mg) ve tween-40 emülgatörü (200 mg) kloroform (0.2 mL) içinde çözündürülüp, kloroform azot akımı altında uzaklaştırılarak hacmi 15 mL'ye oksijenli su ile tamamlanarak β-karoten emülsiyonu hazırlanmıştır. Kör çözelti hazırlamak için solüsyon aşamasındaki işlemler β-karoten olmadan saf su (0.2 mL) ile tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (Hd₁, Hd₂ 500 ve 1000 mg/l; EtAc₁, EtAc₂, 50 ve 200 mg/l; EtOH₁, EtOH₂ örnekleri ise 750 mg/l) ekstraktlar hazırlanmıştır. Kontrol çözeltisi için saf su (0.2 mL) ve örnekler için ekstraktlar (0.2 mL) tüplere alınarak üzerlerine β-karoten emülsiyonu (4 mL) eklenmiştir. 470 nm dalga boyunda kör çözeltiye karşı başlangıç absorbanans değerleri ölçülerek 50 °C'lik su banyosuna yerleştirilen örneklerin absorbanansları her 10 dk'da bir okunmuştur. % AA değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$A\% = 100 \left[1 - \left(\frac{A_0 - A_t}{A_0^0 - A_t^0} \right) \right]$$

A₀: Örneğin başlangıç absorbanansı

A_t: Örneğin 120 dk inkübasyon sonundaki absorbanansı

A₀⁰: Kontrolün başlangıç absorbanansı

A_t⁰: Kontrolün 120 dk inkübasyon sonundaki absorbanansı

Alfa-Glukozidaz Aktivite Testi

Örneklerdeki fenolik maddelerin alfa-glukozidaz enzimi üzerine etkisi McDougall vd. (2005) tarafından oluşturulan enzimatik/spektroforometrik metoda göre belirlenmiştir (McDougall vd., 2005). Örneklerin enzimi inhibe etme durumları, enzimin aktivitesini % 50 oranında inhibe eden fenolik bileşik konsantrasyonu IC₅₀ şeklinde belirtilmiştir. pH'sı 6.8 olan 67 mM'lık KH₂PO₄ çözeltisi (Reaktif A), 3 mM'lık α-glukozidaz enziminin çalışmasını sağlayan glutathione çözeltisi (Reaktif B), 10 mM'lık substrat p-nitrofenil-α-D-glukozit çözeltisi (Reaktif C), 0.1 M'lık Na₂CO₃ çözeltisi (Reaktif D) ve toplamda 750 ünite α-glukozidaz enzimi bulunan standarttan 0.4 ünite hazırlanmıştır. Su banyosu 37 °C'ye ısıtılarak deney tüpleri su banyosuna yerleştirilmiştir. Tüplere örnek, kontrol ve kör numuneler olmak üzere çözeltiler sırasıyla eklenmiştir. 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbananslar okunmuş ve % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

İstatistik Analiz

SPSS (IBM, Statistics 22, New York, ABD) istatistik bilgisayar programı sonuçları analiz etmek amacıyla kullanılmış ve bağımsız iki örneklem t testi analizi ile iki grup arasındaki farklılıklar karşılaştırılarak, sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Adaçayı bitkisinden ilk olarak alınan ekstrakt, Clevenger düzeneği ile 1 ve 2 sa sürelerde distilasyon işlemi sonucunda elde edilen hidrosol (Hd) örneğidir. Retant kısmı süzülüp etüvde kurutulup öğütüldükten sonra Soxhlet cihazında sırası ile etil asetat ve etanol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Soxhlet cihazında etil asetat ile ilk alınan ekstrakt EtAc, etanol ile alınan ekstrakt EtOH olarak isimlendirilmiştir.

Adaçayından farklı çözen ve yöntemlerle elde edilen ekstraktların TFMM değerleri gallik asit

eşdeğeri (GAE), TFM değerleri kateşin eşdeğeri (KE) cinsinden Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Ekstraktların Toplam Fenolik ve Flavonoid madde miktarları

Table 1. Total Phenolic and Flavonoid content of extracts

Örnekler* Samples*	TFMM(mg GAE/g örnek) TFMM(mg GAE/g samples)	TFM(mg KE/g örnek) TFM(mg CE/g samples)
Hd ₁	50.15 ^a ± 6.67	31.72 ^a ± 2.45
Hd ₂	60.63 ^a ± 8.49	40.23 ^a ± 8.16
EtAc ₁	18.41 ^a ± 2.08	32.83 ^a ± 2.89
EtAc ₂	16.71 ^a ± 1.67	30.69 ^a ± 3.36
EtOH ₁	1.27 ^a ± 0.19	1.11 ^a ± 0.23
EtOH ₂	1.19 ^a ± 0.82	1.18 ^a ± 0.48

*Hd₁, Hd₂: Clevenger cihazında su ile 1 ve 2 saat distilasyon işlemi sonrası elde edilen ekstraktlar; EtAc₁, EtAc₂:1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktı; EtOH₁, EtOH₂: 1ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktı.

TFMM: Toplam Fenolik Madde Miktarı, TFM: Toplam Flavonoid Miktarı, GAE: Gallik Asit Eşdeğeri, KE: Kateşin Eşdeğeri. Her ekstrakt grubu kendi içerisinde değerlendirilmiştir ve aynı sütun içerisindeki farklı harfler örnek ortalamaları arasında fark olduğunu belirtmektedir, P <0,05

*Hd₁, Hd₂: Extracts obtained after 1 and 2 hours of distillation with water in Clevenger apparatus; EtAc₁, EtAc₂:extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus; EtOH₁, EtOH₂: extracts of 1 and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus. TFMM: Total Amount of Phenolic Substance, TFM: Total Flavonoid Amount, GAE: Gallic Acid Equivalent, CE: Catechin Equivalent. Each extract group was evaluated in its own and different letters in the same column indicate a difference between the sample means, P <0.05

Ekstraktlar arasında toplam fenolik madde miktarı en fazla olan 2 sa hidrodistilasyona tabi tutulan Hd₂ (60.63 mg GAE/g) örneğidir. TFMM açısından Hd₂ örneğini sırasıyla Hd₁, EtAc₁, EtAc₂, EtOH₁ ve EtOH₂ örnekleri takip etmektedir. Bağımsız iki örneklem t testi sonucuna göre ekstrakt ortalamaları arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir yani uygulanan ekstraksiyon süreleri materyaldeki toplam fenolik madde miktarı üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir. Literatürdeki mevcut çalışmalar incelendiğinde, çoğu çalışmada adaçayının kendisinin kullanıldığı görülmektedir. Etil asetat, metanol, etanol, su, dietil eter ve hekzanın çözen olarak kullanıldığı farklı çalışmalarda adaçayı toplam fenolik madde miktarı 10.06-64.98 µmol GAE/g (Koçak vd., 2016); 14.54-30.80 mg GAE/g (Başyigit ve Baydar, 2017); 33.83-114 mg GAE/g (Jeshvaghani vd., 2015); 4.27-161 mg GAE/g (Farhat vd.,2013); 4.25-5.95 mg GAE/g (Roby vd., 2013); 265.8-370.32 mg GAE/g (Martins vd., 2015); 3.03-126, 57-392 mg GAE/g (Erdogan vd., 2013) olarak belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde kullanılan bitkisel materyale,

solvent tipine, ekstraksiyon metoduna, ekstraksiyon süresine, sıcaklığına ve birçok etkene bağlı olarak bitkilerin toplam fenolik madde miktarları geniş bir yayılım aralığı göstermektedir.

Toplam flavonoid miktarı incelendiğinde fenolik madde miktarı tayinindeki gibi en yüksek değer Hd₂ örneğinde gözlemlenmiştir. Hd₂ örneğini sırası ile EtAc₁, Hd₁, EtAc₂, EtOH₂ takip etmiş ve en düşük değer EtOH₁ örneğinde belirlenmiştir. Uygulanan işlem süreleri toplam flavonoid miktarını etkilemezken kullanılan solvent tipi ve işlem sırası miktar üzerinde oldukça etkili olmuştur. Farklı adaçayı türlerinin sırasıyla diklorometan, etil asetat ve etanol ile ekstraksiyona tabi tutulduğu çalışmada TFM etil asetatlı örneklerde 30.11-206.23 mg KE/g, etanollü örneklerde 8.29-108.78 mg KE/g aralığında belirlenmiştir (Erdogan vd., 2013). Çalışmamızda adaçayı yaprakları diklorometan yerine saf su kullanılarak, sırası ile etil asetat ve etanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Etil asetatlı örneklerde elde ettiğimiz değerler Erdoğan vd. (2013)’in bulduğu sonuçlar ile benzer aralıktadır. Mevcut çalışmalar incelendiğinde farklı

çözgen ve ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak adaçayı flavonoid içeriği 1343.48-3060.02 mg KE/100 g kuru madde (Yağcıoğlu, 2015); 6.99-7.54 g KE/100 g örnek (Zeković vd., 2017) aralıklarında belirlenmiştir. Yağcıoğlu (2015) farklı ekstraksiyon metotlarının adaçayının antioksidan kapasitesi üzerine yapmış olduğu çalışmada adaçayına uygulanan işlem süresi ve etanol miktarındaki artışın TFM azalmaya sebep olduğunu gözlemlemiştir (Yağcıoğlu, 2015). Bu

çalışmada, etanollü ekstraktların TFM düşük olmasının sebebi üçüncü kez ekstraksiyon yapılmasına, sulu ekstraksiyondan sonra tekrar ısıtma işlemi uygulanmasına ve çözgen olarak sadece etanol kullanılmasına bağlanabilir.

Ekstraktların antioksidan kapasiteleri DPPH ve ABTS testleri ile belirlenmiştir ve Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Ekstraktların TEAC değerleri
Table 2. TEAC values of extracts

Örnekler* Samples*	DPPH testi mg TEAC/g örnek mg TEAC/g samples	ABTS testi mg TEAC/g örnek mg TEAC/g samples
Hd ₁	71.96 ^a ± 4.06	77.37 ^a ± 1.84
Hd ₂	95.64 ^b ± 14.72	92.85 ^b ± 14.71
EtAc ₁	15.77 ^a ± 1.72	25.65 ^a ± 2.34
EtAc ₂	15.40 ^a ± 2.14	24.83 ^a ± 3.56
EtOH ₁	2.37 ^a ± 0.37	2.46 ^a ± 1.05
EtOH ₂	2.17 ^a ± 0.34	2.45 ^a ± 0.74

*Hd₁, Hd₂: Clevenger cihazında su ile 1 ve 2 saat distilasyon işlemi sonrası elde edilen ekstraktlar; EtAc₁, EtAc₂:1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktı; EtOH₁, EtOH₂: 1 ve 2 saat kalıntıların Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktı. TEAC: Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite, DPPH:2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Her ekstrakt grubu kendi içerisinde değerlendirilmiştir ve aynı sütun içerisindeki farklı harfler örnek ortalamaları arasında fark olduğunu belirtmektedir, P <0,05

*Hd₁, Hd₂: Extracts obtained after 1 and 2 hours of distillation with water in Clevenger apparatus; EtAc₁, EtAc₂:extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus; EtOH₁, EtOH₂: extracts of 1 and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus. TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Each extract group was evaluated in its own and different letters in the same column indicate a difference between the sample means, P <0.05

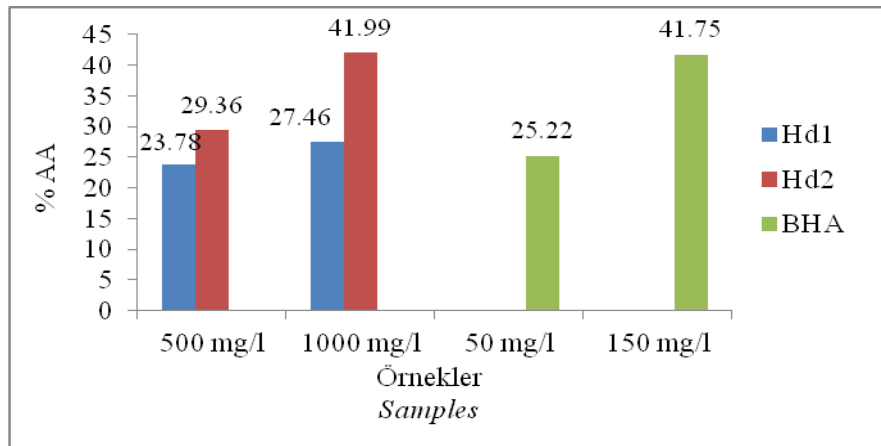
DPPH testi sonuçlarına göre Hd₂ ekstraktı en yüksek antioksidan aktiviteyi sergilerken en düşük değer EtOH₂ ekstraktında gözlemlenmiştir. Literatürde, adaçayı EC₅₀ (Radikali %50 indirgeyen etkin konsantrasyon) değeri, 3.37-77.07 µg TEAC/mL (Farhat vd., 2013); 181.0-198 µg/mL (Jeshvaghani vd., 2015); 11.47 µg TEAC/mL (Bayan ve Genç, 2016) ve 20.7-49.7 µg TEAC/mL (Tepe vd., 2006) aralıklarında belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda Koçak vd. (2016), adaçayı antioksidan aktivitesini DPPH testi ile gerçekleştirmiş ve değerlerini 5.93-54.71 µmol TEAC/g (Koçak vd., 2016); Yağcıoğlu, 439-509 mg TEAC/100 g kuru madde aralığında belirlemişlerdir (Yağcıoğlu, 2015). Yağcıoğlu tarafından yapılan çalışma ile, etanol

konsantrasyonunun artırılmasının antioksidan kapasite üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu bağlamda çalışmamızdan elde edilen EtOH₁ örneklerin antioksidan kapasitesinin düşük olması benzerlik göstermektedir. Etanollü ve etil asetatlı ekstraktlara Soxhlet cihazında 6 sa ısıtma işlemi uygulanması adaçayı bünyesinde bulunan antioksidan bileşiklerde degradasyona sebep olup antioksidan değerlerinde azalmaya sebep olabileceği göz önüne alınması değerlerin düşük olmasını açıklayabilir. Örnek değerleri incelendiğinde 1 sa ve 2 sa ekstraksiyon işlem sürelerinin EtAc ve EtOH₁ örneklerde herhangi bir farklılığa sebep olmadığı ifade edilebilir.

Ekstraktların ABTS testi sonuçları hesaplandığında en yüksek ABTS değerine Hd₂ örneğinin sahip olduğu görülmektedir. Hd₁ ve Hd₂ ekstraktlarının ABTS değerleri incelendiğinde ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). En yüksek TEAC değerine sahip örnek Hd₂ olmuştur. 2 sa distilasyon işleminin 1 saatlik işleme göre antioksidan özelliğe sahip bileşenlerin su formuna geçişinde daha etkili olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. DPPH metodu ile antioksidan aktivite tayininde de paralel şekilde en yüksek antioksidan kapasite Hd₂, en az EtOH₂ örneğine aittir. Bir örneğin TEAC değeri ne kadar yüksek ise antioksidan kapasitesi de o kadar yüksektir. Bitkisel materyallerin antioksidan içeriği bünyelerinde bulundukları fenolik maddelerin konsantrasyonu ile ilişkidir. Antioksidan etkiye sahip olan adaçayının yapısındaki en önemli fenolik bileşenler, karnosol, karnosik asit ve

rosmanoldür (Lu ve Yeap Foo, 2001). Genel olarak, DPPH yöntemi, daha yüksek stabiliteye (ve dolayısıyla daha düşük reaktiviteye) bağlı olarak ABTS yönteminden Trolox cinsinden daha düşük değerler sağlar (Marecek vd., 2017). Bu durumun, DPPH ve ABTS ile etkileşime giren fenoliklerin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Karotenoidlerin ootoksidasyon yoluyla renklerinde açılma meydana gelir. Bu renk açılması radikallere hidrojen atomu veren antioksidanlar tarafından engellenebilir ve bu amaç doğrultusunda en sık kullanılan antioksidan β -karotendir (Büyüktuncel, 2013). Örneklerin konsantrasyonu, TFMM baz alınarak, Hidrosoller 500 mg/l ve 1000 mg/l, asetatlı örnekler, 50 mg/l ve 200 mg/l, etanollü ekstraktlar 750 mg/l olacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 2, 3 ve 4'te verilmiştir.



Şekil 2. Hidrosollerin 500 mg GAE/l ve 1000 mg GAE/l'de ki % AA değerleri

Figure 2. % AA values of hydrosols in 500 mg GAE/l and 1000 mg GAE/l

Hd₁, Hd₂: Clevenger cihazında su ile 1 ve 2 saat distilasyon işlemi sonrası elde edilen ekstraktlar, % AA: % Antioksidan Aktivite, BHA: Bütilhidroksianisol

Hd₁, Hd₂: Extracts obtained after 1 and 2 hours of distillation with water in Clevenger apparatus, % AA: % Antioxidant Activity, BHA: Butyatedlhydroxyanisol

500 mg GAE/l'de Hd₁ ile Hd₂, 1000 mg GAE/l'deki Hd₁'in % AA değerleri sentetik antioksidan olan BHA_{50 mg/l}'deki % AA değerine yakındır. % 41.99 değerlerine sahip olan 1000 mg GAE/l'deki Hd₂ ekstraktının % AA değeri BHA_{150 mg/l}'nin % AA değerine yakın bir sonuç vermiştir.

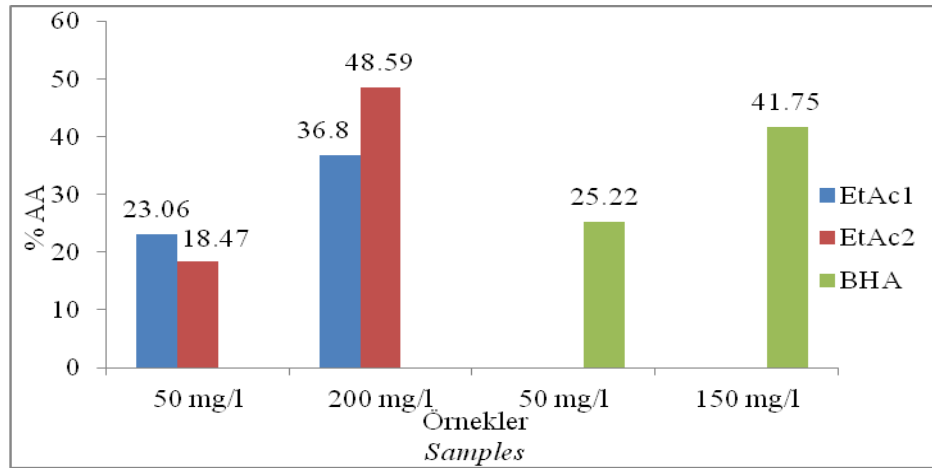
EtAc₁ ve EtAc₂ örneklerinin % AA değerleri Şekil 3'te verilmiştir.

50 mg GAE/l'de EtAc₁'in % AA değeri, sentetik antioksidanın BHA_{50 mg/l}'deki % AA değerine yakın bulunurken EtAc₂ örneğindeki düşük

bulunmuştur. BHA_{150mg/l}'nin % AA değeri ise 200 mg GAE/l'deki EtAc₁ ve EtAc₂ değerlerinin arasında bir değere sahip olduğu, 48.59 % AA kapasite ile en yüksek değere sahip örneğin 200 mg GAE/l'deki EtAc₂ örneği olduğu belirlenmiştir. 50 mg/l ve 200 mg/l konsantrasyonlar da hazırlanan etil asetat ekstraktlarının verileri ile BHA verileri ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. Uygulanan analiz sonucunda, 50 mg/l konsantrasyona sahip EtAc₁

ve BHA_{50mg/l} arasında önemli fark olmadığı belirlenmiştir. 200 mg/l konsantrasyonlu örnekler ve BHA % AA değerleri arasında anlamlı fark yoktur yani, adaçayı 200 mg/l konsantrasyonu yapay antioksidan olan BHA ile aynı antioksidan kapasiteye sahiptir.

Etanollü ekstraktların % AA değerleri Şekil 4'te verilmiştir.

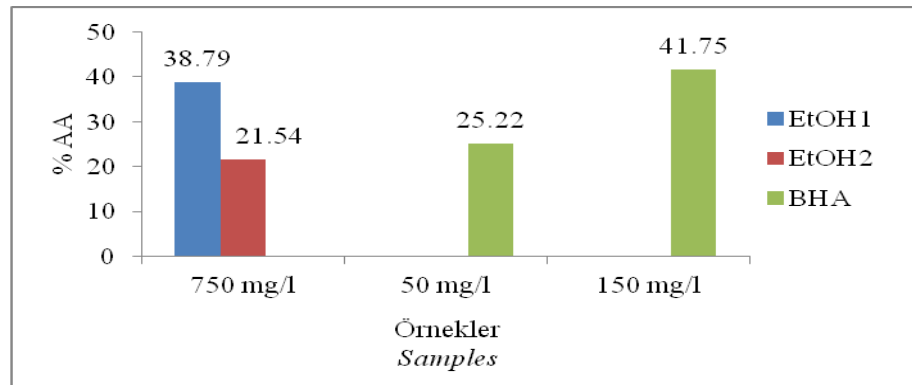


Şekil 3. Etil asetatlı ekstraktların 50 mg GAE/l ve 200 mg GAE/l'de ki % AA değerleri

Figure 3. % AA values of ethyl acetate extracts in 50 mg GAE/l and 200 mg GAE/l

EtAc₁, EtAc₂: 1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktları, %AA: % Antioksidan Aktivite, BHA: Bütilhidroksianisol

EtAc₁, EtAc₂: Extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus, % AA: % Antioxidant Activity, BHA: Butylatedhydroxyanisole



Şekil 4. Etanollü ekstraktların 750 mg GAE/l'de ki % AA değerleri

Figure 4. % AA values of ethanol extracts in 750 mg GAE/l

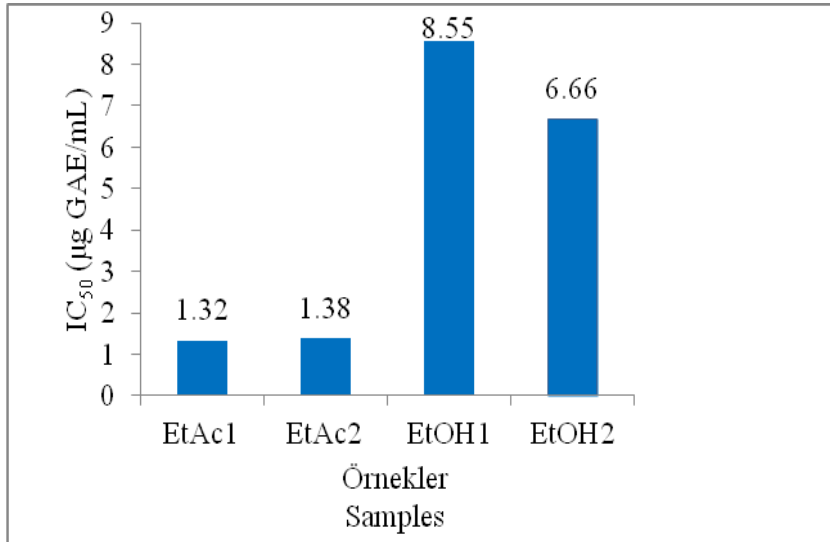
EtOH₁, EtOH₂: 1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktları, %AA: % Antioksidan Aktivite, BHA: Bütilhidroksianisol

EtOH₁, EtOH₂: Extracts of 1 and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus. % AA: % Antioxidant Activity, BHA: Butylatedhydroxyanisole

Ekstraktların % AA değerleri ile BHA'nın % AA değerleri karşılaştırıldığında 750 mg GAE/l'deki EtOH₁ değerinin BHA_{150 mg/l} değerine, EtOH₂'nin BHA_{50 mg/l}'deki % AA değerine yakın olduğu belirlenmiştir. Kelen vd. (2008) farklı adaçayı türleri üzerine yaptıkları çalışmada % AA değerlerini 81.1-92.4 aralığında bulurken, BHT % AA değerini 96.6 olarak (Kelen ve Tepe, 2008); Tepe yürüttüğü bir çalışmada (2008), adaçayı türlerinin % AA değerlerini 54.42-77.03 aralığında, BHT'nin % AA değerini ise 96.00 olarak belirlerken (Tepe, 2008) diğer çalışmasında adaçayı % AA değerini 29.02-69.2 aralığında, BHT % AA değerini 96 olarak belirlemiştir (Tepe vd., 2006). Farklı konsantrasyonlarda ve farklı çözücüler ile elde edilen adaçayı ekstraktlarında β -

karoten ağarma testi sonucu elde edilen sonuçlar Tepe'nin (2006) sonuçları ile karşılaştırıldığında, sentetik antioksidanların % AA değerleri ve adaçayı atığı ekstraktlarının % AA değerinin benzer olduğu söylenebilir.

Su, etil asetat ve etanol kullanılarak elde edilen adaçayı ekstraktlarının α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi tayin edilmiş ve sonuçlar IC₅₀ olarak ifade edilmiştir. IC₅₀ değeri ne kadar düşüğe mevcut fenolik bileşiğin etkinliği o kadar yüksektir. IC₅₀ değeri enzim aktivitesini % 50 oranında inhibe eden örnek konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Ekstraktların IC₅₀ değerleri Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Örneklerin toplam fenolik madde miktarına göre IC₅₀ (µg GAE/mL) değerleri

Figure 5. IC₅₀ (µg GAE/mL) values of samples according to total phenolic content

IC₅₀:Enzim aktivitesini %50 inhibe eden fenolik madde miktarı (µg GAE/mL), GAE: Gallik Asit Eşdeğeri, EtAc₁, EtAc₂:1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktı, EtOH₁, EtOH₂: 1ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktı

IC₅₀ is the concentration of phenolics required to inhibit 50% of the enzyme activity (µg GAE/mL), GAE: Gallic Acid Equivalent, EtAc₁, EtAc₂:Extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus; EtOH₁, EtOH₂: extracts of 1and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus

α -glukozidaz enzimini inhibe etmek için gerekli olan en yüksek konsantrasyonun 8.55 µg GAE/mL değeriyle EtOH₁ örneğine ait olduğu bulunmuştur. En düşük konsantrasyonun EtAc₁ örneğine ait olduğu belirlenmiştir. Bahadori, adaçayı metanollü ekstraktının α -glukozidaz enzimini % 50 inhibe etmek için gerekli olan

konsantrasyonunu 18.9 µg GAE/mL (Bahadori vd., 2015); Şen Arslan 0.14 mg GAE/mL (Şen Arslan, 2017); Kalaycıoğlu, 17.6 ile 173 µg/mL olarak belirlemişlerdir (Kalaycıoğlu vd., 2018). IC₅₀ değeri küçüldükçe antidiyabetik aktivite artmaktadır. Sonuçlar arasında en düşük IC₅₀ değeri EtAc₁ örneğine aittir. Örneklerin toplam

fenolik madde miktarları dikkate alındığında en yüksek TFMM EtAc₁ örneğindedir yani TFMM arttıkça antidiyabetik aktivite artmaktadır.

SONUÇ

Yürütülen bu çalışmada adaçayı uçucu yağları alındıktan sonra geriye kalan atık kısmın biyoaktif potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda adaçayı yaprakları 1 ve 2 saatlik distilasyona tabi tutulup daha sonra distilasyon kalıntısı yapraklara tekrar sırası ile etil asetat ve etanolün çözgen olarak kullanıldığı ikinci ve üçüncü ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, antioksidan ve α -glukozidaz aktiviteleri incelenmiştir. 2 sa distilasyona tabi tutulan ekstraktların fenolik madde, flavonoid madde ve antioksidan kapasite değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Alfa glukozidaz inhibisyon aktivitesi yönünden, IC₅₀ değeri en düşük olan etil asetat 1 sa (EtAc₁) ekstraktının en az konsantrasyonla α -glukozidaz enzimini inhibe ettiği sonucu çıkarılmıştır. Bitkisel materyallerin β -karoten ağartma testine göre antioksidan aktivite değerleri en yüksek olan ekstrakt EtAc₂ olup onu Hd₂ ekstraktının takip ettiği belirlenmiştir. Ekstraksiyon yönteminin, kullanılan çözgen ve işlem sırasının materyalin biyoaktif potansiyeli üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Adaçayı bitkisi ve kullanılan yöntemler ile sınırlı kalınmayarak klasik yöntem, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemleri, diğer tıbbi ve aromatik bitkilerin biyoaktif potansiyelinin belirlenmesi amacı doğrultusunda yeni çalışmalarda kullanılabilir.

KAYNAKÇA

Bahadori, M. B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Farimani, M. M., Bahadori, S. (2015). Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *J Funct Foods*, 18: 727-736.

Başıyigit, M., Baydar, H. (2017). Effects of different harvesting time on essential oil, phenolic compounds and antioxidant activity in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Süleyman Demirel Univ J Natural and Applied Sci*, 21, 131-137.

Bayan, Y., Genç, N. (2016). Determination of antioxidant capacity and total phenolic matter of *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca*. *Neşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(2), 158-166.

Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkilerin üretiminin artırılması olanakları. *Türkiye Ziraat Mübendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I*, 437: 11-15.

Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharm J*, 17(2): 93-103.

Çam, M., Hışıl, Y., Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem*, 112: 721-726.

Emir Çoban, Ö., Patır, B. (2010). Use of some spices and herbs antioxidant affected in foods. *Electronic J Food Techno*, 5(2): 7-19.

Erdogan, I., Sezer, F., Ercetin, T., Kahraman, A., Celep, F., Akaydin, G., Sener, B., Dogan, M. (2013). Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Ind Crops & Prod*, 41: 21-30.

Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-hamada, R., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Ind Crops & Prod*, 49: 904-914.

Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S. (2011). History of the use of medical and aromatic plants and their economic importance. *Kastamonu Univ J For Fac*, 11(1): 52-67.

Jeshvaghani, Z., Rahimmalek, M., Talebi, M. (2015). Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different *Salvia* species using three model systems. *Ind Crops & Prod*, 77: 409-414.

Kalaycıoğlu, Z., Uzaşçı, S., Dirmenci, T., Erim, F. B. (2018). Alpha-Glucosidase enzyme inhibitory effects and ursolic and oleanolic acid contents of

- fourteen Anatolian *Salvia* species. *J Pharm Biomed Anal*, 155: 284-287.
- Kelen, M., Tepe, B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresour Technol*, 99: 4096-4104.
- Koçak, M. S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M., Tepe, B. (2016). *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Ind Crops & Prod*, 85: 204-212.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem*, 96: 254-260.
- Lu, Y., Yeap Foo, L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem*, 75(2): 197-202.
- Marecek, V., Hampel, D., Cejka, P., Neuwirthov, J., Malachov, A., Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *J Cereal Sci*, 73: 40-45.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chem*, 170: 378-385.
- McDougall, G., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-Amylase and alpha-Glucosidase. *J Agric Food Chem*, 53: 2760-2766.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggenete, A., Pannala, A., Yang, M., Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(98): 1231-1237.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind Crops and Prod*, 43: 827-831.
- Şen Arslan, H. (2017). Bazı tıbbi aromatik bitki ekstraktlarının fenolik madde içerikleriyle amilaz, glukozidaz ve lipaz enzimleri üzerine etkileri. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Türkiye, 92 s.
- Şenkal, B. C., İpek, A., Cesur, C., Doğan, H. (2016). Yozgat florasına kayıtlı adaçayı (*Salvia*) aksonlarının bitkisel özellikleri ve tıbbi önemi. *I.Uluslararası Bozok Sempozyumu Bildiri Kitabı*, 4: 84-96.
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K., Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Food Chem*, 50: 81-86.
- Tepe, B. (2008). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresour Technol*, 99: 1584-1588.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem*, 95: 200-204.
- Torun, M., Topuz, A., Akdoğan, A., Şahin, H., Feramuz, Ö. (2008). Çözünür (İnstant) dağ çayı (*Sideritis stricta*) üretiminde ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Türkiye 10. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı*, 37: 183-186.
- Tsimogiannis, D., Choulitoudi, E., Bimpilas, A., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y., Oreopoulou, V. (2017). Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by-products. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 4: 12-20.
- Yağcıoğlu, P. (2015). Farklı ekstraksiyon metodları ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 121 s.

Zeković, Z., Pintać, D., Majkić, T., Vidović, S., Mimica-Dukić, N., Teslić, N., Versari, A., Pavlić, B. (2017). Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery-Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Ind Crops and Prod*, 99: 49-59.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in Mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64: 555-559.