T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Ulva rigida TÜRÜNDEKİ FENOLİK BİLEŞİKLERİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

AYTAJ HUSEYNOVA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. PELİN KÖSEOĞLU YILMAZ

ANALİTİK KİMYA
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Aytaj HUSEYNOVA

İTHAF

Babam Ilham, annem Leman, ve kardeşlerim Günel ve Sübhan ’a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Öncelikle danışmanım aynı zamanda yüksek lisans hayatım boyunca bana akademik mentörlük yapan tez konumun seçiminden itibaren tüm çalışma sürecinin sonuna kadar benden her türlü bilgisini, tecrübesi ve ilgisini esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Pelin KÖSEOĞLU YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesine sağladığı imkân ve desteklerinden dolayı İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sıdıka TOKER'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardım ve ilgisini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ufuk KOLAK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi tez çalışma sürecim boyunca da bana gösterdikleri her türlü hem maddi hem manevi destekleri için babam Ilham, annem Leman, ve kardeşlerim Günel ve Sübhan ’a içtenlikle teşekkür ederim.

En sonda tez çalışmam sırasında emeği geçen tüm arkadaşlarıma, özellikle benden laboratuar çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen sevgili arkadaşım Bahar ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 123Z571, 2519 – European Cooperation in Science and Technology-COST Association (COST) Çalışma Grubu Destek Programı).

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Makroalgler ve Önemleri 3
2.2. *Ulva* L. Cinsi ve *U. rigida* (C.Agardh) Türü Hakkında Botanik Bilgiler ve Biyolojik Aktiviteleri 6
2.3. Fenolik Bileşikler 10
2.3.1 Fenolik Asitler 11
2.3.2 Flavonoidler 12
2.3.3 Lignanlar 12
2.3.4. Stilbenler 13
2.4. Fenolik Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Yöntemler 13
2.4.1. Ekstraksiyon Yöntemleri 13
2.4.1.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu 13
2.4.1.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu 14
2.4.1.3. Soxhlet Ekstraksiyonu 14
2.4.1.4. Matriks Katı-Faz Dispersiyonu 15
2.4.1.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu 15
2.4.1.6. Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon 15
2.4.1.7. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 16
2.4.1.8. Katı Faz Ekstraksiyonu 16
2.4.2. Tayin Yöntemleri 17

2.4.2.1. Kağıt Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi 17
2.4.2.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi.....17
2.4.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi 18
2.4.2.4. Gaz Kromatografisi.....18
2.5. *Ulva* Cinsinde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Tayinleri.....19
2.6. Analitik Metot Validasyonu ve Validasyon Parametreleri 1
2.6.1. Seçicilik.....1
2.6.2. Doğrusallık.....1
2.6.3. Aralık 1
2.6.4. Doğruluk 1
2.6.5. Kesinlik 2
2.6.6. Gözlenebilme Sınırı 2
2.6.7. Tayin Sınırı 2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....3
3.1. Analizin Yapıldığı Yer.....3
3.2. Makroalg Materyali.....3
3.3. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler 3
3.4. Cihaz ve Gereçler.....3
3.5. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Miktar Tayini için Yöntem Koşullarının Belirlenmesi 4
3.5.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boylarının Seçimi.....4
3.5.2. Ölçü Eğrileri.....4
3.5.3. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu 4
3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri 5
3.6.1. Doğrusallık.....6
3.6.2. Uygunluk Parametreleri 6
3.6.3. Doğruluk 6
3.6.4. Kesinlik 6
3.6.5. Gözlenebilme Sınırı 7
3.6.6. Tayin Sınırı 7
4. BULGULAR.....8
4.1. *U. rigida'*da Bulunan Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini için Geliştirilen HPLC Yönteminin Koşulları.....8

4.1.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boyu 8
4.1.2. Ölçü Eğrileri.....9
4.1.3. Fenolik Bileşiklerin Ekstre Çözeltisinden SPE ile Ekstraksiyonu.....12
4.2. *U. rigida'*da Bulunan Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyon Sonuçları 12
4.2.1. Doğrusallık.....12
4.2.2. Uygunluk parametreleri 12
4.2.3. Doğruluk 13
4.2.4. Kesinlik 13
4.2.5. Gözlenebilme Sınırı 14
4.2.6. Tayin Sınırı 14
4.3. Geliştirilen ve Valide Edilen HPLC Yöntemi ile *U. rigida* Örneğinde Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini Sonuçları 14
5. TARTIŞMA 16
KAYNAKLAR 18
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....29

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2- 1: *Ulva* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin analizleri için geliştirilen yöntemler 20
Tablo 4- 1: Mobil faz gradient programı 8
Tablo 4- 2: Kafeik asitin ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) 10
Tablo 4- 3: Ferulik asitin ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) 11
Tablo 4- 4: Rutinin ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD) 11
Tablo 4- 5: Regresyon analizi sonuçları 11
Tablo 4- 6: SPE prosedürünün geri kazanım (%) sonuçları 12
Tablo 4- 7: Uygunluk parametreleri 13
Tablo 4- 8: Doğruluk ve kesinlik çalışmalarının sonuçları 14
Tablo 4- 9: LOD ve LOQ değerleri 14
Tablo 4- 10: *U. rigida* örneğinde bulunan fenolik bileşiklerin miktar tayini sonuçları .. 15

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1: Fenolik bileşikler 11
Şekil 3- 1: HLB kartuş ile SPE prosedürü 5
Şekil 4- 1: Ölçü eğrilerinin hazırlanmasında kullanılan standart çözeltilerin HPLC kromatogramları 9
Şekil 4- 2 : Kafeik asite ait ölçü eğrisi 9
Şekil 4- 3: Ferulik asite ait ölçü eğrisi 10
Şekil 4- 4: Rutine ait ölçü eğrisi 10
Şekil 4- 5: *U. rigida* örneğine ait kromatogram 15

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µm : Mikrometre

A : Pik alanı

cm : Santimetre

dk : Dakika

g : Gram

HLB : Hidrofilik-lipofilik denge (hydrophilic-lipophilic balance)

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography)

HETP : Teorik plaka eşdeğer yüksekliği (height equivalent of a theoretical plate)

ICH : Beşeri tıbbı ürünlerin ruhsatlandırılmasına ilişkin teknik koşullar hakkında uluslararası uyum konferansı (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

ID : İç çap (inner diameter)

kHz : Kilohertz

L : Litre

LOD : Gözlenebilme sınırı

LOQ : Tayin sınırı

mg : Miligram

mL : Mililitre

OPA : *o*-Fosforik asit

N : Teorik plaka sayısı

nm : Nanometre

RME : Bağıl ortalama hata (relative mean error)

RSD : Bağıl standart sapma (relative standard deviation)

SPE : Katı faz ekstraksiyonu (solid phase extraction)

T : Kuyruklanma faktörü

tR : Alıkonma süresi

UV : Ultra viyole

ÖZET

Huseynova, A. (2024). *Ulva rigida* Türündeki Fenolik Bileşiklerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini için Metot Geliştirilmesi ve Validasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, *Ulva rigida* (C.Agardh) türündeki fenolik bileşiklerin (ferulik asit, kafeik asit ve rutin) miktar tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirildi ve validasyonu yapıldı. Analizler 250x4,6 mm ebatında ve 5 µm tanecik boyutunda bir C18 kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Metanol ve %0,08'lik o-fosforik asit çözeltisi (suda) olmak üzere iki bileşenden oluşan hareketli faz ile gradient elüsyon programı uygulandı. Spektrofotometrik dedektör kullanıldı ve tüm fenolik bileşikler için dedeksiyon dalga boyu 325 nm olarak belirlendi. Kolon sıcaklığı 40ºC, enjeksiyon hacmi 20,0 µL ve akış hızı 1,0 mL/dak olarak ayarlandı. Doğrusal aralık kafeik ve ferulik asit için 0,1-1,00 µg/mL, rutin için ise 0,25-2,50 µg/mL olarak belirlendi. Gözlenebilme ve tayin sınırları ise sırasıyla 0,03 µg/mL ve 0,08-0,10 mg/L aralığında bulundu. Metodun kesinlik ve doğruluğu ferulik ve kafeik asit için 0,10, 0,50 ve 1,00 µg/mL, rutin için ise 0,25, 0,75, 2,50 µg/mL konsantrasyon seviyelerinde incelendi. Fenolik bileşiklerin *U. rigida* makroalg materyalinden ekstraksiyonunda maserasyon ile metanol ekstresi hazırlandı ve analiz öncesinde hidrofilik-lipofilik denge kartuşu kullanılarak katı faz ekstraksiyonu yöntemi uygulandı. Sonuç olarak, geliştirilen ve valide edilen yöntemin *U. rigida* türündeki 3 adet fenolik bileşiğin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikle aynı anda kantitatif tayini için uygun olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Fenolik Bileşik, HPLC, Katı Faz Ekstraksiyonu, Metot Geliştirme ve Validasyon, *Ulva rigida*

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 123Z571 (2519 – European Cooperation in Science and Technology-COST Association (COST) Çalışma Grubu Destek Programı)

ABSTRACT

Huseynova, A. (2024). Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Phenolic Compounds in *Ulva rigida* Species. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Analytical Chemistry. Master of Science Thesis. İstanbul.

In this master of science thesis, a new high performance liquid chromatography method for the quantification of phenolic compounds (ferulic acid, caffeic acid and rutin) in *Ulva rigida* (C.Agardh) species was developed and validated. The analyses were performed using a C18 column with a size of 250x4.6 mm and a particle size of 5 µm. A gradient elution program was applied with a mobile phase consisting of two components: methanol and 0.08% o-phosphoric acid solution (aqueous). A spectrophotometric detector was used and the detection wavelength for all phenolic compounds was 325 nm. The column temperature was set at 40ºC, injection volume at 20.0 µL and flow rate at 1.0 mL/min. The linear range was 0.1-1.00 µg/mL for caffeic and ferulic acid and 0.25-2.50 µg/mL for rutin. The limits of detection and determination were 0.03 µg/mL and 0.08-0.10 mg/L, respectively. The precision and accuracy of the method were examined at concentration levels of 0.10, 0.50 and 1.00 µg/mL for ferulic and caffeic acid and 0.25, 0.75 and 2.50 µg/mL for rutin. In the extraction of phenolic compounds from *U. rigida* macroalgae material, methanol extract was prepared by maceration and solid phase extraction method was applied using a hydrophilic-lipophilic balance cartridge before analysis. As a result, the developed and validated method was found to be suitable for the simultaneous quantitative determination of 3 phenolic compounds in *U. rigida* species with high accuracy and reproducibility.

Key Words: HPLC, Method Development and Validation, Phenolic Compounds, Solid Phase Extraction, *Ulva rigida*

The present work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK).

Project No: 123Z571 (2519 – European Cooperation in Science and Technology-COST Association (COST) Working Group Support Program)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyanın büyük bir bölümü deniz ve okyanuslardan oluşur. Alg türleri, sucul ekosistemlerde kayda değer fotosentetik üreticilerdir. Bu özellikleri sayesinde, otçul formların yararlandığı inorganik maddelerden organik madde üreterek besin zincirinin tabanını oluştururlar.

Primer üreticiler olarak kabul edilen makroalgler deniz ekosisteminde önemli bir rol oynamaktadırlar ve yüzeylerinde yaşayan birçok mikroorganizmanın habitatını ve bunun sonucu olarak da deniz trofik zincirinin önemli bir bölümünü temsil etmektedirler. Genellikle ototrofik olarak sınıflandırılır, çünkü fotosentez yaparak diğer kara bitkilerinden daha yüksek bir verimle organik madde üretirler.

Bir makroalg cinsi olan *Ulva* L, basit morfolojiye sahip ancak taksonomik olarak karmaşık bit türdür. *Ulva* cinsi, Ulvaceae familyasına aittir ve tanımlanmış 130 kadar farklı tür içermektedir. *Ulva* türleri, gıda, gübre ve ilaç endüstrilerinde kullanılan kimyasal bileşenler içerdikleri için detaylı bir şekilde araştırılmaktadır.

Gıda olarak tüketilebilir olması ve görünümünden ötürü deniz marulu olarak da bilinen *U. rigida* kozmopolit bir makroalg türüdür. Dünya çapında daha çok Doğu Atlantik, Karayipler, Hint ve Pasifik okyanuslarda yayılım göstermektedirler. Türkiye kıyılarında ise özellikle sığ ve kayalık bölgelerde azot ve fosfor gibi besleyici elementlerin bol olduğu kısımlarda doğal olarak bulunmaktadırlar. Vitamin, lif ve minerallerce oldukça zengin olması sebebi ile özellikle pek çok Uzakdoğu ülkesinde ve gün geçtikçe yaygınlaşarak Fransa gibi Avrupa ülkelerinde kurutularak veya taze olarak salatalarda ve çorbalarda tüketilmektedir.

Ulva türleri ile yapılan kimyasal içerik çalışmaları yapılarında steroidler, fenolikler, terpenoidler, karotenoidler ve yağ asitleri gibi çeşitli gruplardan sekonder metabolitlerin bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu biyoaktif moleküller nedeniyle *Ulva* türleri, antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antikolinesteraz, antienflamatuvar, antikanser, anti-aging, antidiyabetik ve antihiperlipidemik gibi çeşitli biyolojik etkinliklere sahiptir.

Sekonder metabolitler genellikle fenolik bileşikler, terpenler, steroidler ve alkaloidler olmak üzere üç ana grupta incelenir. Bitkiler, organik moleküller olan sekonder metabolitleri sentezlemektedirler. Bu sentez genellikle fotosentez süreci aracılığıyla

gerçekleşir. Bu bileşikler, bitkilerde belirgin bir fizyolojik görevileri olmamasına rağmen, biyolojik açıdan önemlidir. Bitkileri zararlı dış faktörlere karşı korumaktadırlar. Günümüzde ilaç endüstrisinde kullanılan etken maddelerin yaklaşık %25'i bitki kaynaklı sekonder metabolitlerdir. Ayrıca, kozmetik ve nutrasötik ürünlerde de sıkça bulunurlar.

Sekonder metabolitlerin ana gruplarından biri olan fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubu içermektedirler. Fenolik bileşikler genellikle fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar ve stilbenler olmak üzere dört grupa bölünüyor. Bu bileşikler, bitkilerin patojen ve böcek saldırılarına, UV radyasyonuna karşı korunma amacıyla sentezlenir ve antioksidan, antidiyabetik, antienflamatuvar, antialerjik, antimikrobiyal, antiviral, antipatojenik ve antitrombotik gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir.

Türkiye'nin denizlerinden toplanan *U. rigida* (C.Agardh) türü üzerine yapılan çeşitli biyolojik aktivite çalışmalarında, İskenderun Körfezi, Çanakkale, Marmara Denizi ve İzmir gibi farklı bölgelerden elde edilen örneklerin antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve antihiperglisemik özellikler incelenmiştir. Ayrıca, *U. rigida*'nın çeşitli ekstrelerinin antihiperglisemik ve antigenotoksik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. *U. rigida*'nın kimyasal içeriği üzerine yapılan çalışmalarda genellikle Türkiye'nin farklı sahil bölgelerinden elde edilen örneklerin yağ asidi, protein ve mineral içerikleri incelemiştir. Bu yüksek lisans tezi kapsamında, İstanbul, Caddebostan mevkiinden örneklenen *U. rigida* makroalg materyalinde bulunan ferulik asit, kafeik asit ve rutin olmak üzere üç adet fenolik bileşiğin aynı anda kantitatif tayini için yeni bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi geliştirildi ve valide edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Makroalgler ve Önemleri

Yer yüzünün büyük bir kısmı okyanus ve denizlerden ibarettir. Bitki ve hayvan türlerinin ilk olarak denizlerde belirdiği bilinmektedir (Hoek ve ark., 1995). Çeşitli ekolojik şartlar altında gelişebilmesinden dolayı biyolojik çeşitliliği oldukça geniş olan deniz bitkileri pek çok farklı yaşam guruplarını kapsamaktadır (Cirik ve ark., 1999).

Deniz ekosistemlerinde yaklaşık 225.000 ökaryotik tür taksonomik olarak sınıflandırılmıştır ve bu sayının 700.000'e kadar ulaşabileceği tahmin edilmektedir. Algler, tanımlanan yaklaşık 44.000 tür ile sulardaki biyolojik çeşitliliğe katkıda bulunmaktadır. Henüz teşhis edilmemiş 28.500 alg türünün varolduğu tahmin edilmektedir (Guiry, 2012).

Kayda değer bir fotosentetik üretici olan alg türleri, sucul ekosistemlerdeki otçul formların yararlandığı inorganik maddelerden organik madde üretebilme özellikleri sebebi ile besin zincirinin tabanını şekillendirirler (Sze, 1998).

Algler tek hücreli veya çok hücreli olabilmektedirler. Mikroskopik ölçüde olan algler mikroalg, makroskopik ölçüde olan algler ise makroalg olarak adlandırılır. Aynı zamanda deniz yosunu olarak da adlandırılan makroalgler, suda yaşayan, makroskobik prokaryot ya da ökaryot niteliği olan organizmalardır. Fotosentez özelliğine sahiptirler. Sade bir üreme sistemi vardır.

Makroalgler birincil üreticiler olarak kabul edilmekte ve yüzeylerinde yaşayan birçok mikroorganizmanın habitatını ve bunun sonucu olarak da deniz trofik zincirinin önemli bir bölümünü temsil etmektedirler. Makroalgler hava-su arayüzünde ya da katı bir substrata bağlı olarak yaşayabilmekte, ayrıca yüzeysel sularda olduğu kadar derin denizlerde (yaklaşık 180 m'ye kadar) de bulunabilmektedirler. Makroalgler en üretken kara bitkilerinden bile daha yüksek verim ile fotosentez yapan organizmalar oldukları için genellikle ototrofik olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bununla birlikte çok derin bölgelerde yaşayan bazı temsilciler metabolik enerji elde etmek için organik molekülleri kullanmaları sebebi ile kemoheterotrofiktir (Fernandes ve ark., 2022).

Makroalgler hücre özellikleri, pigment üretimi, yaşam döngüsü, habitat vb. gibi birçok farklı kritere göre sınıflandırılmaktadır. Genellikle yeşil (Chlorophyceae), kırmızı (Rhodophyceae) ve kahverengi makroalgler (Phaeophyceae) olmak üzere

pigmentasyona göre üç kategoriye ayrılmaktadırlar (Gao ve McKinley, 1994; Spalding ve ark., 2019; Pepper ve Gentry, 2015).

Makroalglerin insanlar tarafından tüketimi ile ilgili MÖ 14.000 yılına tarihlenen arkeolojik kanıtlar ve MS 600 yılına ait yazılı raporlar bulunmaktadır (Spalding ve ark., 2019). Günümüzde antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik, antikoagülan, antitümör vb. çeşitli etkilere sahip lifler içeren makroalgler gıda olarak hayvanlar ve insanlar tarafından tüketilmekte ve kolayca metabolize edilmektedir (Dhargalkar ve Neelam, 2005; Ganesan ve ark., 2008). Makroalglerin kullanım alanları beslenme ile ilgili sınırlı kalmayıp özellikle kozmetik ve farmasötik uygulamaları başta olmak üzere çeşitli endüstriyel alanları da kapsamaktadır. Dikkate değer miktarda mineral (%7-36), lipid (%1-5), polisakkarit (%15–76) ve protein (%5–47) (Burtin, 2003; MacArtain ve ark., 2007; Anyanwu ve ark., 2018) ile oldukça yüksek konsantrasyonlarda iyot, kalsiyum, demir, bakır ve magnezyum gibi bazı önemli mineralleri içerirler. Makroalglerin lipid bileşimi esas olarak iki çoklu doymamış yağ asidi olan omega 3 ve omega 6'dan oluşmaktadır. Bu yağ asitleri kardiyovasküler hastalıklar, osteoartrit ve diyabetin önlenmesinde rol oynayan moleküller olarak bilinmektedir. Omega 3 ve omega 6'nın dışında yeşil makroalglerde alfa-linolenik asit (ω3 C18:3), kırmızı ve kahverengi makroalglerde eikosapentaenoik asit (ω3 C20:5) ve araşidonik asit (ω6 C20:4) tespit edilmiştir. Aynı zamanda iyi bilinen polisakkarit üreticileridir ve farklı endüstriyel alanlarda yaygın olarak hidrokolloidler olarak kullanılırlar. En çok bulunan polisakkaritler aljinatlar, karagenanlar ve agardır. Bunları fukoidanlar, laminarin ksilanlar, florida nişastası ve ulvanlar takip eder. Protein içeriği büyük ölçüde makroalgin tipine bağlıdır. Kahverengi makroalglerin protein içeriği düşükken (kuru ağırlığın %5-15'i), yeşil ve kırmızı makroalglerde bu değer %50'ye kadar ulaşabilir (kuru ağırlığın %10-47'si) (Burtin, 2003; MacArtain ve ark., 2007). Makroalgler besin değeri yüksek bu moleküller dışında vitaminler (özellikle B3, B9, B12, C ve E) ve antioksidanlar gibi mikro besinlerce de zengindir. Karotenoidler, terpenoidler, ksantofiller, klorofiller, fikobilinler, çoklu doymamış yağ asitleri, polisakkaritler, vitaminler, steroller, tokoferoller ve fikosiyaninler gibi biyolojik olarak aktif birçok fitokimyasalı sentezlemektedirler (De Almeida ve ark., 2011). Ayrıca, son yıllarda çoğunlukla kırmızı ve kahverengi, bazıları da yeşil makroalglerden olmak üzere 4000'den fazla metabolit izole edilmiş ve doğal ürün veritabanı olan Doğal Ürünler Sözlüğü'nde (the Dictionary of Natural Products, DNP) listelenmiştir. Yapılan bu

çalışmalar makroalglerin biyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlara sahip paha biçilmez bir biyomolekül ve mikro besin kaynağı olduğunu göstermektedir (Silva ve ark., 2013a; Mendes ve ark., 2013; Stefan Sebölk ve Hanelt, 2017).

Günümüzde tüketicilerin sentetik moleküllerin kullanımıyla ilgili endişelerinin artması ile doğal ürünlere olan talep de artmıştır. Makroalglerin, bileşenleri dikkate alındığında endüstrideki bazı güncel sorunları çözmek için kullanılabilecek bileşikler açısından önemli oldukları görülmektedir. Makroalgler, farmasötik, nutrasötik ve gıda pazarları için yüksek katma değer potansiyeline sahip, sürdürülebilir bir doğal kaynaktır. Yapılan çalışmalar çeşitli makroalg türlerinden elde edilen ekstrelerin antienflamatuvar, antimikrobiyal, antidiyabetik, antikanser, nöroprotektif, yaşlanma karşıtı, foto-koruyucu, nemlendirici ve diğer pek çok biyolojik etkinliğe sahip biyomoleküllerce zengin olduğunu göstermektedir. Bu sebeple makroalglerden elde edilen bileşikler pek çok farklı endüstriden ilgi görmektedir (Burtin, 2003; MacArtain ve ark., 2007; Bedoux ve ark., 2014; Hamed ve ark., 2015; Vuong ve ark., 2018). Makroalgler, balıklar için bağışıklık sistemini uyarıcı ve antibakteriyel etkiye sahip fonksiyonel takviyeler gibi hayvan yemlerinin üretimi için de gelecek vaadetmektedir (Holdt ve Kraan., 2011). Ayrıca makro ve mikroalglerden biyoyakıt üretimine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Enerji ihtiyacının karşılanması için biyokütlelerden biyoyakıt elde edilmesi amacıyla yeni süreçler üzerine pek çok çalışma yapılmaktadır (Hughes ve ark., 2012, Singh., 2012; Williams., 2010).

Bunlara ek olarak, döngüsel ekonomi kavramı da her geçen gün artan çevre kirliliği, sınırlı kaynaklar ve atık birikimi gibi mevcut olumsuz koşullar nedeniyle önem kazanmıştır (Jurgilevich ve ark., 2016). Bu bağlamda deniz kıyılarından uzaklaştırılması gereken kalıntılar olarak kabul edilen istilacı *Sargassum* spp., *Ulva* spp. gibi makroalg türleri biyomolekül kaynağı olarak önerilmektedir (Saldarriaga-Hernandez ve ark., 2020; Balboa ve ark., 2015). Yine aynı sebep ile hala kısmen keşfedilmemiş, yeterince çalışılmamış ve şu an ekonomik bir değeri olmayan deniz makroalglerinin üzerinde de durulmaktadır. Bu türler biyoaktif moleküllerin eldesi için sürdürülebilir bir doğal kaynak olarak düşünülmektedir (Gallego ve ark., 2019; Lourenço-Lopes ve ark., 2020).

2.2. *Ulva* L. Cinsi ve *U. rigida* (C.Agardh) Türü Hakkında Botanik Bilgiler ve Biyolojik Aktiviteleri

Bir yeşil makroalg cinsi olan *Ulva* cinsi morfolojik olarak basit ancak taksonomik olarak karmaşıktır (Wang ve ark., 2017). Ulvaceae familyasına ait olan *Ulva* cinsinin taksonomik olarak kabul edilmiş 130 türü bulunmaktadır. *Ulva* türleri dünyada toplanan yeşil alglerin %25'ini oluşturmaktadır (Ova Kaykaç ve ark., 2008). Kıyılarda daha çok rastlanan türler *U. lactuca*, *U. rigida*, *U. fasciata*, *U. Intestinalis*'dir. *Ulva* türleri görünüm ve diğer açılardan birçok benzer özelliklere sahiptirler.

Ulva türleri içerdikleri gıda, gübre ve ilaç endüstrisi açısından yararlı olan kimyasal bileşenler sebebi ile kapsamlı bir şekilde incelenmektedirler (Mantri ve ark., 2020). Yapılan çalışmalarda yapılarında steroidler (Awad, 2000; Kapetanovic ve ark, 2005; Silva ve ark., 2013b; Li ve ark., 2017; Azizi ve ark., 2020), fenolikler (Flodin ve Whitfield, 1999; Whitfield ve ark., 1999; Wekre ve ark, 2019), terpenoidler (Sun ve ark, 2007; Chakraborty ve ark., 2010a; Chakraborty ve ark., 2010b), karotenoidler (Abd El-Baky ve ark., 2009; Eismann ve ark., 2020; Martins ve ark., 2021) ve yağ asitleri (Abou-ElWafa ve ark, 2009; Wang ve ark.; 2013; İsmail ve ark., 2018) gibi farklı gruplardan sekonder metabolitlerin varlığı tespit edilmiştir. Bu biyoaktif moleküller sebebi ile *Ulva* türleri antioksidan (Mezghani ve ark., 2013; Olasehinde ve ark., 2019; Berneira ve ark., 2021), antimikrobiyal (Motallebi ve ark., 2020; Berneira ve ark., 2021; Deyab ve ark., 2019), antiviral (Ribeiro Soares ve ark., 2012; Mofeed ve ark., 2019), antikolinesteraz (Olasehinde ve ark., 2019; Trentin ve ark., 2020), antienflamatuvar (Khan ve ark., 2008; McCauley ve ark., 2015), antikanser (Khanavi ve ark., 2012; McCauley ve ark., 2015; Mezghani ve ark., 2015), antiageing (Choi ve ark., 2012; Trentin ve ark., 2020; Castejón ve ark., 2021), antidiyabetik (Tas ve ark., 2011; Trentin ve ark., 2020), antihiperlipidemik (Tas ve ark., 2011) gibi çeşitli biyolojik etkinliklere sahiptir.

Japonya'da ticari olarak üretilen önemli deniz yosunu gıdalarından biri olan "Yeşil laver" veya "aonori", yüksek miktarda protein, kalsiyum, vitamin ve demir içeren ile düşük miktarda yağ ve sodyum içeren bir *Ulva* ve *Monostroma karışımıdır*. Son zamanlarda *Ulva*, Fransa gibi Batı ülkelerinde de gıda olarak onaylanmıştır. *Ulva* ayrıca Hindistan'da geleneksel olarak hazırlanan bir atıştırmalık olan "Pakoda"nın bileşenlerinden biri olarak da kullanılmaktadır. *U. intestinalis*, surimi bazlı bir üründe jel mukavemetini, jellerin su tutma kapasitesini ve surimi macunlarının emülsifiye

stabilitesini geliştirmek amacıyla katkı maddesi olarak eklenmektedir. *Ulva* biyokütlesi, Doğu Akdeniz'de protein ve nişasta için çeşitli gıda uygulamalarında dikkat çekmektedir (Mantri ve ark., 2020). Pereira (2016) çeşitli yenilebilir *Ulva* türlerin coğrafi bölgelere göre aşağıdaki gibi listelemiştir:

Kuzey Atlantik'te ve Akdeniz bölgesi: *U. intestinalis, U. lactuca, U. rotundata*

Güney Atlantik ve Karayip Denizi: *U. clathrata, U. linza, U. rigida*

Doğu Asya (Çin, Japonya, Kore): *U. compressa*

Hint-Pasifik (Hindistan, Çinhindi, Filipinler, Endonezya, Avustralya, Yeni Zelanda): *U. australis, U. conglobata, U. reticulata, U. stenophylla*

Pasifik Adaları (Mikronezya, Polinezya, Melanezya ve Hawai Adaları): U. *flexuosa, U. flexuosa* subsp. *paradoxa, U. lactuca, U. Prolifera*

Doğu Pasifik (Alaska'dan Kaliforniya ve Meksika'ya kadar, Peru, Şili, Arjantin): *U. lactuca*

Gıda olarak tüketilebilir olması ve görünümünden ötürü deniz marulu olarak da bilinen *U. rigida* (C.Agardh) kozmopolit bir makroalg türüdür. Taksonomik olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır:

Bölüm: Chlorophyta

Sınıf: Chlorophyceae

Grup: Ulvales

Familya: Ulvaceae

Cins: *Ulva* Linnaeus, 1753

Tür: *Ulva rigida* (C. Agardh, 1823)

U. rigida türünün gövdesi ince, yaprakları fırfırlı ve iki hücre kalınlığındadır. Yaprak uzunluğu 10 cm'ye kadar çıkabilmektedir. Hücreleri dikdörtgen, 11-17 µm genişliğinde, 15-22 µm uzunluğunda, düzenli veya rastgele sıralar halinde düzenlenmiştir. Sığ kayalıklarda, tatlı su akıntısı olan alanlarda, gelgit havuzları ve otçul canlıların besin olarak zenginleştirdiği yerlerde rastlanmaktadırlar. Rengi parlak çimen yeşilinden koyu yeşile doğru değişebilmekte, üreme sırasında ise kenarları altın sarısı olabilmektedir. Stresli koşullarda renksiz de olabilip, ortam koşullarına bağlı renk değişebilmektedirler. Pek çok çevre koşuluna karşı toleranslıdır ve varlığı genellikle tatlı su girişini veya kirliliği gösterir. Dünya çapında daha çok Doğu Atlantik, Karayipler, Hint ve Pasifik

okyanuslarda yayılım göstermektedirler (Imada ve ark., 2000). Türkiye kıyılarında özellikle sığ ve kayalık bölgelerde azot ve fosfor gibi besleyici elementlerin bol olduğu kısımlarda doğal olarak yayılım göstermektedir.

U. rigida vitamin, lif ve minerallerce oldukça zengin olması sebebi ile özellikle pek çok Uzakdoğu ülkesinde ve gün geçtikçe yaygınlaşarak Fransa gibi Avrupa ülkelerinde kurutularak veya taze olarak salatalarda ve çorbalarda tüketilmektedir (Cirik ve Cirik, 1999). Bununla birlikte yapısında diğer *Ulva* türleri gibi fenolik bileşikler (Mezghani ve ark., 2016; Kumar ve ark., 2021), steroidler (Popov ve ark., 1985; Silva ve ark., 2013b; Neto ve ark., 2018), terpenoidler (Neto ve ark., 2018; Sánchez-García ve ark., 2019; Moreira ve ark., 2022), yağ asitleri (Frikha ve ark., 2011; Neto ve ark., 2018; Monteiro ve ark., 2020) gibi çeşitli sekonder metabolit gruplarına mensup maddeler içermektedir.

Ülkemizin denizlerinden toplanan *U. rigida* türleri ile çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ünal ve ark. (2020) İskenderun Körfezi (Hatay), Kale ve Arsuz bölgelerinden toplanan *U. rigida* türünün DPPH serbest radikal giderim aktivitesini (IC_{50} 19,853±7,439 µg/mL) incelemiştir. Örnekleme yeri Marmara denizi kıyıları olan bir diğer çalışmada *U. rigida* metanol ekstresinin toplam fenolik içeriği (1,68±0,29 mg gallik asit/g) ile suda çözünen (4,08±1,69 mg askorbik asit/g) ve çözünmeyen (6,47±0,66 mg α-tokoferol/g) antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir (Yıldız ve ark., 2014). Ak ve Türker (2018) tarafından Çanakkale'den toplanmış *U. rigida*'dan hazırlanan su ekstrelerinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri ile DPPH serbest radikal giderim (IC_{50} 3,76mg/g) aktiviteleri incelenmiştir. Benzer olarak İzmir, Urla bölgesinden toplanan *U. rigida* örneğinin metanol ekstresinin toplam fenolik içeriği (71,8 mg gallik asit eşdeğeri/g) ve DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (%4,9 inhibisyon) tayin edilmiştir (Gülçelenk ve ark., 2012). Yalçın ve ark. (2020) tarafından Çanakkale'den örneklenen *U. rigida* türünde bulunan pigmentler HPLC ile kantitatif olarak tayin edilmiş, CUPRAC ve ABTS katyon radikali giderim yöntemleri ile teorik antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.

Taşkın ve ark. (2007) Çanakkkale'den örneklenen *U. rigida* türünün metanol ekstresinin *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olduğunu disk difüzyon metodu ile göstermiştir. Başka bir çalışmada İzmir, İnciraltı bölgesinden toplanan *U. rigida* materyali %95'lik etanol ile farklı sıcaklıklarda ekstre edilmiş ve her bir ekstrenin antibakteriyal ve antifungal aktiviteleri incelenmiştir. Ticari antibiyotikler kadar etkili olmamakla birlikte *Bacillus subtilis* için tüm sıcaklıklarda hazırlanan ekstreler, *S. aureus* için; 60°C

sıcaklıkta elde edilen ekstre, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* için 45°C ve 60°C sıcaklıkta elde edilen ekstreler ve *Listeria monocytogenes* için 60°C sıcaklıkta elde edilen ekstre yüksek etkinlik göstermiştir (Gümüş ve Ünlüsayın, 2016). Tüney ve ark. (2006) İzmir, Urla'dan toplanmış *U. rigida* makroalg materyalinin aseton, metanol, dietil eter ve etanol ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. Dietil eter ekstresi *Candida* sp., *Enterococcus faecalis, S. aureus, S. epidermidis, P. aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karşı yüksek aktivite göstermiştir.

Çelikler ve ark. (2009) sıçanlar üzerinde yaptıkları *in vivo* testlerde *U. rigida* metanol ekstresinin yüksek antihiperglisemik, antioksidan ve antigenotoksik kapasiteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada *U. rigida* etanol ekstresinin hipertiroidizm kaynaklı kromozom hasarına karşı antigenotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Çelikler ve ark., 2014).

Yapılan literatür çalışması sonucu *U. rigida* türünden sekonder metabolitlerin izolasyonu ve yapı tayinleri ile ilgili oldukça kısıtlı sayıda araştırma olduğu belirlenmiştir. Silva ve ark. (2013b) Azorlar takım adalarından toplanan *U. rigida*'nın metanol ekstresinden izofukosterol, 7(E)-3β-hidroksi-5α,6α-epoksimegastigman ve (+)-dehidrovomifoliol metabolitlerini izole etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Karadeniz'den toplanan *U. rigida* makroalginden serbest ve esterlenmiş steroller izole edilmiş ve ana bileşenin 28-izo-fukosterol olduğu bildirilmiştir (Popov ve ark., 1985).

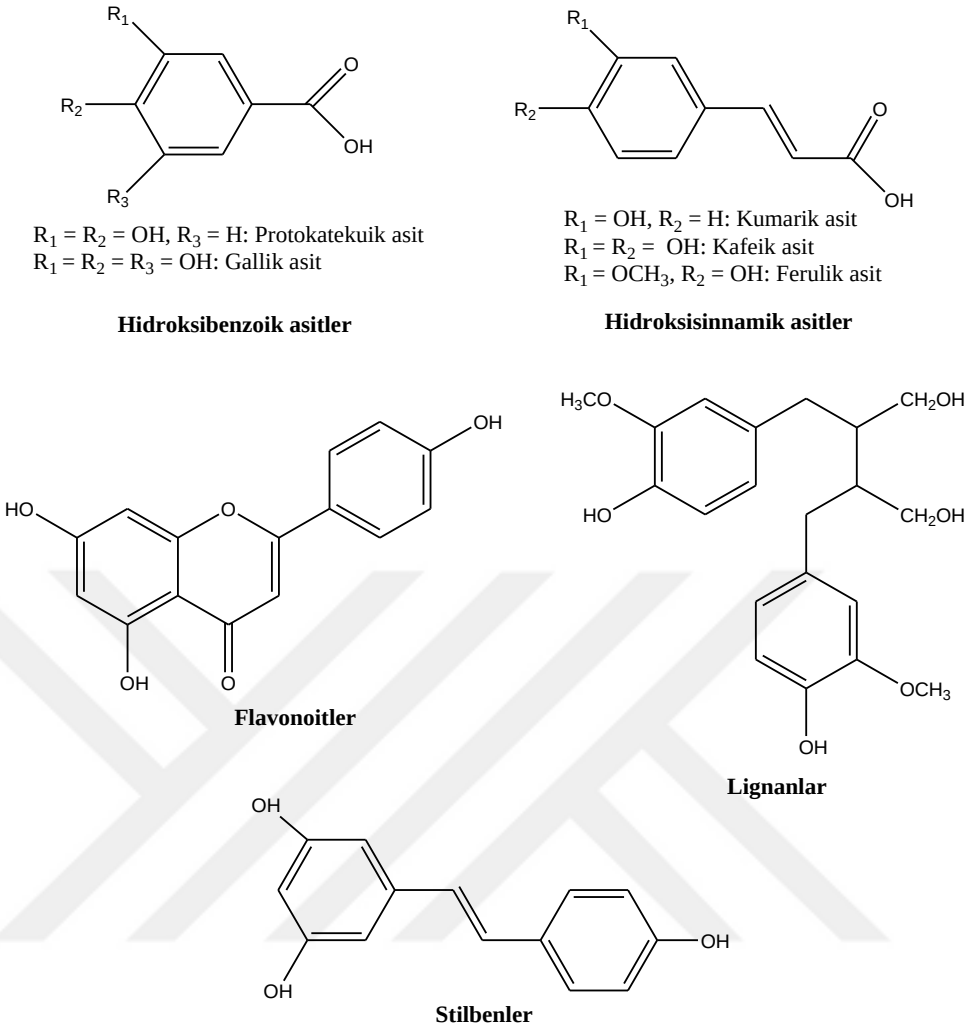
Ülkemizde yetişen *U. rigida* türü ile sekonder metabolit izolasyonu-yapı tayini çalışması bulunmamasına rağmen kimyasal içerik tayinleri üzerine yapılan incelemeler mevcuttur. Bir çalışmada Mersin sahilinin farklı noktalarından toplanan *U. rigida* örneklerinin toplam yağ ve yağ asidi düzeyleri belirlenmiştir. Majör doymuş yağ asitleri palmitik asit ve stearik asit olarak tespit edilmiştir (Peksezer ve ark., 2021). İrkin ve Erduğan (2014) Çanakkale Boğazı'nın sekiz farklı noktasından alınan *U. rigida* taksonunda mevsimsel olarak protein, yağ, kül ve azotsuz ekstre yüzdeleri değişimini incelemiştir. Ayrıca Berik ve Çankırılıgil (2019) Çanakkale'den örneklenen *U. rigida* türünün makro element olarak kalsiyum, potasyum, magnezyum ve sodium, mikro element olarak ise bor, baryum, krom, bakır, demir, mangan ve çinko içerdiğini ve tümünün gıda kodeksine göre uygun miktarlarda olduğunu bildirmiştir.

2.3. Fenolik Bileşikler

Geçmişten günümüze insanlar bitkilerden tedavi amaçlı olarak faydalanmaktadırlar. Bitkiler çeşitli yapılara sahip organik moleküller olan sekonder metabolitleri sentezlemektedirler. Bu sentez fotosentez süreci ile gerçekleşmektedir. Sekonder metabolitler genellikle fenolik bileşikler, terpenler ve steroitler, ve alkaloitler olmakla üç grupta incenlenmektedirler. Bitkilerde fizyolojik görevleri olmasa da biyolojik açıdan oldukça önem taşımaktadırlar. Bitkileri zararlı dış faktörlerden korumaktadırlar. Günümüzde ilaç endüstrisinde kullanılan etken maddelerin yaklaşık olarak %25'i bitki kaynaklı sekonder metabolitleridir. Bu bileşikler ayrıca kozmetik ve nutrasötik ürünlerin bileşimlerinde sıklıkla bulunmaktadır (Bourgaud ve ark. 2001).

Fenolik bileşikler yapısında bir ya da daha fazla hidroksil grubu içeren sekonder metabolitlerdir. Kağıt kromatografisinin geliştirilmesiyle kimyasal yapılarının belirlenmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir. Bate ve Smith bu yöntemi ilk önce flavonoid pigmentlerin ayrılması, daha sonrasında lökoantosiyanidinlerin karakterizasyonu için kullanmıştır (Cheynier., 2012). Fenolik bileşikler genellikle fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar ve stilbenler olmak üzere 4 grupta incelenmektedir (Şekil 2-1).

On dokuzuncu yüzyılın sonundan itibaren bilim camiasının fenolik bileşiklere olan ilgisi artmıştır. Bu bileşikler bitkilerde patojen ve böcek hücumu, UV radyasyonu gibi ekolojik ve fizyolojik etkilerden korunma amacı ile sentezlenmektedir (Khoddami, 2013). Bitkilerde ve bitkisel yiyecek ve içeceklerde miktar bakımından zengin olarak bulunurlar. Bitki temelli gıdaların kalitesi, lezzeti, kırmızı meyvelerin, meyve sularının ve şarapların renginden sorumludurlar. Fenolik bileşiklerin antioksidan, antidiyabetik, antienflamatuvar, antialerjik, antimikrobiyal, antiviral, antipatojenik ve antitrombotik gibi biyolojik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir (Manach ve ark., 2004).



Şekil 2- 1: Fenolik bileşikler

2.3.1 Fenolik Asitler

Fenolik asitlerin temel kimyasal yapıları bir fenolik halka ve karboksilik asit grubundan ibarettir (Şekil 2-1.) Aromatik halkadaki hidroksil gruplarının sayısı ve yerleşimine göre çeşitlilik gösterirler (Khoddami, 2013). Karbon iskeletlerine göre benzoik asitten elde edilen hidroksibenzoik asitler ve sinamik asitten elde edilen hidroksisinamik asitler olmakla iki sınıfta kategorize edilmektedirler. Ferulik, kafeik, p-kumarik ve sinapik asitler hidroksisinamik asit türlerine, gallik, vanilik, sirinjik ve protokateşik asitler hidroksibenzoik asit türlerine örnek olarak gösterilebilir (Albuquerque ve ark., 2021). Bu yüksek lisans tezi çalışması kapsamında miktar tayinleri yapılan kafeik asit en çok sebze ve meyvelerde, ferulik asit ise tahıllarda bulunur (Alara ve ark., 2021).

2.3.2 Flavonoidler

Flavonoidlar, 8000'den fazla bileşiği içeren ve aromatik amino asitler olan fenilalanin ve tirozinden oluşan en yaygın fenolik bileşik sınıfıdır (Albuquerque ve ark., 2021; Cheynier., 2012). Sekonder metabolit olmalarına rağmen aminoasitler, karbonhidratlar benzeri primer metabolitlerden türerler. Bu bileşik sınıfının kimyasal yapısı bir C6—C3—C6 iskeletine dayanmakta ve A, B ve C olarak etiketlenmiş üç halkasında 15 karbon atomuna sahip olan flavan çekirdeğinden ibarettir (Lattanzio, 2013).

Flavanoidler flavonlar, flavanonlar, flavonoller, flavanoller, antosiyaninler, ve izoflavonlar olmakla altı alt kategoride sınıflandırılmıştır. Bu kategoriler, flavonoidin merkezi C halkasının oksidasyonuna göre belirlenmiştir. En çok bilinen flavonoidler kersetin, kateşin, rutin, naringenin ve daidzein bileşikleridir (Alara ve ark., 2021).

Flavonoller, bitki dokularını UV ışınlarından korur. Aynı ve farklı çeşit meyvelerde flavonol konsantrasyonu, güneş ışığında biyosentezlerindeki farklılıklar sebebiyle değişim gösterirler. Yapraklı sebzelerde yaprağın daha yeşil olan dış tarafı, içteki soluk renkli taraftan daha fazla miktarda flavonol içerir (Cheynier., 2012). Bir bardak portakal suyunda 40 ile 140 mg arasında flavanon glikozit bulunabilir. Ayrıca nane gibi aromatik bitkiler flavanon içerebilir. Flavanoidlerin alt grubundan olan flavanonlar turunçgillerde, portakalda, limonda, greyfurtta hesperidin, eriodiktiol ve aglikon naringenin olarak bulunmaktadırlar (Alara ve ark., 2021).

İzoflavonoidler, östrojen reseptörlerine afiniteleri sebebiyle fitoöstrojenik olarak bulunur. Steroid olmasalar da, 7 ve 4' konumlarında -OH içermekle östradiol gibi bir konfigürasyondadırlar. İzoflavonlar ve diğer flavonoidler arasındaki esas farklılık, benzen halkasının C3'teki konumundadır. İzoflavon kaynaklarına işlenmiş soya gibi baklagilleri örnek gösterilebilir (Alara ve ark., 2021).

In vivo, in vitro ve epidemiyolojik çalışmalar özellikle kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu oldukça etkili oldukları kanıtlanmıştır (Birman, 2012). Kanser hastalığı ve kalp rahatsızlığı olan kişilere düzenli bir şekilde uygulandıklarında yayılmada azalma gözlemlenmiştir. (Ignat ve ark., 2011).

2.3.3 Lignanlar

Fenolik bileşiklerin bu sınıfı, 2-fenilpropanların oksidatif dimerizasyonu sonucunda oluşur. Lignanlar, östrojenik/anti-östrojenik aktiviteleriyle fitoöstrojenler olarak

belirlenmiştir (Cong ve ark., 2017). Lignanların insan sağlığına olan faydaları, türüne bağlı olarak değişiklik gösterir. Özellikle keten tohumu, zengin bir lignan kaynağıdır (Alara ve ark., 2021).

2.3.4. Stilbenler

Stilbenlerin kimyasal yapısı C6—C2—C6 iskeletine dayanmaktadır. Bazı tilben türlerir belli bitkilerin karakteristik özellikleri olarak tanımlanmasına ragmen, bitkiler arasında geniş olarak yayılmışlardır (Lattanzio, 2013). Üzüm, yer fıstığı, dut gibi pek çok bitkinin yoğun stres altında salgıladığı bir stilben türü olan resveratrolün insan sağlığına birçok olumlu etkisi vardır (Ignat ve ark., 2011).

2.4. Fenolik Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Ekstraksiyon Yöntemleri

2.4.1.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, bir çözeltinin bileşenlerini uygun çözücü ile temas ettirerek çözeltiden uzaklaştırmak/ayırmak için gerçekleştirilen işlemdir. Bu ekstraksiyon yönteminde, bileşenleri ayırmak için çözücülerin polarite farklılıklarından, bileşenlerin hidrofobik/hidrofilik karakterlerinden faydalanılır. Uygun çözücü seçilirken geri kazanım, seçicilik, viskozite vb. parametreler incelenmelidir. Ekstre edilecek bileşene kıyasla çok düşük veya yüksek kaynama ısısına sahip çözücü seçimi işlem sonunda bileşenin elde edilmesini kolaylaştıracaktır. İki faz arasında yüksek yoğunluk farkının bulunması da sıvı fazların kolayca yerleşmesini sağlar. Yüksek viskoziteli çözücüler dağılım adımında sorunlara sebep olur ve kütle transferine olumsuz etki gösterir. Ayrıca ilaç ve gıda işlemlerinde toksik olmayan çözücülerin tercih edilmesine önem verilmektedir.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonunun çağdaş uygulaması on dokuzuncu yüzyılın ortalarından başlamış, tasarımındaki gelişmelerle birlikte mühim bir tekniğine dönüşmüştür. Farmasötik, gıda, metalurji gibi endüstri alanlarında sıvı-sıvı ekstraksiyon ekipmanları olarak statik ekstraksiyon kolonları, döner çalkalamalı kolonlar, darbeli kolonlar, santrifüjlü ekstraktörler vb gibi teçhizatlar kullanılmaktadır.

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, yüksek moleküllü ağırlıklı fenolik bileşikleri zenginleştirmek, ekstreleri uygun çözücülerle temizlemek için kullanılmaktadır. Bu yöntem, çeşitli tahıllardan fenoliklerin ekstraksiyonunda en yaygın olan tekniklerdendir. Ucuz bir teknik olmakla birlikte, organik çözücülerin kullanımını ve uzun süreli ekstraksiyon gibi dezavantajları vardır (Antony ve ark., 202; Mencin ve ark., 2021).

2.4.1.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Katı örnekler için uygulanan katı-sıvı ekstraksiyonunda numuneler homojenize edilir ve bir çözücü veya çözücü karışımı ile ekstraksiyon gerçekleştirilir. Yüksek ekstraksiyon verimi için numunin partikül boyutu, nem içeriği, çözücü türü, sıcaklık, ekstraksiyon süresi gibi paramtetreler optimize edilmelidir. Ekstraksiyondan sonra santrifüj veya filtrasyon uygulanır ve çözücü buharlaştırılırak ekstre elde edilir. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda, en çok etanol, metanol veya bu iki çözücünün belirli oranlarda su ile karışımları en çok tercih edilen çözücü sistemleridir (Herrero ve ark. 2012).

2.4.1.3. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu yüzyıldan fazla süredir yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Geleneksel yöntem ilk defa sütte yağ içeriğinin saptanmasında kullanılmıştır. Katı veya yarı-katı numuneler için uygun olan bu yöntemde kullanılan Soxhlet ekstraktörü çözücü şişesi, sifon, geri soğutucu ve ısıtıcı manto sisteminden oluşur. Numune, ekstraksiyon haznesinin içine yerleştirilir. Çözücü, alt kısımdaki çözücü şişesine yerleştirilir ve kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır. Kaynayan çözücüden çıkan buharlar geri soğutucuya doğru hareket eder ve yoğunlaşarak numuneye doğru damlar. Çözücü numune ile karışır ve ardından çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz numune bölmesini boşaltıp çözücü şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak çözücü numune boyunca sirküle edilir ve her sirkülasyon için taze çözücü kullanılır. Ekstre ise çözücü şişesinde kalır. Ekstraksiyon çözücüleri genellikle saf organik çözücüler veya bunların karışımlarıdır. Soxhlet ekstraksiyonunda ekstrakte edilen bileşikler, çözücünün kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır (Herrero ve ark. 2012, Büyüktuncel 2012).

2.4.1.4. Matriks Katı-Faz Dispersiyonu

Matriks katı-faz dispersiyonu (MSDP) bir numunenin uygun bir katı destek malzeme ile direkt olarak mekanik karıştırılmasına dayanmaktadır. Bu işlemin sonucunda MSDP harmanı olarak adlandırılan yarı kuru, homojen ve kullanımı kolay malzeme elde edilmektedir. İlk olarak cam, kuvars ya da porselen bir havan ve tokmak yardımıyla homojenizasyon yapılır. Elde edilmiş karışım kantitatif şekilde tabanında kağıt friti olan SPE kolonuna yönlendirilir ve şırınga pistonu yardımıyla basınç uygulanır. Sonrasında amaca göre hafif vakumla altında bir ya da daha fazla çözücü sistemi ile elüsyon gerçekleştirilir. MSDP ekstrsksiyonunu etkileyen faktörler sırasında ortalama tanecik boyutu, kullanılan katı destek malzemesinin türü, bağlı fazın karakteri gibi parametreler yer alır. MSDP'nin avantajları arasında özel ekipmana ihtiyaç olmaması, numunede parçalanma, ekstraksiyon ve saflaştırmayı bir adımda yaparak numunenin hazırlanma zamanının göz görülür şekilde azalması sayılabilir. MSDP sayesinde sadece ekstraksiyon süresi kısalmakla kalmaz, aynı zamanda eser bileşiklerin kantitatif izolyasyonu için gerekli numune miktarı ile birlikte organik çözücülerin tüketimi de azalır (Wianowska ve Gil, 2019; Barker, 2007).

2.4.1.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon çözücülerinin kritik sıcaklık ve basınç değerlerinin üzerinde kullanılmasıyla gerçekleştirilen süper kritik akışkan ekstraksiyonu, düşük sıcaklık kullanımı ve daha düşük enerji sarfiyatı gibi avantajlara sahip bir tekniktir. Çözünen fazda organik çözücü olmaması sebebiyle hem daha iyi nitelikte ürün elde edilir hem de daha yeşil bir yöntemdir. Süperkritik karbon dioksit, orta dereceli kritik koşullarda kendine özgü özellikleri, rahat ulaşılabilmesi, toksik ve yanıcı olmaması ve kimyasal kararlılığndan dolayı en çok tercih edilen çözücüdür. Bununla birlikte polar fenolik bileşiklerin ekstrasiyonunda karbon dioksite yardımcı çözücü olarak düşük miktarda bir polar çözücü (genellikle etanol) eklenmesi ile ekstraksiyon verimi yükseltilebilir. Sabit sıcaklıkta basıncın arttırılması ve yoğunluğun yükselmesi de verimi iyi yönde etkiler (Castro, 2010).

2.4.1.6. Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyon

Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyon ekstraksiyon hızının artması ve çözücü moleküllerinin hızlı hareket etmesini temin etmek için ultrasonik dalga kullanan ve

yüksek kütle aktarım hızıyla sonuçlanan kullanışlı, çevre dostu ve ekonomik bir ekstraksiyon tekniğidir. Ekstrasiyon ultrasonik banyo veya ultrasonik horn transdüseri yardımıyla gerçekleştirilebilir. Ultrasonik banyo sıcaklık denetimli cihazla donatılmıştır ve uçucu yağlar gibi sıcaklığa duyarlı bileşimlerin ekstraksiyonun kolaylıkla kullanılabilir. Ultrasonik dalga destekli ekstraksiyonu etkileyen parametreler ekstraksiyon süresi, sıcaklık, ultrasonik gücü, sıvı-katı oranı ve çözücü türüdür. Avantajları sırasına iyi tekrarlanabilirlik, atmosferik basınç ve çevre ısısı açısından sağlamlık, kolay kullanım, orta seviye solvent tasarrufu sayılabilir. Dezavantajları ise filtrasyon gereği ve yüksek frekanslarda bileşiklerin yapılarında bozunmaya sebep olabilmesidir (Syahir ve ark., 2020).

2.4.1.7. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon katı numunelerden organik bileşiklerin ekstraksiyonunda iyi sonuçlar veren ve geleneksel metotlarla kıyasla daha küçük miktarda organik çözücü ve kısa zaman gerektiren bir tekniktir. Yöntemde çözücü ile temas halindeki örneğe mikrodalga enerjisi uygulanır. Bu teknik için su, yüksek dielektrik sabitli, kullanışlı çözücüdür. Ekstraksiyon verimini etkileyen faktörler sırasına çözücü oranı, mikrodalga gücü, sıcaklık, ekstraksiyon süresi bulunmaktadır (Chan, 2011).

2.4.1.8. Katı Faz Ekstraksiyonu

Fenolik bileşikler gibi organik maddeleri deriştirme ve ayırma işlemlerinde katı faz ekstraksiyonu (SPE) önemli bir tekniktir. SPE'de adsorban ile doldurulmuş kolonlar, şırıngalar, kartuşlar kullanılmaktadır (Fedotov ve ark., 2019).

SPE'de adsorban doğru bir şekilde seçilmelidir. Fenolik bileşikleri ekstraksiyonunda sıklıkla silika yada polimerik bazlı C18 bağlı faz kullanılmaktadır (Pico ve ark., 2007). Bunun dışında hidrofilik-lipofilik denge kartuşları da daha yüksek duyarlılık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım değerleri gibi avantajlarıyla tercih edilmektedir (Pérez ve ark., 2008).

SPE uygulamasında sorbent stasyoner faz rolünü oynar. Bir SPE kartuşu ile gerçekleştirilecek olan bir prosedür şartlama, örneğin yüklenmesi, yıkama ve elüsyon

basamaklarından oluşur. Yüksek geri kazanım elde etmek için şartlama, yıkama ve elüsyon çözücüleri dikkatli seçilmelidir (Li ve ark., 2017).

2.4.2. Tayin Yöntemleri

2.4.2.1. Kağıt Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi (İTK), kimyasal maddelerin hem tanımlanması hem de miktarının belirlenmesi için kullanılabilen basit bir kromatografik tekniktir. Tipik olarak, analitler alıkonma faktörü değerleri kullanılarak tanımlanırken, görsel inceleme kantifikasyon için en basit yöntemdir. Ancak bu yöntemin uygulamaları, analitlerin görselleştirilebildiği (örneğin, renk oluşumu veya fluoresans ışıma yoluyla) ve sayısal belgelemenin gerekli olmadığı durumlarla sınırlıdır (Stroka ve ark., 2002).

Kağıt kromatografisinde, stasyoner faz olarak Whatman filtre kağıdı kullanılırken, İTK'da stasyoner faz olarak silis jeli, selüloz ve poliamid tabakaları kullanılır (Robbins, 2003).

İTK hızlı olması, çeşitli adsorbanlarda uygulanabilirliği gibi avantajlarından dolayı yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bitki materyallerinde İTK için yaygın metotlarda genellikle asit veya baz ilavesiyle %80 etanol gibi alkol-su karışımlarında mobil faz olarak kullanılmasını içerir (Kagan ve Flythe, 2014).

2.4.2.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi

Folin-Ciocalteu yöntemi eski zamanlardan beri gıda ve tarım endüstrilerinde toplam fenolik içeriğini tanımlamak için kullanılmıştır. Yöntemin kolay kullanımlı, düşük maliyeti ve hızlıdır. Toplam fenoliklerin miktarı kolorimetrik olarak belirlenmektedir (Pico ve ark., 2020). Yöntem, fenolik bileşikler gibi kolay oksitlenen maddelerin seçici oksidasyonuna dayanmaktadır. Çok çeşitli fenolik bileşiklerde iyi sonuçlar verse de, bazı fenolik olmayan bileşiklerin de indirgeyici moleküllerden etkilenmesi yöntemin dezavantajlarındandır (Chen ve ark., 2015). Ayrıca bu prosedür ile fenolikler bireysel olarak tanımlanamamaktadır (Robbins, 2003).

2.4.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), fenolik bileşiklerin hem kalitatif hem de kantitatif analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. HPLC prosedürü genellikle geleneksel bir C18 kolon ve izokratik veya gradient elüsyon ile optimize edilmiş bir mobil faz programıyla fenolik bileşileri ayırmada etkilidir. C18 polar yapıda olmadığından ve fenolik bileşiklere benzer moleküler ağırlığa sahip olduğundan, her bir fenolik bileşiğin tutulma süresi büyük ölçüde polaritesi tarafından belirlenir. Daha yüksek polariteye sahip fenolik asitler, ters fazlı C18 kolonunda daha kısa alıkonma sürelerine sahiptir. Ters faz HPLC sisteminde mobil fazın iyonik şiddet açısından güçlü olması gerekir ve tipik olarak su, metanol, asetik asit, formik asit, asetonitril vb. çözücüler 0,8 - 1,5 mL/dak akış hızında kullanılır (Xu, 2012). HPLC araştırmalarında örneğin kimyasal özelliklerinde göre spektrofotometrik, spektrofluorimetrik, elektrokimyasal, kütle spektroskopisi dedektörleri gibi farklı dedeksiyon yöntemleri uygulanabilir. Spektrofotometrik dedektör ile genellik 190 ila 380 nm arasında değişen dalga boyları tercih edilirken izleme için en yaygın kullanılan dalga boyu, muhtemelen daha önceki lambalardan gelen güçlü enerji hattına dayanan geleneksel yaklaşım nedeniyle 254 nm'dir (Robbins, 2003).

Fenolik bileşiklerin analizlerinde HPLC'nin yüksek seçicilik, hassasiyet, çözünürlük, kesinlik gibi birçok avantajları vardır. Bununla birlikte, standart maddelerin eksikliği nedeniyle HPLC analizi, flavonoid glikozitler ve proantosiyanitler gibi bazı polifenol sınıflarına başarılı bir şekilde uygulanamaz. HPLC, en çok kullanılan tekniklerden biri olmasına rağmen, gözlenebilme ve tayin limitlerinde bazı sınırlamalar mevcuttur (Ignat, 2011).

2.4.2.4. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi (GC) yöntemi, gaz halindeki, uçucu ya da uygun bir türevlendirme reaksiyonu ile uçucu hale getirilebilen bileşiklerin analizleri için dizayn edilmiş tekniktir. GC'de, örnek basınç altında inert gaz ile kolondan geçirilmektedir. Analitin stasyoner faza olan ilgisi, kolonda kalma süresini belirler (Ignat ve ark., 2013).

Birçok fenolik bileşik uçucu değildir. Bu sebeple fenoliklerin analizlerinde GC'nin kullanımı kısıtlıdır. Bu bileşiklerin GC sistemine enjeksiyondan önce, buharlaşma noktalarını düşürmek için kimyasal yöntemlerle ester formuna türevlendirilmeleri

gerekmektedir. Hidroksil gruplarınının, trimetilsilil grupları gibi kimyasal gruplarla değiştirilmesiyle de buharlaşma kapasitesi artırılabilmektedir. Bitki ekstreleri ile çalışılırken türevlendirme reaksiyonu, ekstrenin kimyasal bileşimi, reaksiyonun sıcaklığı, süresi ve reaktiflerin saflığı gibi faktörlere bağlıdır. Örnekteki nem, türevlendirme reaksiyonu verimini düşürdüğünden, reaksiyondan evvel tamamen ortamdan uzaklaştırılmalıdır (Ignat ve ark., 2013; Xu ve ark., 2012).

2.5. *Ulva* Cinsinde Bulunan Fenolik Bileşiklerin Tayinleri

Bu yüksek lisans tezi kapsamında litratürdeki *Ulva* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin tayini için gerçekleştirilmiş olan çalışmalar tarandı. Tablo 2-1'de derlenen yayınlar kullanılmış analitik yöntemler özetlendi.

Tablo 2- 1: *Ulva* türlerinde bulunan fenolik bileşiklerin analizleri için geliştirilen yöntemler

Tür	Analit	Ekstraksiyon	Analiz	Kaynak
U. rigida	Kersetin, gallik asit, fukoksantin, floroglusinol, vanilin, ferulik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: metanol-su	LC-MS/MS Kolon: C-18 (4,6 x150mm, 5 µm) Gradient elüsyon Hareketli faz A: %0,25 asetik asit (sulu) Hareketli faz B: asetonitril/su (80:20, h/h)	Kumar ve ark., 2020
U. lactuca	Gallik asit, kafeik asit, kateşin	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: etanol/su (70:30)	HPLC-DAD Kolon: C18 (5µ, 250mm- 4.6mm) Gradient elüsyon Dalga boyu: 320 nm Hareketli faz A: %0,1 asetik asit (sulu) Hareketli faz B: asetonitril	Pappou ve ark., 2022
U. lactuca	Gallik asit, protokateşik asit, gentisik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, kafeik asit, salisilik asit, benzoik asit, ferulic asit, elajik asit, p-kumarik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: etanol	HPLC-DAD, Kolon: C8 (150 x 4,6 mm, 5µm) İzokratik elüsyon Hareketli faz: metanol ve 10 mM amonyum asetat tamponu (pH 5,4) karışımı (12:88 h/h) Dalga boyu: 280 nm	Sirbu ve ark., 2019

Tablo 2-1 devam

U. rigida	Gallik asit	Soxhlet ekstraksiyonu Çözücü: %80 metanol	Folin-Ciocalteau yöntemi	Yildiz ve ark., 2014
U. fasciata	Gallik asit, asetilsalisilik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: %80 metanol	Folin-Ciocalteau yöntemi	Anis ve ark., 2018
U. rigida	1,3,5-Trihidroksibenzen	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: metanol/su (80:20)	Folin-Ciocalteau yöntemi	Figueroa ve ark., 2014
U. rigida	Gallik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: metanol	Folin-Ciocalteau yöntemi	Yildiz ve ark., 2012
U. rigida,	Gallik asit	Katı- sıvı ekstraksiyon Çözücü: su, etanol, aseton	Folin-Ciocalteau yöntemi	Neto ve ark., 2018
U. clathrata, U. linza, U. flexuosa, *U. intestinalis*	Gallik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: %80 metanol	Folin-Ciocalteau yöntemi	Farasat ve ark., 2014
U. clathrata, U. prolifera	Askorbik asit, gallik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: %80 metanol	Folin-Ciocalteau yöntemi	Farasat ve ark., 2013

Tablo 2-1 devam

U. rigida	Gallik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: metanol, etanol, su	Folin-Ciocalteau yöntemi	Mezghani ve ark., 2013
U. fasciata, U. lactuca	Gallik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: metanol:su (70:30 h/h)	Folin-Ciocalteau yöntemi	Moulazadeh ve ark., 2021
U. rigida	Floroglusinol	1. Katı-sıvı ekstraksiyon Çözücü: metanol:su (80:20) 2. Soxhlet ekstraksiyonu Çözücü: metanol	Folin-Ciocalteau yöntemi	Trigui ve ark., 2013
U. rigida	3,4,5-Trihidroksibenzoik asit	Katı-sıvı ekstraksiyon metanol/su (80:20, h/h) metanol/su (50:50, h/h) etanol/su (80:20, h/h) etanol/su (50:50, h/h)	Folin-Ciocalteau yöntemi	Monteiro ve ark., 2020

2.6. Analitik Metot Validasyonu ve Validasyon Parametreleri

Analitik metot validasyonu çalışmasının temel amacı, bir analitik metodun amaca uygun olup olmamadığının test edilmesine dayanır. Seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, aralık, gözlenebilme sınırı, tayin sınırı temel validasyon parametreleridir (FDA 2014, ICH 2005).

2.6.1. Seçicilik

ISO, bir analitik yöntemin seçiciliğini "belirlenmiş bir ölçüm prosedürü ile kullanılan bir ölçüm sisteminin, bir veya daha fazla parametre için ölçülen miktar değerlerini, her bir parametre için değerlerin diğer ölçülen değişkenlerden veya incelenen fenomen, vücut veya maddede bulunan ek miktarlardan etkilenmeyecek şekilde veren özelliği" olarak tanımlar (Kaur and Gupta, 2018).

2.6.2. Doğrusallık

Doğrusallık, analitik yöntemin belirli bir aralıktaki analit konsantrasyonuyla doğru orantılı sonuçlar sağlama kabiliyetini ifade eder (Sharma ve ark., 2018).

2.6.3. Aralık

Analitik yöntemin aralığı, gerekli kesinlik, doğruluk ve doğrusallığı gösteren analit konsantrasyonlarını kapsar (Kaur and Gupta, 2018).

2.6.4. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, elde edilen değer ile kabul edilen gerçek veya referans değer arasındaki yakınlığı ölçer. Doğruluğu değerlendirmek için test numunelerine bilinen miktarlarda analit eklenir ve herhangi bir girişim olmadığından emin olmak için standart ve boş çözeltilerle birlikte analiz edilir. Doğruluk hata ya da geri kazanım olarak hesaplanır (Bhardwaj ve ark., 2015).

2.6.5. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, belirlenmiş koşullar altında aynı numuneden elde edilen ölçümlerin tutarlılığını ölçer. Üç seviyede değerlendirilebilir: tekrarlanabilirlik (tek bir laboratuvar içinde), ara tekrarlanabilirlik (bir laboratuvar içinde ancak varyasyonlarla) ve tekrar üretilebilirlik (farklı laboratuvarlar arasında). Kesinlik tipik olarak standart sapma, bağıl standart sapma, varyasyon katsayısı gibi ölçütler kullanılarak ifade edilir (Bhardwaj ve ark., 2015).

2.6.6. Gözlenebilme Sınırı

Gözlenebilme sınırı (LOD), bir örnekte tespit edilebilen ancak tam olarak ölçülemeyen minimum analit miktarıdır. Temel gürültülü prosedürler için LOD, tipik olarak ifade edilen 3:1 sinyal/gürültü oranı (S/N) kullanılarak belirlenir. HPLC'de S/N, S/N = H/h olarak hesaplanır; burada H pik yüksekliğidir ve h boş bir çözeltinin kromatogramındaki taban çizgisinden en büyük gürültü dalgalanmasıdır (ICH, 2005; Bhardwaj ve ark., 2015).

LOD, Eşitlik-1 ile de hesaplanabilir:

$$LOD = 3{,}3\ \sigma / S \qquad \textbf{Eşitlik-1}$$

Burada, σ, yanıtın standart sapması, S, ölçü eğrisinin eğimini ifade eder (ICH 2005).

2.6.7. Tayin Sınırı

Tayin sınırı (LOQ) S/N oranının 10:1 olduğu konsantrasyon olarak belirlenir (Bhardwaj ve ark., 2015)

LOD, Eşitlik-2 ile de hesaplanabilir:

$$LOD = 10\ \sigma / S \qquad \textbf{Eşitlik-2}$$

Burada, σ, yanıtın standart sapmasını temsil eder ve S, ölçü eğrisinin eğimini simgeler (ICH 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Analizin Yapıldığı Yer

Bu yüksek lisans tez çalışması, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir**.**

3.2. Makroalg Materyali

U. rigida makroalg materyali 2022 Şubat ayında Prof. Dr. Ergün Taşkın tarafından İstanbul, Caddebostan kıyılarından örneklendi ve teşhis edildi. Materyal çeşme suyu ve ardından distile su ile yıkandı, oda sıcaklığında, gölgede kurutuldu. Ekstraksiyon öncesinde öğütüldü.

3.3. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

o-Fosforik asit Merck firmasından (Darmstadt, Almanya), metanol (HPLC saflığında), asetonitril (HPLC safliginda) kafeik asit, ferulik asit, rutin Sigma-Aldrich firmasından (Darmstadt, Almanya) temin edildi. Hidrofilik-lipofilik denge (hydrophilic-lipophilic balance, HLB) katı faz ekstraksiyonu kartuşu (Supel-Select SPE, HLB 200 mg/6 mL) Sigma-Aldrich firmasından (Darmstadt, Almanya) satın alındı.

3.4. Cihaz ve Gereçler

- HPLC sistemi (Shimadzu LC-20A, SPD-20A dedektör, LC-20AT pompa ünitesi, DGU-2015 gaz giderici ünite, CTO-10ASVP kolon fırını, SIL-20AHT otomatik örnekleyici),
- C18 Analitik kolon (Supelco, 250x4,6 mm, 5 µm),
- Hassas terazi (OHAUS AX 224),
- pH metre (Mettler Toledo S210),
- Ultrasonik banyo (WiseClean, Wisd),
- Ultra saf su cihazı (ELGA-VEOLIA, PureLab Option-Q DV 25),
- Otomatik pipetler (Eppendorf, 1-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL),
- Döner buharlaştırıcı (rotary evaporator) (Buchi, Rotavapor R-200),
- Öğütücü (Waring),

- Şırınga ucu filtre (Macherey-Nagel, Chromafil Xtra PTFE-20/25 ve GF/PET-45/25), Enjektör (Set Inject, 5 mL ve 20 mL),
- Balon joje (5 ve 10 mL), cam vial, kapak, septum (Isolab)

3.5. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Miktar Tayini için Yöntem Koşullarının Belirlenmesi

3.5.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boylarının Seçimi

HPLC kullanılarak gerçekleştirilen fenolik bileşik analizlerinde, çoğunlukla C18 kolonlarının tercih edildiği literatür çalışmalarıyla belirlendi. Elüsyon tekniği olarak gradient programlama izokratik sistemlerden daha fazla tercih edilmektedir ve mobil faz genellikle bir sulu faz ve bir organik fazdan oluşmaktadır. Bu sistemlerde kullanılan sulu fazlara asetik asit, fosforik asit ve trifloroasetik asit gibi bir asit eklenmektedir. Fenolik bileşiklerin tayininde, spektrofotometrik dedektörler yaygın olarak tercih edilmektedir.

Literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak kolon seçimi amacı ile ebatları 250x4,6 mm olan kolon seçildi.

Kolon seçimi için literatür çalışmaları doğrultusunda, farklı ebatlardaki C18 kolonlar ile denemeler yapıldı. Hareketli faz olarak su, metanol, asetonitrilo-fosforik asit, asetik asit ve karışımlarının farklı oranlarını içeren çeşitli gradient elüsyon sistemleri ile çalışıldı. Analitlerin spektrumları alınarak dedektör dalga boyu belirlendi ve optimum dalga boyu tespit edildi.

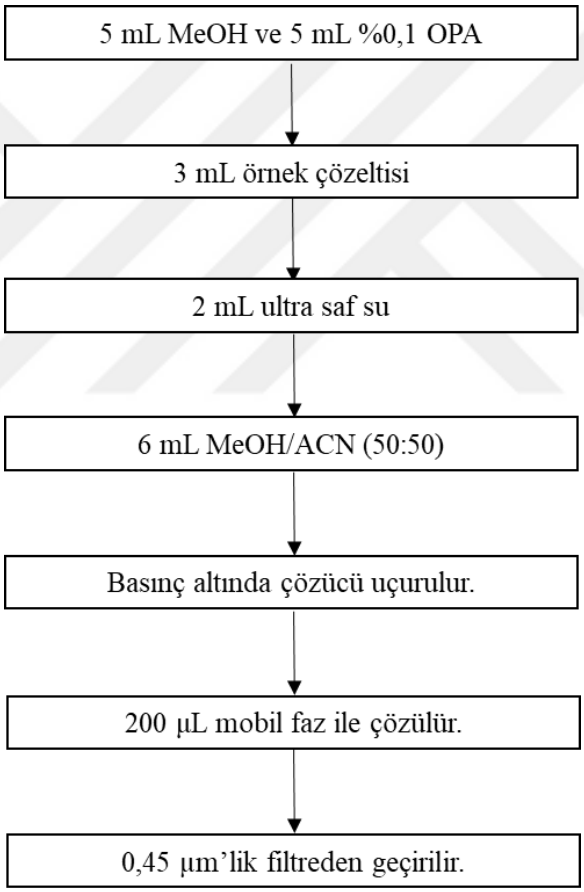
3.5.2. Ölçü Eğrileri

Ölçü eğrilerinin konsantrasyon aralıkları örnekte bulunan miktarlar gözönüne alınarak, kafeik ve ferulik asitleri için 0,1-1,0 µg/mL, rutin için ise 0,25-2,50 µg/mL olarak seçildi. Her bir standart çözelti 3 tekrar ile analiz edildi. En küçük kareler yöntemi kullanılarak ölçü eğrileri hazırlandı.

3.5.3. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Kurutulmuş *U. rigida* öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. Kuru ağırlık 122 g olarak belirlendi. Materyal öncelikle ortam sıcaklığında 500 mL (5×24 saat) n-hekzan ile yağlı

kısmından arındırıldı. Sonrasında, 500 mL (5×24 saat) metanol (HPLC saflığında) ile ortam sıcaklığında masarasyon işlemi uygulanarak ekstraksiyon gerçekleştirildi. Metanol basınç altında döner buharlaştırıcı ile uzaklaşdırıldı. Ekstre ağırlığı 5,60 g olarak belirlendi. Ekstreden hazırlanan 1000 µg/mL'lik çözeltinin analizinde fenolik bileşik pikleri izlenmedi. Sonraki denemede fenolik bileşiklerin deriştirilmesi için katı faz ekstraksiyonu (SPE) metodu kullanıldı. SPE metodunda HLB tipte katı faz kartuşu ile 5,00 µg/mL'lik standart çözelti (*U. rigida* örneklerinde miktar tayini yapılacak olan 3 fenolik bileşiğin karışımı) kullanılarak 3 tekrarlı denemeler gerçekleştirildi. SPE prosedürü Şekil 3-1'de verildi.



Şekil 3- 1: HLB kartuş ile SPE prosedürü

3.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyon Parametreleri

Yöntemin validasyonu, ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

parametreleri doğrultusunda gerçekleştirildi (ICH, 2005).

3.6.1. Doğrusallık

Yöntemin doğrusallığının değerlendirilmesi için korelasyon katsayısı, ölçü eğrisinin y eksenini kestiği nokta ve eğim gibi veriler gözden geçirildi. Bu çalışmada, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 ve 1,00 µg/mL kafeik asit ve ferulik asit, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 ve 2,50 µg/mL rutin içeren standart çözeltiler kullanıldı. Analiz sonuçlarından elde edilen verilerle ölçü eğrileri oluşturuldu. Detaylı veriler, Bölüm 4.1.2.'de sunuldu.

3.6.2. Uygunluk Parametreleri

Uygunluk parametreleri değerlendirilirken alıkonma süresi (t_R), kuyruklanma faktörü (T), ayırma gücü (Rs), alıkonma faktörü (k'), teorik plaka sayısı (N) ve teorik plaka eşdeğer yüksekliği (HETP) dikkate alındı. Elde edilen sonuçlar, Bölüm 4.2.2'de ayrıntılı olarak verildi.

3.6.3. Doğruluk

Doğruluk çalışması, 3 farklı konsantrasyondaki (kafeik asit ve ferulik asit için 0,10, 0,50 ve 1,00 µg/mL, rutin için 0,25, 0,75 ve 2,50 µg/mL) standart çözeltiler ile gerçekleştirildi. Sonuçlar, yüzde bağıl ortalama hata (RME) olarak verildi (Bölüm 4.2.3.).

Standart çözelti karışımı katılmış *U. rigida* örneği ile geri kazanım çalışması yapıldı. Konsantrasyonu 1000 µg/mL olan 450 µL *U. rigida* metanol ekstresi çözetisine her bir fenolik bileşikten 10,00 µg/mL içeren standart çözeltiden 50 µL katıldı. Yüzde geri kazanım sonuçları ölçülen derişimlerin teorik derişimlere oranları ile hesaplandı. Sonuçlar bölüm 4-5'te verildi.

3.6.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirlik ve ara tekrarlanabilirlik olmak üzere 2 kategoride incelendi. Tekrarlanabilirlik çalışmasında 3 farklı konsantrasyonda (kafeik asit ve ferulik asit için 0,10, 0,50 ve 1,00 µg/mL, rutin için 0,25, 0,75 ve 2,50 µg/mL) standart çözeltiler ile aynı gün içinde ard arda 3 analiz yapılarak çalışıldı. Yöntemin ara

tekrarlanabilirliği yine 3 farklı konsantrasyonda (kafeik asit ve ferulik asit için 0,10, 0,50 ve 1,00 µg/mL, rutin için 0,25, 0,75 ve 2,50 µg/mL) standart çözeltiler ile 3 ayrı günde ard arda 3 analiz yapılarak çalışıldı Sonuçlar, detaylı bir şekilde Bölüm 4.2.4'te verildi.

3.6.5. Gözlenebilme Sınırı

LOD, ölçü eğrisinin eğimi ve y eksenini kestiği noktanın standart sapması ile Bölüm 2.6.6.'da belirtilen Eşitlik-1 kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5.'de sunuldu.

3.6.6. Tayin Sınırı

LOQ, ölçüm eğrisinin eğimi ve y eksenini kestiği noktanın standart sapması ile Bölüm 2.6.7.'de belirtilen Eşitlik-2 kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6.'de sunuldu.

4. BULGULAR

4.1. *U. rigida'*da Bulunan Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini için Geliştirilen HPLC Yönteminin Koşulları

4.1.1. Kolon, Hareketli Faz ve Dedektör Dalga Boyu

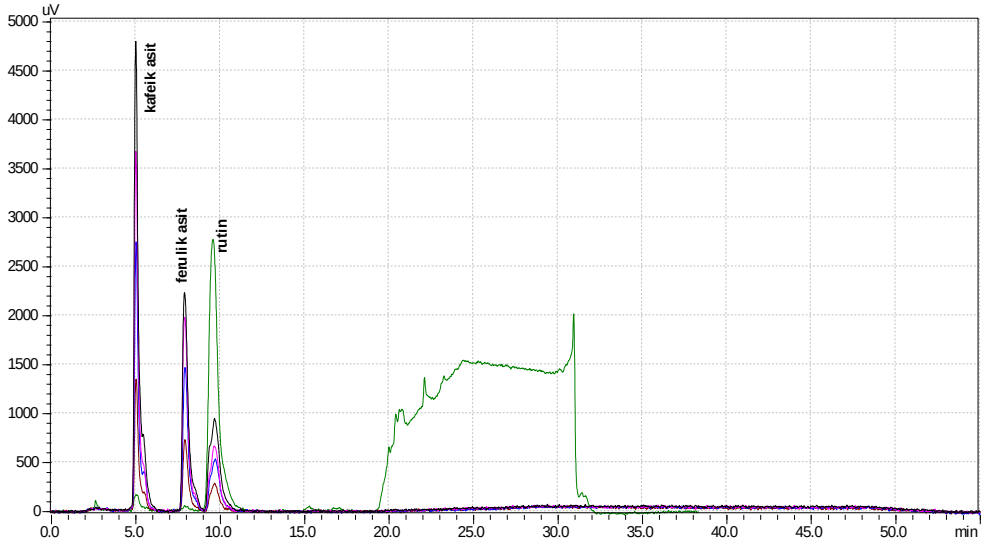
Fenolik bileşikler, 250x4,6 mm ebatlarında ve tanecik boyutu 5,0 µm olan bir C18 kolon kullanılarak başarılı bir şekilde ayrıldı. A (% 0,08'lik o-fosforik asit çözeltisi, suda) ve B (metanol) olmak üzere iki bileşenli bir hareketli ile gradient elüsyon uygulandı ve gradient program Tablo 4-1'de verildi.

Geliştirilen yöntemle, fenolik bileşiklerin tayininde en uygun dalga boyu tüm analitler için 325 nm olarak saptandı. Kolon sıcaklığı 40ºC olarak ayarlanırken, enjeksiyon hacmi 20,0 µL ve akış hızı 1,0 mL/dak olarak belirlendi.

Ölçü eğrilerinin konsantrasyon aralıklarındaki standart çözeltilerin (kafeik asit ve ferulik asit: 0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 µg/mL, rutin: 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 2,50 µg/mL) geliştirilen HPLC yöntemi ile elde edilen kromatogramları Şekil 4-1'de verildi.

Tablo 4- 1: Mobil faz gradient programı

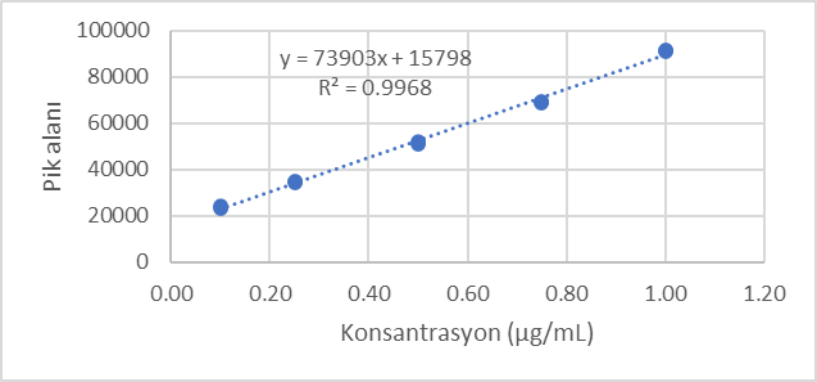
Zaman (dak)	%B
0	40
15	40
16	100
26	100
27	40
37	40



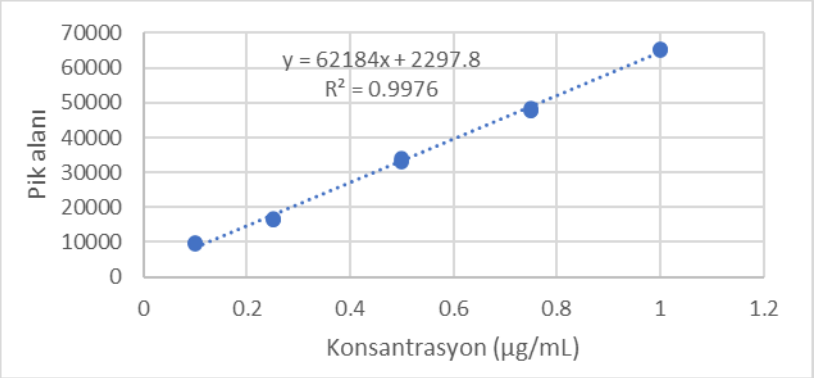
Şekil 4- 1: Ölçü eğrilerinin hazırlanmasında kullanılan standart çözeltilerin HPLC kromatogramları

4.1.2. Ölçü Eğrileri

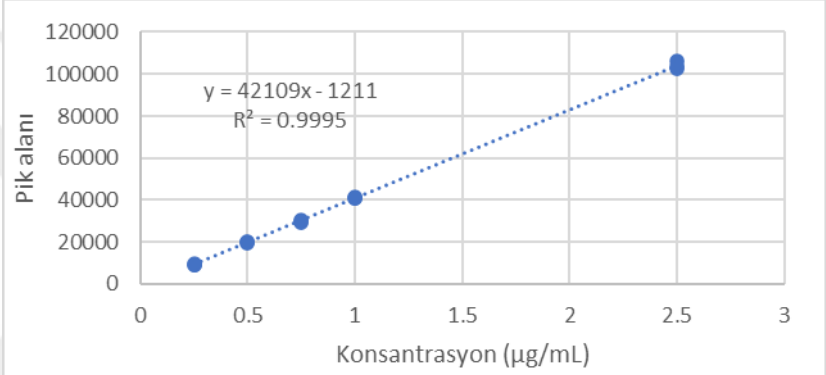
Ölçü eğrilerinin oluşturulmasında, bölüm 3.5.2'de belirtildiği gibi, kafeik ve ferulik asitler için 0,10-1,00 µg/mL arasında, rutin için ise 0,25-2,50 µg/mL aralıklarında çalışıldı ve Şekil 4-2, 4-3, 4-4'te verilen ölçü eğrileri elde edildi. Ölçü eğrilerine ait veriler Tablo 4-2, 4-3 ve 4-4'te sunuldu. Tablo 4-5'te, fenolik bileşiklerin ortalama pik alanları kullanılarak gerçekleştirilen regresyon analizi sonuçları yer verildi.



Şekil 4- 2 : Kafeik asite ait ölçü eğrisi



Şekil 4- 3: Ferulik asite ait ölçü eğrisi



Şekil 4- 4: Rutine ait ölçü eğrisi

Tablo 4- 2: Kafeik asitin ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)

	Konsantrasyon (µg/mL)				
	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00
A-1	24009	34737	51849	69585	91078
A-2	24525	34568	51251	69589	91662
A-3	23349	34991	51488	69055	91678
Ortalama pik alanı	23961	34765	51529	69410	91473
RSD (%)	2,46	0,61	0,58	0,44	0,37

Tablo 4- 3: Ferulik asitin ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)

	Konsantrasyon (µg/mL)				
	0,10	0,25	0,50	0,75	1,00
A-1	9801	16543	32889	47714	65280
A-2	9794	16947	34230	47779	65093
A-3	9499	16398	33556	48466	65510
Ortalama pik alanı	9698	16629	33558	47986	65294
RSD (%)	1,78	1,71	2,00	0,87	0,32

Tablo 4- 4: Rutinin ölçü eğrisine ait pik alanları (A), ortalama pik alanları ve yüzde bağıl standart sapma değerleri (% RSD)

	Konsantrasyon (µg/mL)				
	0,25	0,50	0,75	1,00	2,50
A-1	9454	20209	30386	40672	102402
A-2	9280	20278	29267	40843	105950
A-3	9305	19664	30174	41718	103872
Ortalama pik alanı	9346	20050	29942	41078	104075
RSD (%)	1,01	1,68	1,99	1,37	1,71

Tablo 4- 5: Regresyon analizi sonuçları

Fenolik bileşik	**Ölçü eğrisinin eğimi**	**Eğimin standart sapması**	**Eğrinin y ekseninin kestiği nokta**	**Eğrinin y ekseninin kestiği noktanın standart sapması**	**Determinasyon katsayısı (R^2)**
Kafeik asit	73902,921	1153,897	15798,081	708,497	0,9968
Ferulik asit	62183,659	847,772	2297,764	520,535	0,9976
Rutin	42109,280	267,409	1211,013	340,881	0,9995

4.1.3. Fenolik Bileşiklerin Ekstre Çözeltisinden SPE ile Ekstraksiyonu

Fenolik bileşiklerinin 1000 µg/mL'lik ekstre çözeltisinden SPE ile ekstraksiyonu için katı faz olarak HLB kartuşu kullanıldı. Her bir fenolik bileşikten 5,00 µg/mL içeren standart çözelti ile yapılan analizler sonucunda Tablo 4-6'de verilen sonuçlar elde edildi.

Tablo 4- 6: SPE prosedürünün geri kazanım (%) sonuçları

Fenolik bileşik	Konsantrasyon (µg/mL)	Geri kazanım (%)
Kafeik asit	5,00	80,13
Ferulik asit	5,00	83,95
Rutin	5,00	82,01

4.2. *U. rigida'*da Bulunan Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini için Geliştirilen HPLC Yönteminin Validasyon Sonuçları

4.2.1. Doğrusallık

Geliştirilen yöntemin, kafeik ve ferulik asit için 0,1-1,00 µg/mL, rutin için ise 0,25-2,50 µg/mL arasında doğrusal olduğu tespit edildi. Sonuçlar Bölüm 4.1.2.'de verildi. Regresyon analizi sonuçları Tablo 4-5'de verildi.

4.2.2. Uygunluk parametreleri

Uygunluk parametreleri sonuçları Tablo 4-7'da verildi.

Tablo 4- 7: Uygunluk parametreleri

Fenolik bileşik	t_R (dak)*	T#	R_s¥	k§	N•	HETP¤
Kafeik asit	4,996	1,42	-	-	2523	59,5
Ferulik asit	7,886	1,06	5,978	0,578	3073	48,8
Rutin	9,712	1,23	2,213	0,944	1291	116,2

*Alıkonma zamanı
#Kuyruklanma faktörü
#Ayırma gücü
§Alıkonma faktörü
•Teorik plaka sayısı
¤Teorik plaka eşdeğer yüksekliği

4.2.3. Doğruluk

Standart çözeltilerle gerçekleştirilen (kafeik asit ve ferulik asit için 0,10, 0,50 ve 1,00 µg/mL, rutin için 0,25, 0,75 ve 2,50 µg/mL) doğruluk çalışmasının sonuçları, Tablo 4-8'de sunuldu. Her bir deneme, üç tekrarlı olarak gerçekleştirildive elde edilen sonuçlar ortalamalarıyla birlikte verildi.

Standart çözelti karışımı katılmış *U. rigida* örneği ile yapılan geri kazanım çalışmasının sonucunda yüzde geri kazanım değerleri kafeik asit, ferulik asit ve rutin için sırasıyla %91,7, %89,3 ve %84,4 olarak hesaplandı.

4.2.4. Kesinlik

Yöntemin kesinliği, Bölüm 3.6.4'te detaylı bir şekilde açıklandığı şekilde tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara tekrarlanabilirlik (günler arası) olarak belirlendi. Analizler üç tekrarla yapıldı ve elde edilen veriler kullanılarak RSD (%) değerleri hesaplandı (Tablo 4-8).

Tablo 4- 8: Doğruluk ve kesinlik çalışmalarının sonuçları

Fenolik bileşik	Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan konsantrasyon (µg/mL) ± SD	RME (%)	RSD (%) (gün içi)	RSD (%) (günler arası)
Kafeik asit	0,10	0,11±0,01	9,47	2,46	0,92
	0,50	0,48±0,00	-3,41	0,58	1,73
	1,00	1,02±0,00	2,34	0,37	1,01
Ferulik asit	0,10	0,12±0,00	15,97	1,78	0,50
	0,50	0,50±0,01	0,54	2,00	2,64
	1,00	1,01±0,00	1,29	0,32	3,03
Rutin	0,25	0,25±0,00	0,28	1,01	1,40
	0,75	0,74±0,01	-1,38	1,99	0,99
	2,50	2,50±0,04	0,01	1,71	0,34

4.2.5. Gözlenebilme Sınırı

LOD değerleri Eşitlik-1 (Bölüm 2.6.6.) ile Tablo 4-5'te verilen regresyon analizi sonuçları kullanılarak hesaplandı (Tablo 4-9).

4.2.6. Tayin Sınırı

LOQ değerleri Eşitlik-2 (Bölüm 2.6.7) ile Tablo 4-5'te verilen regresyon analizi sonuçları kullanılarak hesaplandı (Tablo 4-9).

Tablo 4- 9: LOD ve LOQ değerleri

Fenolik bileşik	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Kafeik asit	0,03	0,10
Ferulik asit	0,03	0,08
Rutin	0,03	0,08

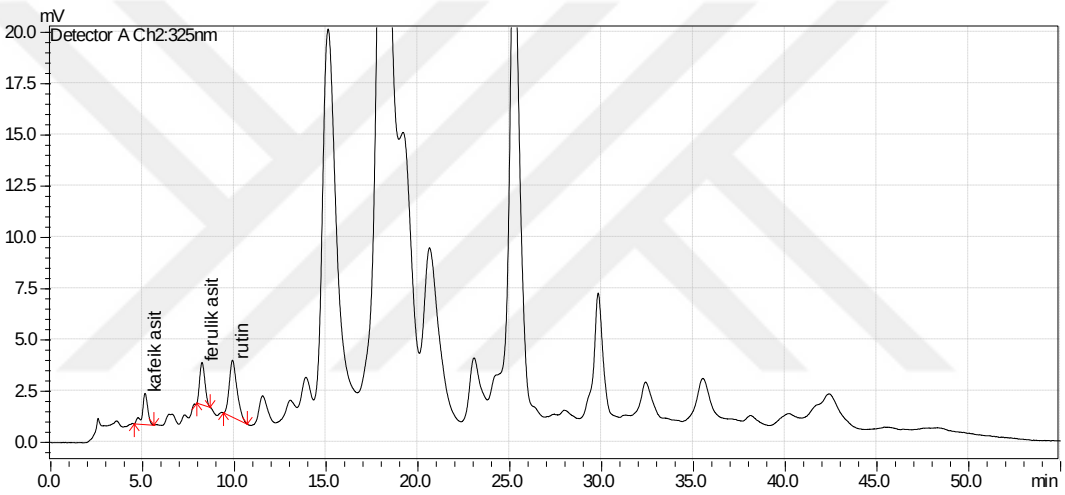
4.3. Geliştirilen ve Valide Edilen HPLC Yöntemi ile *U. rigida* Örneğinde Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayini Sonuçları

Geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi ile hazırlanan *U. rigida* ekstresinde kafeik asit, ferulik asit ve rutin olmak üzere 3 adet fenolik bileşiğin miktar tayin yapıldı. Metanol ekstresinin hazırlanması ve HLB kartuş kullanılan SPE prosedürü Bölüm

3.5.3.'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Örneğe ait HPLC kromatogramı Şekil 4-5'te, fenolik bileşik miktar tayini sonuçları Tablo 4-10'da verildi.

Tablo 4- 10: *U. rigida* örneğinde bulunan fenolik bileşiklerin miktar tayini sonuçları

Fenolik bileşik	Örnekteki miktar (µg/g)	RSD (%)
Kafeik asit	21,09±0,77	3,66
Ferulik asit	63,45±1,49	2,34
Rutin	198,61±2,65	1,34



Şekil 4- 5: *U. rigida* örneğine ait kromatogram

5. TARTIŞMA

Günümüzde, antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik, antikoagülan, antitümör vb. etkilere sahip makroalgler gıda olarak hayvanlar ve insanlar tarafından tüketilmekte ve kolayca metabolize edilmektedirler. Makroalglerin kullanım alanları beslenme ile ilgili sınırlı kalmayıp özellikle kozmetik ve farmasötik uygulamaları başta olmak üzere çeşitli endüstriyel alanları da kapsamaktadır. Makroalgler vitaminler (özellikle B3, B9, B12, C ve E) ve antioksidanlar gibi mikro besinlerce zengindir. Karotenoidler, terpenoidler, ksantofiller, klorofiller, fikobilinler, çoklu doymamış yağ asitleri, polisakkaritler, vitaminler, steroller, tokoferoller ve fikosiyaninler gibi biyolojik olarak aktif birçok fitokimyasalı sentezlemektedirler.

Bir makroalg olan *Ulva* cinsine ait türler antimikrobiyal, antikolinesteraz, antienflamatuvar, antidiyabetik, antioksidan gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren, gıda, gübre ve ilaç endüstrileri için oldukça önemli steroidler, fenolikler, terpenoidler, karotenoidler ve yağ asitleri bileşiklerce zengin olmaları sebebiyle detaylı bir şekilde incelenmektedirler.

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, *U. rigida* türünde bulunan ferulik asit, kafeik asit ve rutin olmak üzere 3 adet fenolik bileşiğin aynı anda miktar tayini için yeni bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve başarılı bir şekilde valide edilmiştir.

Yöntemin geliştirilmesi aşamasında, fenolik bileşiklerin ayrılması için literatür çalışmaları göz önüne alınarak stasyoner faz olarak C18 tercih edildi. Ebatları 250x4,6 mm, tanecik boyutu 5,0 µm olan bir analitik kolon kullanılarak farklı oranlarda su, metanol, asetonitril, asetik asit ve o-fosforik asit karışımları ile çeşitli gradient programlama sistemleri test edildi. Hareketli faz olarak iki bileşenli (sulu %0,08'lik o-fosforik asit çözeltisi ve metanol) bir sistem seçildi ve gradient elüsyon uygulandı. Akış hızı 1,0 mL/dak, kolon sıcaklığı 40ºC ve enjeksiyon hacmi 20,0 µL olarak belirlendi. Sinyal şiddeti ve anahat (baseline) kayması dikkate alınarak ferulik asit, kafeik asit ve rutin spektrofotometrik dedektör ile 325 nm dalga boyunda izlendi. Tayin edilen fenolik bileşiklere ait piklerin kuyruklanma faktörleri (T), ayırma güçleri (Rs), alıkonma faktörleri, teorik plaka sayıları ve teorik plaka eşdeğerlik yükseklikleri belirlendi. T değerlerinin 1,5'ten küçük, Rs değerlerinin 2'den büyük olduğu gözlendi.

Örnek hazırlamada metanol ile maserasyon tekniği kullanılarak metanol ekstresi elde edildi. Daha sonrasında analitleri deriştirmek amacı ile HLB kartuşu yardımıyla SPE

uygulandı. Yüksek geri kazanım değerleri (>%80) elde edildi.

Geliştirilen HPLC yöntemi doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı parametreleri incelenerek valide edildi.

Ölçü eğrileri oluşturulurken her bir konsantrasyon 3 tekrarla analiz edildi. Ölçü eğrileri ferulik ve kafeik asit için 0,10-1,00 µg/mL, rutin için ise 0,25-2,50 µg/mL arasında çizildi ve yöntemin bu aralıklarda doğrusal olduğu regresyon analizleri ile kanıtlandı.

Doğruluk ve kesinlik çalışmaları ferulik ve kafeik asit için 0,10, 0,50 ve 1,00 µg/mL, rutin için ise 0,25, 0,75, 2,50 µg/mL konsantrasyon seviyelerinde incelendi. Yüzde RME değerlerinin %-3,41-%15,97, gün içi ve günler arası kesinlik için %RSD değerlerinin sırasıyla %0,32-%2,46 ve %0,34-%3,03 aralıklarında olduğı tespit edildi.

LOD ve LOQ değerleri ölçü eğrilerinin eğimleri ve y-eksenini kestikleri noktaların standart sapmaları kullanılarak sırasıyla 0,03 µg/mL ve 0,08-0,10 mg/L aralığında bulundu.

Sonuç olarak *U. rigida* makroalg türünde fenolik bileşiklerin miktar tayini için bir HPLC yöntemi geliştirildi ve valide edildi. Bu yöntemle *U. rigida*'da bulunan kafeik asit, ferulik asit ve rutin olmak üzere 3 fenolik bileşik yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile başarılı bir şekilde tayin edildi.

KAYNAKLAR

Abd El-Baky, H. H., El-Baz, F. K., El-Baroty, G. S. 2009. "Natural preservative ingredient from marine alga Ulva lactuca L.", *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1688-95.

Abou-ElWafa, G. S., Shaaban, M., Shaaban, K. A., El-Naggar, M. E., & Laatsch, H. (2009). Three new unsaturated fatty acids from the marine green alga Ulva fasciata Delile. *Zeitschrift für Naturforschung B*, *64*(10), 1199-1207.Ak, I., Turker, G., 2018. "Antioxidant activity of five seaweed extracts", New Knowledge Journal of Science, 7, 149-55.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, *4*, 200-214.

Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function*, *12*(1), 14-29.

Anis, M., Yasmeen, A., Baig, S. G., Ahmed, S., Rasheed, M., & Hasan, M. M. (2018). Phycochemical and pharmacological studies on Ulva fasciata Delile. *Pak. J. Pharm. Sci*, *31*(3), 875-883.

Antony, F. M., Pal, D., & Wasewar, K. (2021). Separation of bio-products by liquid–liquid extraction. *Physical Sciences Reviews*, *6*(4).

Awad, N. E. (2000). Biologically active steroid from the green alga Ulva lactuca. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *14*(8), 641-643.

Balboa, E. M., Moure, A., & Domínguez, H. (2015). Valorization of Sargassum muticum biomass according to the biorefinery concept. *Marine Drugs*, *13*(6), 3745-3760.

Barker S.A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, ***70***, 151-162.

Bedoux, G., Hardouin, K., Burlot, A. S., & Bourgougnon, N. (2014). Bioactive components from seaweeds: Cosmetic applications and future development. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 71, pp. 345-378). Academic Press.

Berik, N., & Cankiriligil, E. C. (2019). The elemental composition of green seaweed (Ulva rigida) collected from Çanakkale, Turkey. *Aquatic Sciences and Engineering*, *34*(3), 74-79.

Berneira, L. M., de Santi, I. I., da Silva, C. C., Venzke, D., Colepicolo, P., Vaucher, R. D. A., ... & de Pereira, C. M. (2021). Bioactivity and composition of lipophilic metabolites extracted from Antarctic macroalgae. *Brazilian Journal of Microbiology*, *52*, 1275-1285.

Bhardwaj, S. K., Dwivedia, K., & Agarwala, D. D. (2015). A review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *5*(4), 76-81.

Birman, H. (2012). Bioactivities of plant flavonoids and the possible action mechanisms. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine-Istanbul Tıp Fakultesi Dergisi*, *75*(3).

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, *161*(5), 839-851.

Burtın, P. (2003). Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, *2*(4), 498-503.

Büyüktuncel E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, ***32***, 209-242.

Castejón, N., Thorarinsdottir, K. A., Einarsdóttir, R., Kristbergsson, K., & Marteinsdóttir, G. (2021). Exploring the potential of icelandic seaweeds extracts produced by aqueous pulsed electric fields-assisted extraction for cosmetic applications. *Marine Drugs*, *19*(12), 662.

Castro-Vargas H.I., Rodríguez-Varela L.I., Ferreira S.R.S. ve Parada-Alfonso F. (2010). Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, ***51***, 319-324.

Celikler, S., Tas, S., Vatan, O., Ziyanok-Ayvalik, S., Yildiz, G., & Bilaloglu, R. (2009). Anti-hyperglycemic and antigenotoxic potential of Ulva rigida ethanolic extract in the experimental diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(8), 1837-1840.

Celikler, S., Tas, S., Ziyanok-Ayvalik, S., Vatan, O., Yildiz, G., & Ozel, M. (2014). Protective and antigenotoxic effect of Ulva rigida C. Agardh in experimental hypothyroid. *Acta Biologica Hungarica*, *65*, 13-26.

Cirik, Ş., & Cirik, S. (1999). Aquatic Plants (The biology, ecology and aquaculture tecniques of seaweeds). *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, *58*, 188.

Çelenk, F. G., Özkaya, A. B., Aydin, H. H., Ak Çelik, H., Sukatar, A., 2012. “Antioxidant

activities of 13 marine macroalgae collected from the coast of Urla and effects of *Padina pavonica* on cell growth of MCF-7 breast cancer cell line", *First National Workshop on Marine Biotechnology and Genomics*, 24-25 Mayıs 2012, Bodrum-Muğla, Türkiye, 113-26.

Chakraborty, K., Lipton, A. P., Raj, R. P., & Vijayan, K. K. (2010). Antibacterial labdane diterpenoids of Ulva fasciata Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. *Food chemistry*, *119*(4), 1399-1408.

Chakraborty, K., Lipton, A. P., Paulraj, R., Chakraborty, R. D. 2010b. "Guaiane sesquiterpenes from seaweed Ulva fasciata Delile and their antibacterial properties", *European Journal of Medicinal Chemistr*y 45, 2237-44.

Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., & Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, *1218*(37), 6213-6225.

Chen, L. Y., Cheng, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food chemistry*, *170*, 10-15.

Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry reviews*, *11*(2-3), 153-177.

Choi, J. S., Ha, Y. M., Joo, C. U., Cho, K. K., Kim, S. J., Choi, I. S. 2012. "Inhibition of oral pathogens and collagenase activity by seaweed extracts", *Journal of Environmental Biology*, 33, 115-21.

Cirik, Ş., & Cirik, S. (1999). Aquatic Plants (The biology, ecology and aquaculture tecniques of seaweeds). *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları*, *58*, 188.

Cong-Cong, X. U., Bing, W. A. N. G., Yi-Qiong, P. U., Jian-Sheng, T. A. O., & ZHANG, T. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese journal of natural medicines*, 15(10), 721-731.

De Almeida, C. L. F., Falcão, H. D. S., Lima, G. R. D. M., Montenegro, C. D. A., Lira, N. S., de Athayde-Filho, P. F., ... & Batista, L. M. (2011). Bioactivities from marine algae of the genus Gracilaria. *International journal of molecular sciences*, *12*(7), 4550-4573.

Deyab, M., & Mofeed, J. (2019). Evaluation of Biochemical composition and bioactivities of two Ulva species (Ulva lactuca and Ulva fasciata); a comparative study. *Biosci. Res*, *16*, 3801-3811.

Dhargalkar, V. K., & Pereira, N. (2005). Seaweed: promising plant of the millennium. *Science and culture*, *71*(3-4), 60-66.

Eismann, A. I., Reis, R. P., da Silva, A. F., & Cavalcanti, D. N. (2020). Ulva spp. carotenoids: Responses to environmental conditions. *Algal research*, *48*, 101916.

Farasat, M., Khavari-Nejad, R. A., Nabavi, S. M. B., & Namjooyan, F. (2013). Antioxidant properties of two edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*, *8*(1), 47-52.

Farasat, M., Khavari-Nejad, R. A., Nabavi, S. M. B., & Namjooyan, F. (2014). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, *13*(1), 163.

Fedotov, P. S., Malofeeva, G. I., Savonina, E. Y., & Spivakov, B. Y. (2019). Solid-phase extraction of organic substances: unconventional methods and approaches. *Journal of Analytical Chemistry*, *74*, 205-212.

FDA (2023, Kasım). *Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. Food and Drug Administration. Erişim 23.03.2015, http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf .

Fernandes, H., Martins, N., Vieira, L., Salgado, J. M., Castro, C., Oliva-Teles, A., ... & Peres, H. (2022). Pre-treatment of Ulva rigida improves its nutritional value for European seabass (Dicentrarchus labrax) juveniles. *Algal Research*, *66*, 102803.

Figueroa, F. L., Barufi, J. B., Malta, E. J., Conde-Álvarez, R., Nitschke, U., Arenas, F., ... & Stengel, D. B. (2014). Short-term effects of increasing CO2, nitrate and temperature on three Mediterranean macroalgae: biochemical composition. *Aquatic Biology*, *22*, 177-193.

Flodin, C., & Whitfield, F. B. (1999). 4-Hydroxybenzoic acid: a likely precursor of 2, 4, 6-tribromophenol in Ulva lactuca. *Phytochemistry*, *51*(2), 249-255.

Ganesan, P., Kumar, C. S., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource technology*, *99*(8), 2717-2723.

Gallego, R., Bueno, M., & Herrero, M. (2019). Sub-and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae–An update. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *116*, 198-213.

Gao, K., McKinley, K. R. 1994. “Use of macroalgae for marine biomass production and CO_2 remediation: A review”, *Journal of Phycology*, 6, 45-60.

Guiry, M. D. 2012. “How many species of algae are there?”, *Journal of Phycology*, 48, 1057-63.

Gümüş, B., & Ünlüsayın, M. (2016). Tüketilebilir iki makroalg ekstraktının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. *Su Ürünleri Dergisi*, *33*(4), 389-395.

Hamed, I., Özogul, F., Özogul, Y., & Regenstein, J. M. (2015). Marine bioactive compounds and their health benefits: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *14*(4), 446-465.

Herrero M., Plaza M., Cifuentes A. ve Ibáñez E. (2012). Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, ***4***, 159-180.

Hoek V. D., Mann D. G., Jahns H. M., *Algae an Introduction to Phycology*. Cambridge University Press 1995; 623p.

Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*, *23*, 543-597.

Hughes, A. D., Kelly, M. S., Black, K. D., & Stanley, M. S. (2012). Biogas from Macroalgae: is it time to revisit the idea?. *Biotechnology for biofuels*, *5*(1), 1-7.

ICH (2023, Kasım). *Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Erişim 23.03.2015, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf .

Imada, C. T., Staples, G. W., & Herbst, D. R. (2000). New Hawaiian plant records for 1999. *Bishop Museum Occasional Papers*, *63*(1), 9-16.

İrkin, L. C., Erduğan, H. 2014. “Chemical composition of *Ulva rigida* C. Agardh from the Çanakkale Strait (Dardanelles), Turkey”, *Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment*, 20, 114-21.

Ismail, A., Ktari, L., Ben Redjem Romdhane, Y., Aoun, B., Sadok, S., Boudabous, A., & El Bour, M. (2018). Antimicrobial fatty acids from green alga Ulva rigida (Chlorophyta). *BioMed Research International*, *2018*.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food chemistry, 126(4), 1821-1835.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2013). Analytical methods of phenolic compounds. *Natural Products, Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, 2061-2092.

Jurgilevich, A., Birge, T., Kentala-Lehtonen, J., Korhonen-Kurki, K., Pietikäinen, J., Saikku, L., & Schösler, H. (2016). Transition towards circular economy in the food system. *Sustainability*, *8*(1), 69.

Kagan, I. A., & Flythe, M. D. (2014). Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (85), e51411.

Kapetanovic, R., Sladic, D., Popo, S., Zlatovic, M., Kljajic, Z., Gasic, M. J. 2005. "Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*", *Journal of the Serbian Chemical Society*, 70, 1395-400.

Kaur, A., & Gupta, M. (2018). Development and validation of method by hplc techniques. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, *5*(7), 7057-7065.

Khan, M. N., Choi, J. S., Lee, M. C., Kim, E., Nam, T. J., Fujii, H., & Hong, Y. K. (2008). Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. *J. Environ. Biol*, *29*(4), 465-469.

Khanavi, M., Gheidarloo, R., Sadati, N., Ardekani, M. R. S., Nabavi, S. M. B., Tavajohi, S., & Ostad, S. N. (2012). Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of marine algae against breast and colon carcinoma cell line. *Pharmacognosy Magazine*, *8*(29), 60.

Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328-2375.

Kumar, Y., Singhal, S., Tarafdar, A., Pharande, A., Ganesan, M., & Badgujar, P. C. (2020). Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Algal Research*, *52*, 102114.

Kumar, Y., Tarafdar, A., & Badgujar, P. C. (2021). Seaweed as a source of natural antioxidants: Therapeutic activity and food applications. *Journal of Food Quality*, *2021*, 1-17.

Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: introduction 50. *Nat. Prod*, 1543-1580.

Li, G. L., Guo, W. J., Wang, G. B., Wang, R. R., Hou, Y. X., Liu, K., ... & Wang, W. (2017). Sterols from the green alga Ulva australis. *Marine Drugs*, *15*(10), 299.

Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., ... & Simal-Gandara, J. (2020). Metabolites from macroalgae and its

applications in the cosmetic industry: A circular economy approach. *Resources*, *9*(9), 101.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, *79*(5), 727-747.

Mantri, V. A., Kazi, M. A., Balar, N. B., Gupta, V., Gajaria, T. 2020. "Concise review of green algal genus Ulva Linnaeus", *Journal of Applied Phycology*, 32, 2725–41.

MacArtain, P., Gill, C. I., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I. R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition reviews*, *65*(12), 535-543.

Martins, M., Oliveira, R., Coutinho, J. A., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P., Pinto, D. C., & Ventura, S. P. (2021). Recovery of pigments from Ulva rigida. *Separation and Purification Technology*, *255*, 117723.

McCauley, J. I., Meyer, B. J., Winberg, P. C., Ranson, M., & Skropeta, D. (2015). Selecting Australian marine macroalgae based on the fatty acid composition and anti-inflammatory activity. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 2111-2121.

Mencin, M., Mikulic-Petkovsek, M., Veberič, R., & Terpinc, P. (2021). Development and optimisation of solid-phase extraction of extractable and bound phenolic acids in spelt (Triticum spelta L.) seeds. *Antioxidants*, *10*(7), 1085.

Mendes, M., Pereira, R., Pinto, I. S., Carvalho, A. P., & Gomes, A. M. (2013). Antimicrobial activity and lipid profile of seaweed extracts from the North Portuguese Coast. *International Food Research Journal*, *20*(6), 3337-3345.

Mezghani, S., Bourguiba, I., Hfaiedh, I., & Amri, M. (2013). Antioxidant potential of Ulva rigida extracts: protection of HeLa cells against H2O2 cytotoxicity. *The Biological Bulletin*, *225*(1), 1-7.

Mezghani, S., Csupor, D., Bourguiba, I., Hohmann, J., Amri, M., Bouaziz, M., 2016. "Characterization of phenolic compounds of *Ulva rigida* (Chlorophycae) and its antioxidant activity", *European Journal of Medicinal Plants*, 12, 1-9. t

Monteiro, M., Santos, R. A., Iglesias, P., Couto, A., Serra, C. R., Gouvinhas, I., ... & Díaz-Rosales, P. (2020). Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro-and microalgae extracts. *Journal of Applied Phycology*, *32*, 349-362.

Motallebi, A. (2020). Isolation and identification of antibacterial steroid compounds from Ulva fasciata in the Persian Gulf. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, *19*(5), 2384-2393.

Moulazadeh, A., Ranjbar, R., Hekmat, M., Sedaghat, F., Yousefzadi, M., & Najafipour, S.

(2021). Comparison the cytotoxic effects of Ulva fasciata and Ulva lactuca on the MCF-7 and MDA-MB-231breast cancer cell lines. *Physiology and Pharmacology*, *25*(4), 373-383.

Neto, R. T., Marçal, C., Queirós, A. S., Abreu, H., Silva, A. M., & Cardoso, S. M. (2018). Screening of Ulva rigida, Gracilaria sp., Fucus vesiculosus and Saccharina latissima as Functional Ingredients. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10), 2987.

Ova Kaykaç, G., Cirik, Ş., Tekinay, A. A. 2008. "Yeşil deniz alglerinden Ulva rigida (C. Agardh)'nın besin kompozisyonu ve aminoasit içeriklerinin mevsimsel değişimi", E.Ü. Su Ürünleri Dergisi (*E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*), 25, 9-12.

Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O., & Okoh, A. I. (2019). Phenolic composition, antioxidant activity, anticholinesterase potential and modulatory effects of aqueous extracts of some seaweeds on β-amyloid aggregation and disaggregation. *Pharmaceutical biology*, *57*(1), 460-469.

Pappou, S., Dardavila, M. M., Savvidou, M. G., Louli, V., Magoulas, K., & Voutsas, E. (2022). Extraction of bioactive compounds from Ulva lactuca. *Applied Sciences*, *12*(4), 2117.

Peksezer, B., Bakan, M., Börekçi, N. S., Alp, M. T., Ayas, D. 2021. "Mersin sahilinde dağılımı bulunan *Ulva rigida* (C. Agardh 1823)'nın yağ asidi profilinde bölge farklılıklarına bağlı değişimler", *Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research*, 4, 35-42.

Pereira L (2016) Edible seaweeds of the world. CRC Press, Boca Raton, p 463.

Pérez-Magariño S., Ortega-Heras M. ve Cano-Mozo E. (2008). Optimization of a solidphase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***56***, 11560-11570.

Pepper, I. L., & Gentry, T. J. (2015). Microorganisms found in the environment. In *Environmental microbiology* (pp. 9-36). Academic Press.

Picó, Y., Fernández, M., Ruiz, M. J., & Font, G. (2007). Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of biochemical and biophysical methods*, *70*(2), 117-131.

Pico, J., Pismag, R. Y., Laudouze, M., & Martinez, M. M. (2020). Systematic evaluation of the Folin–Ciocalteu and Fast Blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant seeds. *Food & function*, *11*(11), 9868-9880.

Popov, S. S., Marekov, N. L., Konaklieva, M. I., Panayotova, M. I., & Dimitrova-Konaklieva, S. (1985). Sterols from some black sea Ulvaceae. *Phytochemistry*, *24*(9), 1987-1990.

Robbins R. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, ***51***, 2866-2887.

Sánchez-García, F., Mirzayeva, A., Roldán, A., Castro, R., Palacios, V., García-Barroso, C., & Durán-Guerrero, E. (2019). Evolution of volatile compounds and sensory characteristics of edible green seaweed (Ulva rigida) during storage at different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(12), 5475-5482.

Sebök, S., Herppich, W. B., & Hanelt, D. (2017). Development of an innovative ring-shaped cultivation system for a land-based cultivation of marine macroalgae. *Aquacultural Engineering*, *77*, 33-41.

Sharma, S., Goyal, S., & Chauhan, K. (2018). A review on analytical method development and validation. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, *10*(6), 8-15.

Saldarriaga-Hernandez, S., Hernandez-Vargas, G., Iqbal, H. M., Barcelo, D., & Parra-Saldívar, R. (2020). Bioremediation potential of Sargassum sp. biomass to tackle pollution in coastal ecosystems: Circular economy approach. *Science of the Total Environment*, *715*, 136978.

Silva, M., Vieira, L., Almeida, A. P., & Kijjoa, A. (2013). The Marine Macroalgae of the Genus Ulva: Chemistry, Biological Activitiesand Potential Applications.

Silva, M., Vieira, L. M. M., Almeida, A. P., Silva, A. M. S., Seca, A. M. L., Barreto, M. C., Neto, A. I., Pedro, M., Pinto, E., Kijjoa, A. 2013b. "Chemical study and biological activity evaluation of two Azorean macroalgae: *Ulva rigida* and *Gelidium microdon*", Oceanography 1, 1000102.

Sirbu, R., Stanciu, G., Tomescu, A., Ionescu, A. M., & Cadar, E. (2019). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity in relation to total phenolic content of green algae from Black Sea. *Rev. Chim*, *70*, 1197-1203.

Soares, A. R., Robaina, M. C., Mendes, G. S., Silva, T. S. L., Gestinari, L. M. S., Pamplona, O. S., Yoneshigue-Valentin, Y., Kaiser, C. R., Romanos, M. T. V. 2012. "Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus", *Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22, 714-23.

Sun, Y., Zhan Y. -C., Sha, Y., Pei, Y. -H. 2007. "Norisoprenoids from Ulva lactuca", *Journal of Asian Natural Products Research*, 9, 321-5.

Spalding, H. L., Amado-Filho, G. M., Bahia, R. G., Ballantine, D. L., Fredericq, S., Leichter, J.

J., Nelson, W. A., Slattery, M., Tsuda, R.T. 2019. “Macroalgae”. *Mesophotic Coral Ecosystems*. Editör: Loya, Y., Puglise, K., A., Bridge T. C. L. New York: Springer.

Stroka, J., Spangenberg, B., & Anklam, E. (2002). New approaches in TLC-densitometry. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, *25*(10-11), 1497-1513.

Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., & Sulaiman, S. Z. (2020, April). An Overview: Analysis of ultrasonic-assisted extraction’s parameters and its process. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 778, No. 1, p. 012165). IOP Publishing.

Sze, P., A Biology of the Algae. Third Edition; Georgetown University, 1998; 278p.

Singh, J., & Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and sustainable energy reviews*, *14*(9), 2596-2610.

Tas, S., Celikler, S., Ziyanok-Ayvalik, S., Sarandol, E., Dirican, M. 2011. “Ulva rigida improves carbohydrate metabolism, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Cell Biochemistry and Function*, 29, 108-13.

Taskin, E., Ozturk, M., Taskin, E., Kurt, O. 2007. “Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey)”, *African Journal of Biotechnology*, 6, 2746-51.

Trentin, R., Custódio, L., Rodrigues, M. J., Moschin, E., Sciuto, K., Da Silva, J. P., & Moro, I. (2020). Exploring Ulva australis Areschoug for possible biotechnological applications: In vitro antioxidant and enzymatic inhibitory properties, and fatty acids contents. *Algal Research*, *50*, 101980.

Trigui, M., Gasmi, L., Zouari, I., & Tounsi, S. (2013). Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of Ulva rigida (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *Journal of applied phycology*, *25*, 319-328.

Tuney, I., Cadirci, B. H., Unal, D., Sukatar, A. 2006. “Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (İzmir, Turkey)”, *Turkish Journal of Biology*, 30, 171-5.

Ünal, N., Aras, A., Habiboğlu, O., Uğur, S., Naz, M., & Sayın, S. Marine and Life Sciences.

Vuong, D., Kaplan, M., Lacey, H. J., Crombie, A., Lacey, E., & Piggott, A. M. (2018). A study of the chemical diversity of macroalgae from South Eastern Australia. *Fitoterapia*, *126*, 53-64.

Wang, R., Paul, V. J., & Luesch, H. (2013). Seaweed extracts and unsaturated fatty acid

constituents from the green alga Ulva lactuca as activators of the cytoprotective Nrf2–ARE pathway. *Free Radical Biology and Medicine, 57,* 141-153.

Wekre, M. E., Kåsin, K., Underhaug, J., Holmelid, B., & Jordheim, M. (2019). Quantification of polyphenols in seaweeds: A case study of Ulva intestinalis. *Antioxidants*, *8*(12), 612.

Williams, P. J. L. B., & Laurens, L. M. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & environmental science*, *3*(5), 554-590.

Wianowska, D., & Gil, M. (2019). New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *112*, 29-51.

Whitfield, F. B., Helidoniotis, F., Shaw, K. J., Svoronos, D. 1999. "Distribution of bromophenols in species of marine algae from Eastern Australia", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2367-73.

Xu Z. (2012). Analysis methods of phenolic acids. İçinde Xu Z. ve Howard L.R. (Ed), *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. Chichester: Wiley-Blackwell; 69-104.

Yalçın, S., Karakaş, Ö., Okudan, E., Başkan, K., Çekiç, S., Apak, R. 2020. "HPLC detection and antioxidant capacity determination of brown, red and green algal pigments in seaweed extracts", *Journal of Chromatographic Science,* 59, 325-37.

Yildiz, G., Celikler, S., Vatan, O., & Dere, S. (2012). Determination of the anti-oxidative capacity and bioactive compounds in green seaweed Ulva rigida C. Agardh. *International Journal of Food Properties*, *15*(6), 1182-1189.

Yildiz, G., Dere, E., & Dere, S. (2014). Comparison of the antioxidative components of some marine macroalgae from Turkey. *Pak. J. Bot*, *46*(2), 753-757.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI