

121526

FARKLI İŞLEMLERLE İZOLE EDİLEN
BİTKİ ÖZÜTLERİNİN ANTIOKSİDAN
ÖZELLİĞİ VE KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ

Nuket KARTAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2002

121526

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Öge ÇETİNKAYA
Üye: Yrd.Doç. Dr. Münevver SÖKMEN
Üye: Yrd. Doç.Dr. Cemalettin UYAN

Öge Çetinkaya
Münevver Sökmen
Cemalettin Uyan

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

10/09/ 2002

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Necati ÇELİK

N. Çelik

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİVAS

FARKLI İŞLEMLERLE İZOLE EDİLEN BİTKİ ÖZÜTLERİNİN
ANTIÖKSİDAN ÖZELLİĞİ VE KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ

Nuket KARTAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

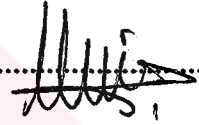
.....

Özge SÖKMEN
Danışman Adı)

.....

Kimya- Yrd.Doç.Dr.
(Bölümü- Ünvanı)

.....



(İmzası)

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05.01.1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 01/01/1994 tarihinde C. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünce hazırlanan 'Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu' adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ****FARKLI İŞLEMLERLE İZOLE EDİLEN BİTKİ ÖZÜTLERİNİN
ANTIOKSİDAN ÖZELLİĞİ VE KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİ**

Nuket KARTAL

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Münevver SÖKMEN

Bu çalışmada farklı izolasyon yöntemleriyle elde edilen *Ferula orientalis* L. ve *Satureja hortensis* L. özütlerinin serbest radikal temizleme ve antioksidan aktiviteleri araştırıldı. Apolar ve polar özütler elde etmek için altı farklı özütlenme yöntemi kullanıldı. Çözücü sistemi olarak hekzan, aseton, metanol-su kullanıldı ve ilgili bitki materyallerinin uçucu yağları clevenger tipi su buharı damıtma cihazı ile ayrıldı. Serbest radikal temizleme aktivitesini belirlemek için kararlı serbest radikal 2,2'-dipikrilhidrazil (DPPH)'m metanolik çözeltisi kullanıldı. Antioksidan aktivite β -karoten- linoleik asit test sisteminde agar difüzyon ve spektrofotometrik yöntemlere göre belirlendi.

Ferula orientalis L. ve *Satureja hortensis* L'nin polar çözücüler kullanılarak hazırlanan özütlerinin güçlü serbest radikal temizleme aktivitesi gösterdiği bulundu. Linoleik asit sisteminde ise çoğunlukla apolar çözücüler ile daha aktif özütler sağlandı. Aktiviteden sorumlu olabilecek bileşikler belirlemek için özütlerin ince tabaka kromatografisi analizleri yapıldı. Uçucu yağların GC/MS analizi göstermektedir ki, fenolik bileşikler apolar özütlerin ana bileşenlerini oluşturmakta ve aktivite, bu bileşenlerden kaynaklanmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Antioksidan Aktivite, Serbest radikaller, Özütlenme Yöntemleri, *Ferula orientalis* L., *Satureja hortensis* L.

SUMMARY

MSc Thesis

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF EXTRACTS OBTAINED BY DIFFERENT
ISOLATION PROCEDURES AND CHROMATOGRAPIC ANALYSES

Nuket KARTAL

Cumhuriyet University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Dr. Münevver SÖKMEN

Free radical scavenging activity and antioxidant activity of the extracts of *Ferula orientalis* L. and *Satureja hortensis* L. obtained by different isolation procedures have been investigated.

Six different extraction procedure was employed to obtain nonpolar and polar extracts. Hexan, acetone, methanol-water were used as solvent systems and essential oils of the corresponding plant material were isolated by a clevenger type hydrodistillation apparatus.

Methanolic solution of the stable free radical 2,2'-dipicrylhydrazyl (DPPH) were used to determine the free radical scavenging activity. The antioxidant activity was determined according to β -caroten-linoleic acid test system employing agar diffusion and spectrophotometric methods.

F. orientalis and *S. hortensis* exhibited strong free radical scavenging activity with the extracts prepared using polar solvents in DPPH assay. In the case of linoleic acid system, mainly nonpolar solvents were provided more active extracts.

Thin layer chromatographic analyses of the extracts were carried to determine the components that might be responsible from the activity. GC/MS analysis of the essential oils reveal that phenolic components were the main constituents of the nonpolar extracts and responsible from the activity.

KEY WORDS: Antioxidant Activity, Free Radicals, Extraction Methods, *F.orientalis* L., *S.hortensis* L.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| ZET..... | I |
| UMMARY..... | II |
| İNDEKİLER..... | III |
| EKİLLER DİZİNİ..... | V |
| İZELGELER DİZİNİ..... | VI |
| GİRİŞ..... | 1 |
| 1. Bitkisel Hammaddeler..... | 2 |
| 2. Özütleme Teknikleri..... | 4 |
| 3. Antioksidan Maddeler ve Özütlenmesi..... | 4 |
| 4. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri..... | 8 |
| 5. Amaç..... | 10 |
| MATERYAL VE YÖNTEM..... | 11 |
| 1. Bitkisel Materyal..... | 11 |
| 2. Bitkilerin Toplanması ve Özütlerin Hazırlanması..... | 11 |
| 3. Özütleme Teknikleri..... | 12 |
| 4. Antioksidan Aktivite Testleri..... | 12 |
| 4.1. DPPH Yöntemi..... | 13 |
| 4.2. β -Karoten Renk Açılım Testi- Agar Difüzyon Yöntemi..... | 13 |
| 4.3. β -Karoten Renk Açılım Testi- Spektrofotometrik Yöntem..... | 14 |
| 5. Kromatografik Analizler..... | 15 |
| 5.1. Özütlerin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Analizi..... | 15 |
| 5.1.1 Uçucu Yağların İTK Analizi..... | 16 |
| 5.1.2. Diğer Özütlerin İTK Analizi..... | 16 |
| 5.2. Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizleri..... | 17 |
| 5.3. İnce Tabaka Yöntemi (İTK) ile Antioksidan Bileşenlerin Belirlenmesi..... | 17 |
| 3. BULGULAR..... | 19 |
| 3.1. Özütler ve Verimleri..... | 19 |
| 3.2. DPPH Yöntemi..... | 19 |

IV

| | |
|--|----|
| 3.3. β -Karoten Renk Açılım Testi- Agar Difüzyon Yöntemi | 22 |
| 3.4. β -Karoten Renk Açılım Testi- Spektrofotometrik Yöntem..... | 26 |
| 3.5. Kromatografik Analizler..... | 28 |
| 3.5.1. Özütlere İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Analizi..... | 28 |
| 3.5.1.1. Uçucu Yağların İTK Analizi..... | 28 |
| 3.5.1.2. Diğer Özütlere İTK Analizi..... | 30 |
| 3.5.2. Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizleri..... | 30 |
| 3.5.3. İnce Tabaka Yöntemi (İTK) ile Antioksidan Bileşenlerin Belirlenmesi..... | 33 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 34 |
| 4.1. Özlüt Verimleri..... | 34 |
| 4.2. DPPH Testi..... | 34 |
| 4.3. β -Karoten Renk Açılım Testi- Agar Difüzyon Yöntemi..... | 39 |
| 4.4. β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntemi..... | 41 |
| 5. KAYNAKLAR..... | 44 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil No</u> | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 3.1. DPPH Yönteminde <i>F. orientalis</i> 'in özüt derişimine karşı % inhibisyon değerleri..... | 20 |
| Şekil 3.2. DPPH Yönteminde <i>S. hortensis</i> 'in özüt derişimine karşı % inhibisyon değerleri..... | 20 |
| Şekil 3.3. <i>F. orientalis</i> özütleri, BHT ve Askorbik asitin DPPH testinde %50 inhibisyon sağlayan derişimleri..... | 21 |
| Şekil 3.4. <i>S. hortensis</i> özütleri, BHT ve Askorbik asitin DPPH testinde %50 inhibisyon sağlayan derişimleri..... | 22 |
| Şekil 3.5. BHT ve boş kontrole ait agar tabaklarının 48 saat sonrası görünümü..... | 23 |
| Şekil 3.6. <i>F. orientalis</i> 'in UYSA ve HSAÖ'de 48 saat sonrası agar tabaklarının görünümü..... | 23 |
| Şekil 3.7. BHT ve <i>S. hortensis</i> 'in HSAÖ, HÖ ve UYSA özütünün 48 saat sonrası agar tabaklarının görünümü..... | 24 |
| Şekil 3.8. β -Karoten- linoleik asit sisteminde mikrotiter tabaklarının görünümü..... | 26 |
| Şekil 3.9. <i>F. orientalis</i> özütleri için zamana bağı olarak β -Karotene ait 490nm'deki absorbans değerindeki değışim..... | 27 |
| Şekil 3.10. <i>S. hortensis</i> özütleri için zamana bağı olarak β -Karotene ait 490nm'deki absorbans değerindeki değışim..... | 28 |
| Şekil 3.11. a- <i>F.orientalis</i> b- <i>S. hortensis</i> uçucu yağlarının ince tabaka kromatogramları..... | 29 |
| Şekil 3.12. a- <i>F.orientalis</i> b- <i>S. hortensis</i> 'e ait DPPH püskürtülmüş tabakalar..... | 33 |
| Şekil 4.1. <i>F.orientalis</i> uçucu yağında bulunan ana bileşenler..... | 37 |
| Şekil 4.2. <i>S. hortensis</i> uçucu yağında bulunan ana bileşenler..... | 38 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge No</u> | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Çizelge 3.1. <i>F. orientalis</i> L. ve <i>S. hortensis</i> L. özütleri ve verimleri..... | 19 |
| Çizelge 3.2. <i>F.orientalis</i> 'in yaprak ve çiçeklerinden elde edilen uçucu yağların DPPH serbest radikalini inhibisyonu..... | 22 |
| Çizelge 3.3. Agar yönteminde özütler ve kontrollerin β -karoten'in rengini koruma dereceleri..... | 25 |
| Çizelge 3.4. Özütlerin BHT'ye eşdeğer antioksidan (EA_{BHT}) etkinlikleri | 25 |
| Çizelge 3.5. <i>F. orientalis</i> 'in uçucu yağ içeriği | 31 |
| Çizelge 3.6. <i>S. hortensis</i> 'in uçucu yağ içeriği | 32 |

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Yrd.Doç. Dr. Münevver SÖKMEN'e ,

Tez çalışmalarım boyunca bana her türlü konuda destek olan aileme, saygı değer Kimya Bölümü elemanları'na ve sevgili arkadaşlarıma, bitkilerin toplanmasında ve adlandırılmasında emeği geçen Biyoloji Bölümü Hocaları'na teşekkür ederim.

Nuket KARTAL

1. GİRİŞ

Canlıların temel besin gereksinimlerini karşılayan bitkisel kökenli karbohidratlar, protein ve yağlar birincil kaynaklardır. Bunun yanı sıra bitkisel kaynaklardan selüloz, zank ve lastik gibi diğer yararlı maddeler de elde edilebilir. Temel ihtiyaçları karşılamamanın dışında başta ilaç sanayi olmak üzere; kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde yine bitkisel kaynaklardan yararlanılır. Bu tür kimyasallar 'sekonder (ikincil) metabolitler' olarak adlandırılır ve bitkisel ürünler bu başlık altında değerlendirilir (Sökmen ve Gürel, 2001, Philipson, 1990).

Sekonder metabolitler, özellikle bitkilerin savunma veya üreme sistemleri için üretilmiş kimyasallardır. Bu şekilde bitki tarafından üretilen kimyasallar çoğunlukla yukarıda bahsedilen alanlarda yararlı olur. Bitkisel doğal ürünler birçok ilaç hammaddesi gibi saf ürünlerden besin katkı maddeleri ve kozmetikler gibi karışımlara kadar değişkenlik göstermektedir. Bitkisel ürünlerin yapılarının karmaşık veya zengin oluşu bu metabolitlerin kimya sanayiinde hammadde olarak kullanılmasını sağlamıştır.

İlaç sanayiinde kullanılan bazı önemli bitkisel kökenli maddeler şunlardır; digoksin (kardiyonik), digitoksin (kardiyovasküler), efedrin (bronş açıcı), kinin, kinidin (sıtma tedavisi), vinkristin, vinblastin, aymalisin (kanseri tedavisi) (Fowler, 1982). Thaumatin, safran, gingeroller, geraniol ve neral gibi bileşikler tatlandırıcı, koku verici ve koruyucu olarak besin ve gıda sanayiinde kullanılan bitkisel kökenli maddelerdir. Gül yağı, lavanta yağı, yasemin yağı, parfümeride kullanılırken; nikotin, anakardik asit, piretrin, sinerin ve yasmolin zirai mücadelede kullanılan maddelerdir.

1.1. Bitkisel Hammaddeler

İlaç haline getirilebilen biyolojik, anorganik veya sentetik kökenli bütün ilkel maddeler drog olarak bilinmektedir. Bunların yanı sıra droglar özellikle yiyecek endüstrisinde koruyucu katkı maddesi veya tatlandırıcı olarak da kullanılmaktadır.

Aşağıda sıralanan etkin türler sentetik olarak üretilebildiği gibi çoğunlukla da bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. Son birkaç yıl içinde endüstrideki güçlü gelişme ve Avrupa Topluluğu'nun gereksinimlerini karşılayacak yeni teknolojilerle beraber, doğal katkı maddelerine olan talep artmıştır. Bu nedenle, yeni yerel kaynakların araştırılmasına ve bunların yiyecek endüstrisine girişini sağlayıcı yolların bulunmasına ihtiyaç vardır.

Droglarda bulunan ve gerek tedavi gerekse katkı maddesi olarak kullanılan etkili kimyasal maddeler şöyle sıralanabilir (Baytop, 1986):

1. Anorganik Maddeler. Droglardaki anorganik madde olarak genellikle sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, fosfor, silisyum ve klor bulunmaktadır. Bazı bitkilerde lityum, selenyum, bor ve iyot bileşiklerine de rastlanmaktadır.
2. Karbohidrathidratlar. Genel yapı formülleri $C_n(H_2O)_n$ olan bileşiklerdir. Klorofil taşıyan bitkilerde güneş ışığı etkisiyle CO_2 ve H_2O ' dan çok karışık bir yolla yapılmaktadır. Bitkilerde bulunan başlıca karbohidratlar; monosakkaritler (ozlar), oligosakkaritler (oligoholozitler), polisakkaritler (poliholozitler)'dir.
3. Glikozitler. Enzim veya seyreltik asit etkisiyle yapılan hidroliz sonunda şeker ve şeker olmayan bir kısma ayrılan bileşiklerdir.
4. Organik Asitler. Bitkilerin ekserisinde serbest, tuz veya ester halinde organik asit bulunur. Organik asitlerin, bitkilerde hidrokarbonların kısmi oksidasyonu sonucu meydana geldikleri düşünülmektedir.

5. Tanenler. Azotsuz, polifenolik bünyeli ve genellikle amorf bileşiklerdir. Su ve etanolde çözünür, eter ve kloroformda çözünmezler.
6. Alkaloitler. Bünyesinde azot bulunan, bazik karakterli bitkisel maddelerdir. Bir bitkide tek bir alkaloitin bulunuşu nadirdir. Genel olarak bitkide, yapıları birbirine oldukça yakın, aynı halkadan türeyen bir grup alkaloit bulunur. Alkaloitler bitkinin özel bir kısmında (kök, kabuk, meyve, yaprak vs.) toplanmıştır.
7. Enzimler. Canlılar tarafından meydana getirilen katalizörler olup, belirli kimyasal tepkimeleri hızlandırır veya ekzoterm tepkimeleri mümkün hale getirir.
8. Lipitler. Yüksek yağ asitlerinin türevleridir. Genellikle C, H, O' dan oluşmuşlardır. Nadiren P (fosfolipitler) veya N (fosfoaminolipitler) taşırlar. Organik çözücülerde çözünürler, suda ise çözünmezler.
9. Uçucu Yağlar. Bitkilerde bulunan özel kokulu ve uçucu maddelerdir. Genelde sıvı ve taze iken hemen hemen renksizdir. Suda pek az, etanol, genellikle organik çözücüler ve yağlarda kolaylıkla çözünürler. Uçucu yağlar esas itibariyle terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri (alkol, aldehit, keton vs.)'nin bir karışımından ibarettir. Bu bileşikler yanında organik asitler, alkoller, ketonlar, fenoller vs. gibi maddeler de bulunmaktadır.
10. Reçineli Maddeler. Karmaşık kimyasal yapılı, sıvı, katı ve genellikle amorf maddelerdir. Suda çözünmezler fakat etanol, eter ve kloroformda kısmen ya da tamamen çözünürler. Genellikle bitkilerde özel salgı kanallarında ve ceplerinde bulunurlar.
11. Vitaminler. Genellikle insan vücudu tarafından sentezi yapılamayan fakat normal metabolizma faaliyetlerinin devamı için gerekli olan organik maddelerdir. Vitaminler bitkisel veya hayvansal ürünlerden özütleme, sentez veya kısmi sentez yoluyla hazırlanmaktadırlar.
12. Antibiyotikler. Canlılar tarafından meydana getirilen ve çok seyreltik çözeltilerde bile bazı mikroorganizmaları öldüren ve çoğalmalarını önleyen maddelerdir.

1.2. Özütleme Teknikleri

Bitkisel materyal toplanıp kurutulduktan sonra içerdiği etken maddeyi ayırmak için özütleme ve stabilizasyon işlemine tabi tutulur (Baytop, 1986). İlgilenilen türe göre özel yöntemler bulunmakla beraber yaygın olan yöntemler şu şekilde özetlenebilir:

1. Kaynar alkol yöntemi: Materyalin %80'lik etanol veya metanolde 1 saat kaynatılmasından ibarettir. Bir kısım materyal için beş kısım alkol kullanılır. Bu şekilde hem stabilizasyon hem de özütleme yapılmaktadır.
2. Alkol buharı yöntemi: Taze ve kuru materyalin belli bir süre boyunca metanol buharı ile özütlenmesi işlemidir. Özellikle çabuk bozunan türlerin özütlenmesi/stabilizasyonu için uygulanır. Çoğunlukla sokslet ekstraktörlerinde birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir.
3. Çeşitli organik çözücülerle özütleme : Aseton, hekzan, diklorometan, su, kloroform gibi çeşitli çözücüler ve çözücü karışımları kullanılarak soğuk veya sıcak şartlarda çalkalama yoluyla çoğu kimyasal özütlenebilir.
4. Süper kritik akışkan özütlenmesi: Bu yöntemde süper kritik akışkan CO₂ çözücü olarak kullanılır. Özel çelik kaplara doldurulan bitkisel materyal içinden süper kritik CO₂ geçirilerek etken maddeler hem çok kısa sürede hem de sıcaklık olmaksızın özütlendiğinden bozunmadan ayrılabilir.

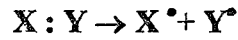
1.3. Antioksidan Maddeler ve Özütlenmesi

Antioksidanların, hücrelerin normal solunumu sırasında yan ürünü olarak oluşan reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı vücut savunma sisteminde önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır (Gutteridge ve Halliwell, 2000). Serbest radikal türleri, süperoksit anyonu (O₂^{•-}), hidroksil radikali (OH[•]), peroksit radikali (OOH[•]), azot oksit radikali (NO[•])'dir.

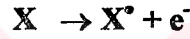
Yukarda belirtilen serbest radikallerin yanı sıra alkil peroksi radikali (ROO^\bullet), alkoksil radikali (RO^\bullet), tiyol radikalleri (RS^\bullet), karbon merkezli radikaller de mevcuttur (Candan, 2001).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelir.

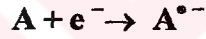
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi,



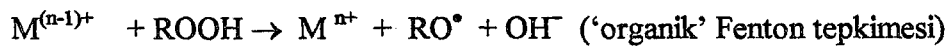
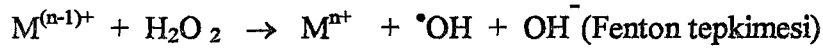
2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu, Fe, Mn ve Mo geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde, serbest radikal olarak kabul edilemezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı, serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.



Demir iyonlarının bulunduğu ortamda alkil peroksi radikallerinin oluştuğu rapor edilmiştir (Akaike ve ark., 1992). Bu radikal türünün daha uzun ömürlü olduğu ve DNA üzerinde yıkıcı etkilere sahip olduğu belirtilmektedir.

Bu türlerin pek çok değişik mekanizma yoluyla hücre ölümüne neden olduğu, çeşitli DNA türlerine hasar verdiği ve kansere neden olduğu belirtilmektedir. Serbest radikallerin proteinlere, nükleik asitlere, DNA'ya,

membran lipidlerine (lipid peroksidasyonu) ve karbohidratlara etkileri ayrıntılı şekilde araştırılmıştır (Candan, 2001).

Antioksidan ajanlar oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla gösterirler. Bunlar,

- a. Scavenging (süpürücü/temizleyici) etki gösterenler: Yeni radikal oluşumunu engellerler ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Örnek olarak, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GP_x) gibi enzimleri ve metal bağlayıcı bazı proteinleri verebiliriz.
- b. Quencher (giderici) etki gösterenler: Oksidanlarla etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek olarak, vitaminler (Vit A-beta karoten, Vit C-askorbat, Vit E-alfa tokoferol) flavonoidler, mannitol ve antosiyanidinler verilebilir.
- c. Chain breking (zincir kırıcı) etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilmektedir.
- d. Repair (tamir edici) etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri, metionin sülfoksid redüktaz sayılabilir.

Canlı mekanizmalarda oluşan serbest radikaller, çoğu zaman lipid oksidasyonuna ve buna bağlı olarak da hücre ölümlerine neden olmaktadır. Antioksidan bir madde bu oksidasyonun çeşitli aşamalarında yukarıda özetlenen mekanizmalar yoluyla koruyucu özelliklere sahip olan maddelerdir. Sentetik olarak üretilmediği gibi doğal kaynaklardan da elde edilebilirler. Bu tür maddeler, oluşan serbest radikalleri (reaktif oksijen türlerini, ROT) ya doğrudan temizleyerek ya da bu türlere elektron veya hidrojen aktarımı yaparak etkisiz hale getirir. Genel anlamda iki tür antioksidan madde tanımlanır. Birincil antioksidan maddeler, zincir kırma tepkimeleri oluşturan veya serbest radikal temizleyen

türlerdir. İkincil antioksidan maddeler veya koruyucu antioksidan maddeler ise, metallerin aktivasyonunu azaltıcı lipit hidroperoksitlerin istenmeyen uçucu türlere parçalanmasını engelleyen, tekli oksijen yakalayan ya da birincil antioksidanların yeniden üretimini sağlayan türlerdir. Mekanizmalardaki bu çok çeşitlilik pek çok maddenin araştırılmasına olanak sağlamıştır.

Ancak, son yıllarda sentetik antioksidanların kendilerinin veya buldukları ortamda oluşturdukları yan ürünlerinin kanserojen olduğu veya negatif sağlık etkilerine neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir (Namiki, 1990; Pokorny, 1991). Antioksidan özelliğe sahip maddeler doğrudan metabolizmada etkin olabildiği gibi beslenme yoluyla alınabildikleri gibi yiyecek endüstrisinde koruyucu katkı maddesi olarak da kullanılmaktadırlar. Beslenme yoluyla antioksidan maddelerin alınmasındaki artış, vücut için gerekli olan antioksidan miktarını korumaya ve böylece de canlı sistemlerin normal fizyolojik koşullarını korumada yardımcı olabilir (Ou ve ark. 2002). Bazı yiyecek ve sebzeler antioksidan maddelerin en önemli kaynaklarıdır. Bitkisel materyalden uygun yöntemlerle antioksidan bileşenler etkin bir şekilde ayrılabilir.

Bazı araştırmacılar, farklı çözücüler ve özütleme teknikleri kullanıldığında antioksidan aktivitede farklılıklar olduğunu göstermiştir. Chen ve arkadaşları (1992) biberiyeden elde edilen hekzan özütünün, metanol ve asetonla hazırlanan özüte göre daha yüksek oranda karnosik asit ve karnesol içerdiğini bulmuşlardır. Fakat buna rağmen hekzan özütünün düşük verimle elde edilmesi nedeniyle biberiyeden antioksidan bileşenlerin ayrılması için asetonun daha uygun bir çözücü olduğu belirtilmiştir. Kramer (1985), karanfilden antioksidan bileşenleri petrol eteri ve etanol kullanarak özütlemiştir. Etanol özütü, buharlaştırıcıda yoğunlaştırıldıktan sonra etil asetatla ve daha sonra dietileterle tekrar kısımlandırılmıştır. Etil asetat özütü fenolik bileşikleri içerdiğinden yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir. Chevolleau ve arkadaşları (1992) bazı Akdeniz bitkilerinin, metanol ve n-hekzan oleoresin özütlerini incelemiştir. Araştırılan bitkilerin metanol özütlerine göre, hekzan özütlerinin daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği bulunmuştur. Biberiyenin kaba ve rafine edilmiş özütlerini elde etmek için iki ardışık aşamalı işlem uygulanmaktadır. Bunlar, uçucu

bileşenlerin distilasyonu ve farklı çözücülerle aktif antioksidan bileşiklerin özütlenmesidir.

Literatür taraması, bütün aromatik bileşikler için tek bir özütleme yönteminin varlığının mümkün olmadığını göstermektedir. Bu aynı zamanda antioksidan bileşiklerin doğasındaki farklılıklar nedeniyle de beklenen bir sonuçtur. Bu nedenle, doğal bir antioksidan kaynağı olabilecek her bir bitki türü için en etkin özütleme yöntemini seçmek önemlidir.

1.4. In Vitro Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

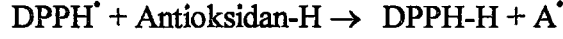
İn vitro antioksidan aktivitenin belirlenmesinde genellikle ilgili tepkimelerle serbest radikaller oluşturulur. Antioksidan özelliğe sahip bileşenlerin bu radikalleri temizleme veya inhibisyon (engelleme) kapasitesi belirlenir.

Çeşitli materyaller içinde antioksidan bileşenlerin varlığını nitel ve nicel olarak gösteren pek çok yöntem mevcuttur. Bu tür testlerin yapılmasında uygulanmak üzere yeni yöntemler de geliştirilmiştir (Halliwell *ve ark.*, 1987, 1989, 1990; Ou *ve ark.*, 2002).

Son zamanlarda toplam antioksidan aktiviteyi belirlemede önerilen yöntemler, karşılaştırmalı bir çalışmayla rapor edilmiştir (Koleva *ve ark.*, 2002; Ou *ve ark.*, 2002). Bu yöntemler arasında toplam antioksidan aktivite için, örneklerin polaritesinden tamamen bağımsız olan DPPH yöntemi (Koleva *ve ark.*, 2002; Burits *ve Bucar*, 2000; Burits *ve ark.*, 2001) ve β -karoten renk açılımı yöntemi (Koleva *ve ark.*, 2002; Dapkevicius *ve ark.*, 1998) bitki özütlerinin anlamlı şekilde değerlendirilmesinde önerilmektedir.

Kararlı organik radikal 2,2'-difenilpikrilhidrazil radikali (DPPH') tekli bileşenler, bitki özütleri ve yiyecek maddeleri antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Koleva *ve ark.*, 2002 ve referanslar içinde). Yöntem, DPPH'in alkolde hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidan madde varlığında radikal olmayan DPPH-H' a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. DPPH'nin 517

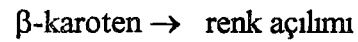
nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilebilir:



Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH[•] derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalinin rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesi olarak gösterilir. Yöntem hızlıdır, 30 dakikalık analiz süresi ve insan gücü açısından kolay çok özel cihaz ve reaktifler gerektirmediğinden dolayı da tercih edilir.

Literatürde antioksidan aktivitelerin belirlenmesinde birden fazla yöntemin uygulanması gerekliliği belirtilmektedir (Ou ve ark., 2002; Ruberto ve ark., 2000; Mantle ve ark., 1998). β -karoten renk açılımı yöntemi, önerilen diğer yöntemler arasındadır. Bu nedenle, karşılaştırma olarak bu yöntem seçilmiştir.

β -karoten renk açılımı yöntemi iki şekilde uygulanabilir: Agar difüzyon yöntemi ve spektroskopik yöntem. Her iki yöntem de linoleik asit ve oksijenle doymuş sulu ortamda linoleik asitin oksidasyonu sonucu oluşan konjuge dienler ve diğer uçucu bozunma ürünlerinin β -karotenin rengini açması temeline dayanır. Antioksidan maddenin varlığında bu tepkimenin oluşumu engellendiğinden veya oluşan bozunma ürünleri (oluşan ROT) antioksidan tür tarafından temizlendiğinden β -karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.



Linoleik asit + (O₂-H₂O) + β-karoten + antioksidan → rengin korunumu

Pek çok yöntem uygulanmakla beraber farklı polaritede örneklerle çalışıldığında çeşitli sınırlamalar ortaya çıkmaktadır. Örneğin sulu ortamda çözünmeme bu sınırlamalar içinde en önemlisidir. Bu nedenle hem β-karoten yöntemi hem de DPPH yönteminde, alkollü çözeltilerle çalışıldığından çözünmeyle ilgili sorunlar ortadan kalkmıştır.

1.5. Amaç

Satureja hortensis L.'in metanol veya etanolde hazırlanan özütlerinin güçlü antioksidan aktivite gösterdiği daha önceden belirtilmiştir (Bertelsen ve ark., 1995, Madsen ve ark.,1998). *S. hortensis* L. halk arasında "sater, zater, anık, çipriska, çupriza, geyik otu" olarak bilinmekte ve hem tedavi amaçlı hem de besin katkı maddesi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Yaprakları ve çiçekleri hem taze hem de kurutulmuş olarak yiyecek endüstrisinde kullanılır. Uçucu yağı içecek sanayiinde ve parfümeride kullanılır. Ülkemizde çok fazla ticari amaçlı değerlendirilmemekle beraber, Balkan ülkeleri, Fransa, İspanya, Çek Cumhuriyeti en önemli satıcı kaynaklardır (Svoboda ve ark., 1990). Bu çalışmanın amacı antioksidan bileşenlerin etkin bir şekilde ayrılmasını sağlayan, farklı polaritelere sahip çözücü ve özütleme yöntemlerini araştırmaktır. Uygun özütleme sistemleri önerilebiliyorsa, özüt verimlerine bağlı olarak özütlemenin değerlendirmesini de yapmaktır. Aynı zamanda aktivite belirlenen özütlerin kromatografik analizlerinin yapılarak aktiviteden sorumlu bileşen veya bileşen gruplarını belirlemektir.

S. hortensis'in yanı sıra daha önce aktivitesi konusunda literatürde herhangi bir veri rapor edilmemiş olan *Ferula orientalis* L. de ilk kez bu amaçla çalışılmış. *F. orientalis* ülkemizde "at kasnısı" olarak bilinir, geniş yapraklı ve sarı çiçekleri vardır. Bazı *Ferula* türleri eczacılıkta uyarıcı, kasılma önleyici ve balgam söktürücü olarak kullanılır (Duke, 2002). Özellikle İç Anadolu Bölgesi'nde kabuğu soyulup çiğ olarak yenir (Baytop, 1997).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada *Satureja hortensis* L.ve *Ferula orientalis* L.bitkileri araştırılmıştır.

Satureja hortensis L.:

Lamiaceae/Labiatae (Ballıbabagiller), tek yıllık 10-35 cm boyunda tüylü otsu bitkilerdir. Çiçeklenme dönemi 6.ve 9. aylar arasındadır. Kayalık aşınmış yamaçlar, taşlıklar, boş araziler ve yol kenarlarında yetişir. Deniz seviyesinden 1920 m'ye kadar yetiştiği gözlenmiştir. Türkiye'de özellikle Kuzey Anadolu, Orta Anadolu ve Güney Anadolu'da yaygındır. Dünyada özellikle Güney Avrupa'da yaygındır. *Satureja* cinsinin ülkemizde 14 türü yetişmektedir (Davis, 1982).

Ferula orientalis L.:

Apiaceae/Umbelliferae (Maydanozgiller), çok yıllık 100-150 cm boyunda otsu bitkilerdir. Çiçeklenme dönemi 5.ve 6. aylar arasındadır. Genellikle kayalık yamaçlarda yetişir. 1600-2900 m arasında yetişir. Türkiye'de Doğu Anadolu Bölgesi'nde yaygındır. Dünyada İran ve Kuzey Irak'da yaygındır. *Ferula* cinsinin ülkemizde 17 türü bulunmaktadır (Davis, 1972).

2.2. Bitkilerin Toplanması ve Özütleme Hazırlanması

S. hortensis Haziran 2001 döneminde Malatya'dan (800 m), *F. orientalis* ise yine Haziran 2001 döneminde Zara-Suşehri yolu 10. km, Geminbeli'nden (1000-1100 m) toplandı ve Prof. Dr. Şemsettin Civelek tarafından botanik tanımlama ve adlandırması yapıldı.

Bitkiler toplandıktan sonra ışık almayan, havadar bir ortamda, oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra bitkilerin yaprakları, çiçekleri veya tüm toprak üstü kısmı özütlenme için kullanıldı.

2.3. Özütlenme Teknikleri

Her bir bitkiden altı farklı özüt hazırlandı:

1. Hekzan Özütü (HÖ): 50g kuru materyalin bir sokslet cihazı içinde 250 mL hekzan ile 3 saat boyunca özütlenmesi sonucu elde edilen özüt.
2. Hekzan Sonrası Aseton Özütü (HSAÖ): Hekzan sonrası kalan materyalin 250 mL aseton ile 24 saatlik sürekli çalkalamasından sonra elde edilen özüt.
3. Hekzan Aseton Sonrası Metanol-Su Özütü (MSÖ): Hekzan ve aseton sonrası kalan materyalin 250 mL metanol-su karışımı (1:1) içinde 24 saatlik sürekli çalkalanmasıyla elde edilen karışımın $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de liyofilize edilmesiyle elde edilen özüt.
4. Uçucu Yağ (UY): 50g kuru materyalden clevenger tipi cihazla su buharı damıtması yöntemiyle elde edilen uçucu yağ. UY-Ç: Çiçekten elde edilen uçucu yağ, UY-Y: Yapraktan elde edilen uçucu yağ.
5. Uçucu Yağ Sonrası Aseton (UYSA): Uçucu yağı alınmış materyalin 250 mL aseton ile 24 saat boyunca sürekli çalkalanmasından elde edilen özüt.
6. Uçucu Yağ Sonrası Su Özütü (UYSS): Clevenger cihazında uçucu yağın ayrılmasında kullanılan suyun ayrılarak $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de liyofilize edilmesiyle elde edilen özüt.

Hazırlanan özütler, çözücülerini buharlaştırıcıda ayrıldıktan sonra kütleleri ve verimleri g/kg olarak belirlendi. Daha sonra ağzı kapalı kaplarda karanlıkta $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı ve taze hazırlanmış çözeltileri testlerde kullanıldı. Tüm çalışma boyunca analitik saflıkta çözücü ve kimyasallar (Merck, Darmstad) kullanılmıştır.

2.4. Antioksidan Aktivite Testleri

Bu çalışmada üç ayrı antioksidan aktivite belirleme yöntemi kullanılmıştır:

- 1) DPPH Yöntemi
- 2) β -karoten Renk Açılımı Yöntemi-Agar Difüzyon Yöntemi
- 3) β -karoten Renk Açılımı Yöntemi-Spektrofotometrik Yöntem

2.4.1. DPPH Yöntemi

Hazırlanan tüm özütlerin antioksidan aktiviteleri literatürde tanımlanan yöntem izlenerek yapılmıştır (Cuendet ve ark. 1997; Kirby ve Schmidt 1997, Burits ve Bucar, 2000; Burits ve ark. 2001).

Bu test yöntemi, kararlı serbest radikal 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH)'in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik mor renginin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır. Yani, materyal ne kadar güçlü antioksidan özelliğe sahipse metanolik DPPH çözeltisinin rengini o kadar çok açması beklenir. Bu yöntemde test edilecek olan özütlerin, çeşitli derişimlerde metanol içinde hazırlanan çözeltisinin 50 µL'lik kısımlarının %0.004'lük (w/v) DPPH çözeltisinin 5 mL'si ile karıştırıldı. 30 dakikalık karanlıkta inkübasyon sonrasında, örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçüldü. Özütlerin absorbans değeri boş kontrole (50 µL metanol) karşı değerlendirildi. Her bir özütün ve boş kontrol testlerinin absorbans değerleri kullanılarak özüt % inhibisyon değerleri aşağıda verildiği şekliyle hesaplandı (Bucar ve Burits, 2000).

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri, mg/mL olarak hazırlanan özüt derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek her bir özütün %50 renk açılımını sağlayan derişimleri, %50 inhibisyon (IC₅₀) değeri olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) ve Askorbik asit (AA) kullanıldı. Aktivite belirlenen özütlerin içeriklerine uygun saf maddelerle aynı testler tekrarlanarak aktiviteden sorumlu bileşenler belirlenmeye çalışıldı.

uygulanır. Tüm özütler ve pozitif kontroller 1g/L derişiminde olacak şekilde etanolde çözüldü ve analiz için saklandı. 200 mL kaynatılmış distile suya, 3g bakteriyolojik agar ilave edildi ve çözünmenin tamamlanması için yarım saat otoklavlandı. Otoklav sonrası elde edilen agar çözeltisi 50 °C'ye kadar soğutuldu. Üzerine derişimi 5 g/L olacak şekilde etanolde hazırlanan linoleik asit çözeltisinden 4 mL ve derişimi 1 g/L olan β-karotenin asetondaki çözeltisinden 20 mL eklenerek iyice karıştırıldı. Bu karışımın 35 mL'lik kısımları 8,5 cm çapındaki petri tabaklarına döküldü ve katılaşması beklendi. Katı hale gelen agar üzerinde 50 µL kapasiteli kuyucuklar açıldı ve homojen bir dağılımı sağlamak için 25 µL'lik sıvı agardan her bir kuyucuğa ilave edildi. Daha önce hazırlanan test çözeltilerinden 25 µL'lik kısımlar her bir kuyucuğa uygulandı ve buharlaşma kayıplarını engellemek için tüm kuyucuklar mikroskop camıyla kapatıldı. Petri tabakları ağızları kapalı olarak oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi. Kontrol tabağındaki kuyucuklara aynı hacimde etanol eklendi. Kontrol tabağında β-karoten-linoleik asit sistemini engelleyici herhangi bir bileşen olmadığından yaklaşık 28 saat sonra kuyucukların çevresi ve tüm agarın sarı olan β-karoten rengi tamamen beyazlaşır. Antioksidan özelliğe sahip olan özütler ve pozitif kontrol BHT'nin bulunduğu kuyucuklar ve çevresi ise sarı rengi korudu. BHT'nin bulunduğu kuyucuklar 0-5 aralığında '5', boş kontrol ise '0' olarak değerlendirildi ve 48 saat sonrasında özütler bu aralıkta rengi koruma kapasitelerine göre görsel olarak karşılaştırıldı. Özütlerin verimleri ve koruma dereceleri değerlendirilerek BHT'ye eşdeğer antioksidan etkinliği (EA_{BHT}) hesaplandı.

$$EA_{BHT} = \text{Özütün verimi} \times \frac{\text{Özütün koruma derecesi}}{\text{BHT' nin koruma derecesi (5)}}$$

2.4.3. β-Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem

Görsel olarak değerlendirilen özütler daha anlamlı olması yönünden spektrofotometrik olarak da çalışıldı. Bütün özütler ve pozitif kontrol BHT

2.4.3. β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem

Görsel olarak değerlendirilen özütler daha anlamlı olması yönünden spektrofotometrik olarak da çalışıldı. Bütün özütler ve pozitif kontrol BHT çözeltileri 2g/L olacak şekilde etanolde çözülerek test örnekleri hazırlandı. Spektrofotometrede kullanılacak olan β -karoten-linoleik asit karışımı şu şekilde hazırlandı: 0.5mg β -karoten 1 mL kloroformda çözüldü. 25 μ L linoleik asit 200 mg Tween 80 ile emülyon haline getirilerek β -karoten çözeltisine eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra buharlaştırıcıda 50 °C'de kuvvetli vakum uygulanarak kloroformu uçuruldu. Karışım üzerine, linoleik asitin oksidasyonunu sağlayacak olan önceden 30 dakika boyunca oksijenle doyurulmuş (akış hızı 100 mL dak⁻¹) destile sudan 100 mL eklendi ve 1 dakika boyunca hızlı bir şekilde karıştırıldı. Bu işlem sonunda berrak, sarı renkli β -karoten-linoleik asit test karışımı elde edildi. Bu karışımdan 250 μ L'lik kısımlar, çoklu otomatik okuyucu tabaklarına (mikrotiter plate) alındı. Her bir özüt ve kontrol için üç tekrarlı seriler hazırlandı. 35 μ L'lik test çözeltileri, ilgili serilere ilave edildi. Aynı miktar etanol kontrol serisine uygulandı. Daha sonra, çoklu tabaklar ağızları kapatılarak oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildi ve belli zaman aralıklarında hazırlanan serilerin absorbansı mikrotiter okuyucuda (Bio-Kinetics EL312) 490 nm'de ölçüldü. Yine BHT'nin ve özütlerin absorbans değeri (aynı özütten üç tekrarın ortalaması) karşılaştırılarak bağıl antioksidan aktivite (BAA) değerleri aşağıdaki eşitliklerden hesaplandı.

$$BAA = \frac{\text{Özütün Absorbansı}}{\text{BHT' nin Absorbansı}}$$

2.5. Kromatografik Analizler

2.5.1. Özütlerin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) İle Analizi

İnce tabaka kromatografisi, karışımların analizi için kromatografik analizler içinde en basit ve en yaygın olarak uygulanan yöntemdir. Çok basit, hızlı ve görsel olarak değerlendirme yapılabilmesi gibi nedenlerden dolayı drog içeren karışımlar veya bitki özütlerinin analizinde en ideal analitik yöntem haline gelmiştir (Wagner ve ark., 1984).

İçeriği bilinmeyen bir özütün ayrılması ve tanımlanması için bir seri ardışık İTK uygulaması yapılması gerekir. Uçucu yağlar için toluen-etil asetat (93:7) karışımı; flavonoidler ve fenolik asitlerin İTK analizinde ise etil asetat-formik asit-buzlu asetik asit-su (100:11:11:27) en uygun yürütücü sistemi olarak belirlenmiştir (Wagner ve ark., 1984).

Çalışmada kullanılan bitkiler ve özütlenme yöntemi göz önüne alınarak İTK analizlerinde yukarıda belirtilen yürütücü sistemleri hazırlanmıştır.

2.5.1.1. Uçucu Yağların İTK Analizi

Uçucu yağ özütünden alınan 5 µL lik örnek 50 µL toluen içinde çözüldü ve 5 µL'lik kısım hazır silika jel tabakalara uygulandı (60F254, Merck). Toluen-etil asetat (93:7) yürütücüsünde yürütüldükten sonra UV ışığı altında ayrılan bileşen veya bileşen grupları belirlendi. Tabaka üzerinde belirlenen noktalar üzerine önce etanolik sülfürik asit çözeltisi (% 5 v/v) daha sonra etanolik vanilin çözeltisi (% 1 w/v) püskürtülerek boyandı. Aynı işlemler standartlarla tekrarlandı. Tabaka 110 °C' de 5-10 dakika bekletildi ve oluşan renkli noktalara göre nitel değerlendirme yapıldı.

Her bir türün İTK analizi ve elde edilen kromatogramlar ilgili bölümlerde ayrıntılı olarak sunulacaktır.

2.5.1.2. Diğer Özütle rin İTK Analizi

Uçucu yağ dışında kalan özütle r İTK ile kabaca değ erlendirildi ve ayrıntılı bileş en analizi mevcut imkanlar doğ rultusunda gerç ekleştirilemedi. Hekzan, hekzan sonrası aseton, hekzan aseton sonrası metanol-su, uçucu yağ sonrası aseton ve uçucu yağ sonrası su özütle rinde özellikle flavanoid ve fenolik bileş iklerin kaba nitel (fenolik asitler) analizleri yapıldı. Bu amaçla 5 mg özü t 50 µL etanolde ç özüldü ve 5 µL' lik kısımlar İTK tabakalarına uygulandı. Etil asetat-formik asit-buzlu asetik asit-su (100:11:11:27) ç özücü sisteminde yürütü len özütle re ait kromatogramlar 254 nm dalga boylu UV lambası altında değ erlendirildi.

2.5.2. Uçucu Yağ ların Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizleri

Uçucu yağ özütle rinde aktivite belirlenmesi nedeniyle bileş enlerinin belirlenmesi amacıyla GC/MS analizleri yapıldı. Uçucu yağ ların analizi HP-5 MS (ç apraz bağı lı 5% PH ME Silokzan) kapiler kolunlu (30 m, 0.25 mm iç ç ap, 0.25 µm film kalınlığı) Hewlett Packard 5890 II GC, ve aynı firmanın 5972 model kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı. GC-MS dedeksiyonu için bir elektron iyonizasyon sistemi (70 eV) kullanıldı. Akış hızı 1 mL/min olan helyum taşıyıcı gaz olarak kullanılırken, enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 220 °C ve 290 °C olarak ayarlandı. Etkin bir ayırım sağ lamak amacıyla bir sıcaklık programı uygulandı. Kolon başlangıç sıcaklığı 50 °C iken 3 °C/dak. hızla 150 °C'ye çıkarıldı. Bu sıcaklıkta 10 dakika tutulduktan sonra 10 °C/dak. hızla 250 °C'ye çıkarıldı. Aseton içinde 1/100 oranında seyreltilmiş örneklere den 1.0 µL splitless (ayrısız) olarak enjekte edildi.

Bileş enlerin belirlenmesi aynı kolon ve sıcaklık programı kullanılarak elde edilen saf maddelerin kromatogramları/kütle spektrumları karşılaştırılarak veya GC-MS sisteminin NBS75K kütüphane verileri kullanılarak yapıldı.

2.5.3. İnce Tabaka Yöntemi (İTK) İle Antioksidan Bileşenlerin Belirlenmesi

Özütlerden hazırlanan örneklerin tabaka üzerinde uygun yürütücü sistemlerinde yürütülmesiyle elde edilen kromatogramlarına, uygun işlemler uygulanmasıyla özütlerde hem aktivite olup olmadığı hem de aktiviteden sorumlu muhtemel bileşen veya bileşen grupları belirlenebilir. Bu şekilde daha çabuk ve nitel olarak aktivite belirlenmesi yapılabilir. Uygun yürütücü sistemlerinde yürütülen tabakalardaki ayrılan bileşenler UV altında belirlendikten sonra tabakalar üzerine % 0.2 (w/v) lik metanolde hazırlanan DPPH' çözeltisi püskürtüldü ve 30 dakika sonra mordan sarıya dönüşen noktalar antioksidan aktivite gösteren bileşen veya bileşen grubu olarak değerlendirildi. İlgili kromatogramlar sonuçlar kısmında ayrıntılı olarak sunulacaktır.

3. BULGULAR

3.1. Özütler ve Verimleri

Bölüm 2.3' de belirtilen şekilde hazırlanan özütler ve verimleri Çizelge 3.1' de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. *F. orientalis* ve *S. hortensis* özütleri ve verimleri.

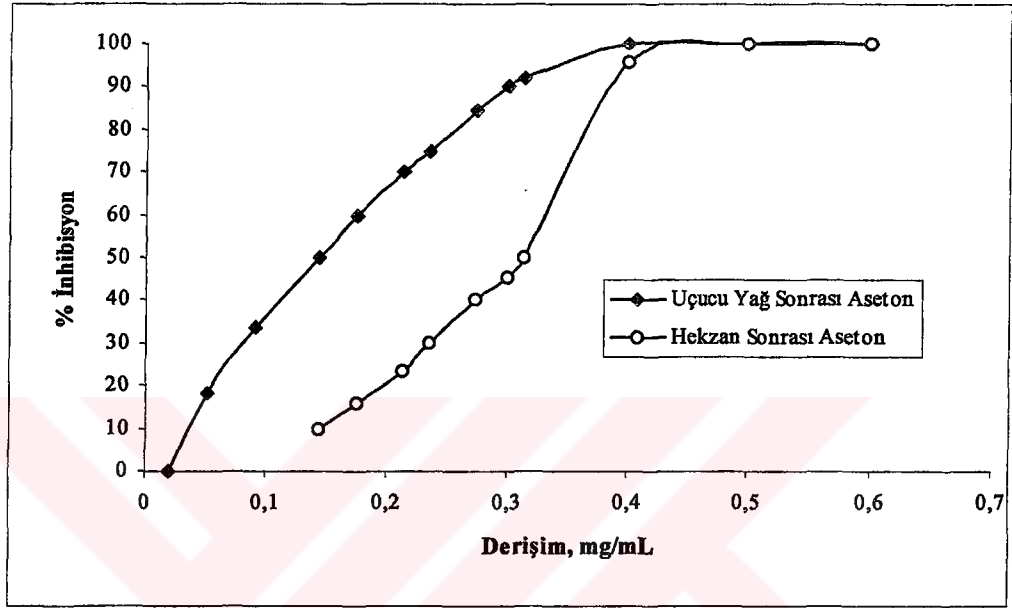
| Özüt | Verim, g/kg | |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|
| | <i>F. orientalis</i> | <i>S. hortensis</i> |
| Hekzan | 27.99±2 | 21.93±3 |
| Hekzan Sonrası Aseton | 8.75±5 | 9.83±4 |
| Hekzan Aseton Sonrası Metanol-Su | 94.52±3 | 42.93±5 |
| Uçucu Yağ (Toprak Üstü) | 4.39±2 | 15.67±3 |
| Uçucu Yağ (çiçek) | 14.46±3 | - |
| Uçucu Yağ (yaprak) | 7.18±2 | - |
| Uçucu Yağ Sonrası Aseton | 28.11±5 | 38.84±4 |
| Uçucu Yağ Sonrası Su | 212.10±5 | 156.65±5 |

Özüt verimlerindeki değişkenlikler polar ve apolar çözücüler yönünden genel bir eğilim sergilemekle beraber çoğunlukla bitkinin karakterine bağlıdır.

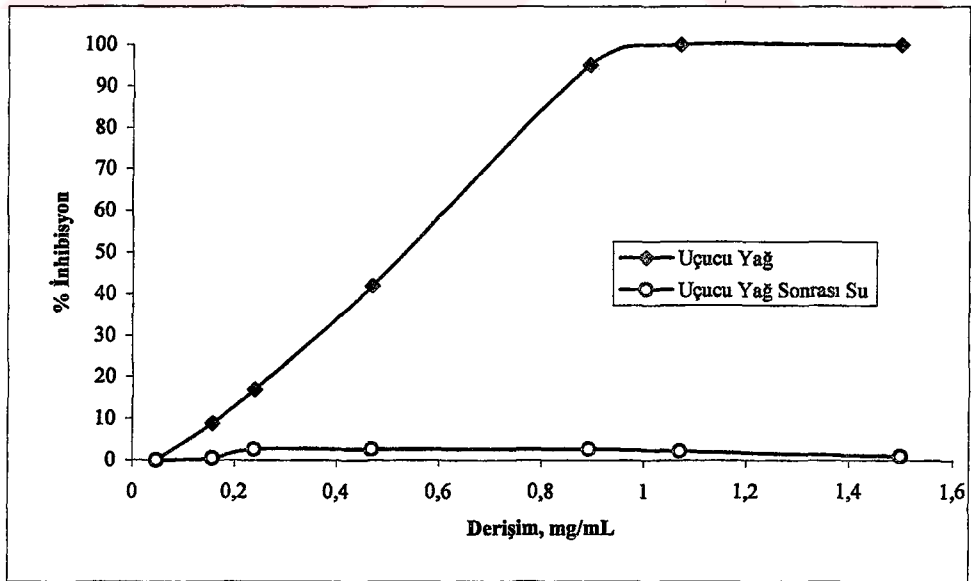
3.2. DPPH Yöntemi

Bölüm 2.4.1'de ayrıntıları verilen deneysel yöntem izlenerek DPPH kararlı radikalinin antioksidan maddeler varlığındaki davranışı incelenmiştir. Bütün özütlerin stok çözeltileri hazırlanarak ardışık seyreltme yoluyla farklı derişimlerdeki örneklerinin % 0.004'lük DPPH çözeltilisinin renk açma kapasiteleri

% inhibisyon olarak belirlendi. Özüt derişimine karşı % inhibisyon grafikleri *F. orientalis* için Şekil 3.1 ve *S. hortensis* için ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

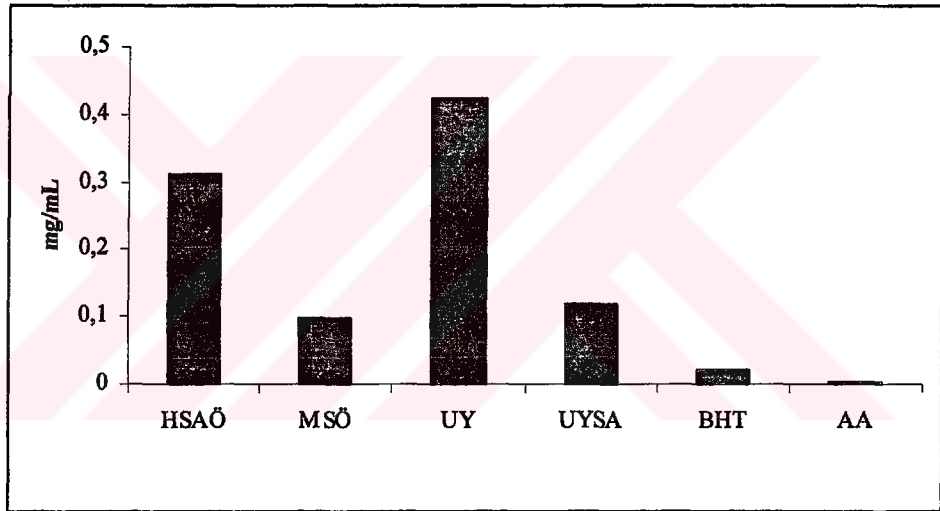


Şekil 3.1. DPPH yönteminde *F. orientalis*'in özüt derişimine karşı % inhibisyon değerleri.



Şekil 3.2. DPPH yönteminde *S. hortensis*'in özüt derişimine karşı % inhibisyon değerleri.

Tüm özütlerin radikal temizleme etkinliğinin (DPPH serbest radikale hidrojen veya elektron verme kapasitesi) bir ölçütü olarak derişimlere karşı % inhibisyon grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak eğer aktivite saptanmışsa % 50 inhibisyon sağlayan derişimler mg/mL olarak bulundu. Aynı çalışma şartlarında pozitif kontrol BHT ve askorbik asit için de derişim değerleri bulundu. Elde edilen bulgular karşılaştırmalı olarak Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de sunulmuştur.



HSAÖ: Hekzan Sonrası Aseton Özütü; MSÖ: Hekzan Aseton Sonrası Metanol-Su; UY: Uçucu Yağ; UYSA: Uçucu Yağ Sonrası Aseton; BHT: Butillenmiş Hidroksi Toluen; AA: Askorbik Asit

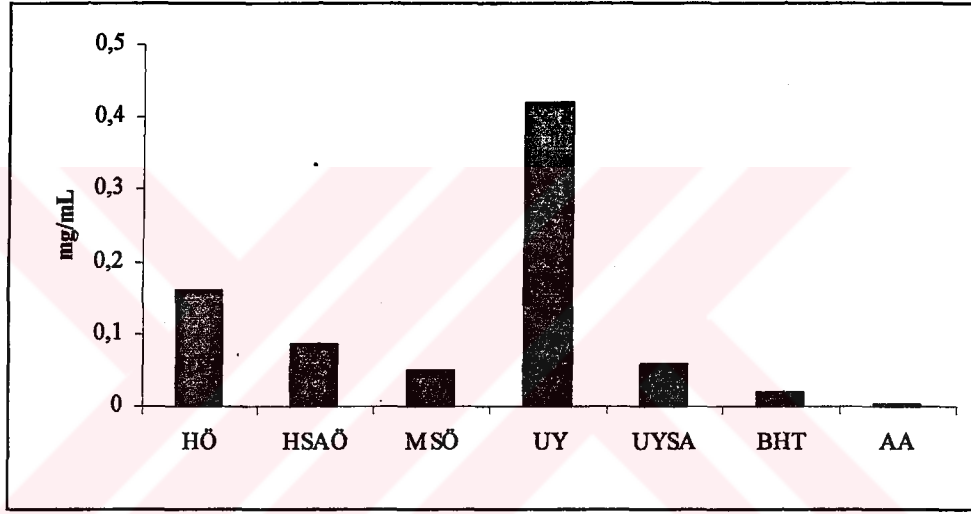
Şekil 3.3. *F. orientalis* özütleri, BHT ve askorbik asitin DPPH testinde %50 inhibisyon sağlayan derişimleri.

DPPH testinde hekzan ve uçucu yağ sonrası su özütünde herhangi bir aktivite gözlenmemiştir.

F. orientalis'in toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın antioksidan aktivitesi, aktivite gösteren diğer özütlere göre daha düşüktür. Bu nedenle bu türün sadece yaprakları ve çiçeklerinden elde edilen uçucu yağları da incelenmiştir. DPPH testinde *F. orientalis*'in yaprak ve çiçekten elde edilen uçucu yağları ve bulguları Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. *F. orientalis*'in yaprak ve çiçeklerinden elde edilen uçucu yağlarının DPPH sebest radikalini inhibisyonu.

| Uçucu Yağ | DPPH Aktivitesi | IC ₅₀ , mg/mL |
|-------------|-----------------|--------------------------|
| Toprak Üstü | Aktivite var | 0.42 |
| Çiçek | Aktivite var | 0.13 |
| Yaprak | Zayıf aktivite | >10 |



HÖ: Hekzan Özütü; HSAÖ: Hekzan Sonrası Aseton Özütü; MSÖ: Hekzan Aseton Sonrası Metanol-Su; UY: Uçucu Yağ; UYSA: Uçucu Yağ Sonrası Aseton; BHT: Butillenmiş Hidroksi Toluen; AA: Askorbik Asit

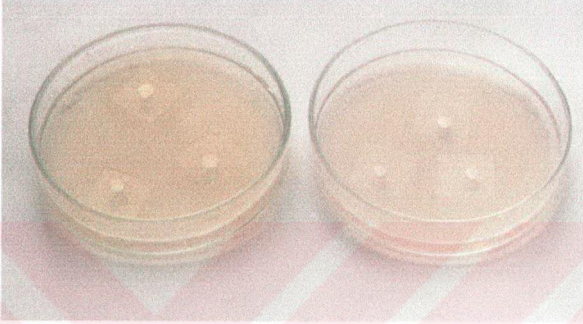
Şekil 3.4 *S. hortensis* özütleri, BHT ve askorbik asitin DPPH testinde %50 inhibisyon sağlayan derişimleri.

DPPH testinde uçucu yağ sonrası su özütünde bu derişim aralığında herhangi bir aktivite gözlenmemiştir.

3.3. β -Karoten Renk Açılım Testi-Agar Difüzyon Yöntemi

Ön tarama testi olarak değerlendirilen bu yöntemde nicel değerlerden ziyade görsel olarak elde edilen değerler mevcuttur. Bölüm 2.4.2'de belirtildiği gibi pozitif kontrol BHT'nin β -karoten-linoleik asit sisteminde β -karotenin rengini koruma faktörü '5' ve boş kontrolün '0' olarak alındı ve özütlerin koruma

faktörleri bu aralıkta değerlendirildi. Şekil 3.5'de BHT ve boş kontrole ait agar tabakları gösterilmiştir.

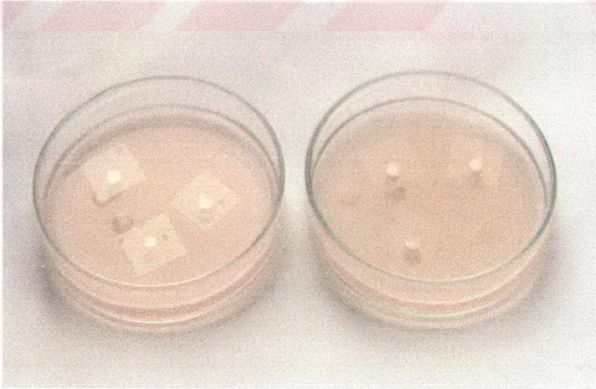


BHT

Boş kontrol

Şekil 3.5. BHT ve boş kontrole ait agar tabaklarının 48 saat sonrası görünümü

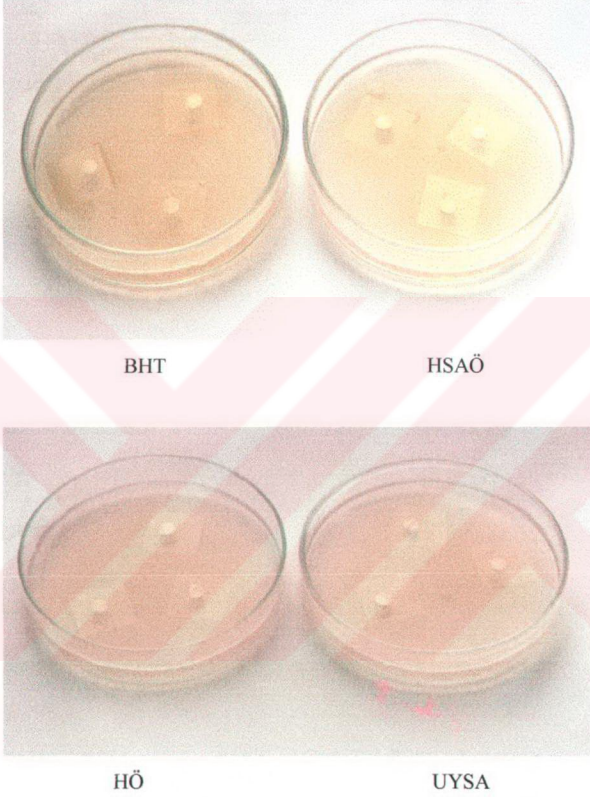
Aynı şekilde hazırlanan *F. orientalis* ve *S. hortensise* ait agar tabakları Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



UYSA

HSAÖ

Şekil 3.6. *F. orientalis*'in UYSA ve HSAÖ'de 48 saat sonrası agar tabaklarının görünümü.



Şekil 3.7. BHT ve *S. hortensis*'in HSAÖ, HÖ ve UYSA özütünün 48 saat sonrası agar tabaklarının görünümü.

Tabaklarda aktivite gözlenmesi ve β -karotenin renginin korunma dereceleri Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Agar yönteminde özütler ve kontrollerin β -karotenin rengini koruma dereceleri.

| <i>Özüt</i> | <i>F. orientalis</i> | <i>S. hortensis</i> |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|
| Hekzan | 1 | 3 |
| Hekzan Sonrası Aseton | 3 | 3 |
| Hekzan Aseton Sonrası Metanol-Su | 1 | 2 |
| Uçucu Yağ (Toprak Üstü) | 1 | 3 |
| Uçucu Yağ (çiçek) | 0 | - |
| Uçucu Yağ (yaprak) | 1 | - |
| Uçucu Yağ Sonrası Aseton | 3 | 3 |
| Uçucu Yağ Sonrası Su | 1 | 2 |
| BHT | 5 | 5 |
| Boş Kontrol | 0 | 0 |

Yukardaki verilerden ve Çizelge 3.1'de ki özüt verimlerinden yararlanılarak BHT'ye eşdeğer antioksidan (EA_{BHT}) etkinlikleri her iki tür için de Çizelge 3.4'de sunulmuştur.

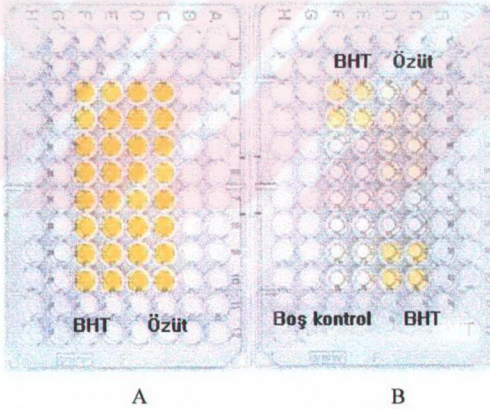
Çizelge 3.4. Özütlerin BHT'ye eşdeğer antioksidan (EA_{BHT}) etkinlikleri

| <i>Özüt</i> | <i>F. orientalis</i> | <i>S. hortensis</i> |
|----------------------------------|----------------------|---------------------|
| Hekzan | 5.60 | 13.16 |
| Hekzan Sonrası Aseton | 5.25 | 5.90 |
| Hekzan Aseton Sonrası Metanol-Su | 18.90 | 17.17 |
| Uçucu Yağ (Toprak Üstü) | 0.88 | 9.40 |
| Uçucu Yağ (çiçek) | 0.00 | - |
| Uçucu Yağ (yaprak) | 1.44 | - |
| Uçucu Yağ Sonrası Aseton | 16.86 | 23.30 |
| Uçucu Yağ Sonrası Su | 84.84 | 62.66 |

3.4. β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem

Etanolde çözülerek hazırlanan pozitif kontrol BHT, özütler ve boş kontrol test örnekleri β -karoten-linoleik asit sisteminde spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Yöntemde belirtildiği üzere 2 g/L olacak şekilde hazırlanan test örnekleri β -karoten-linoleik asit sistemine ilave edilerek absorbans değerleri belirli zaman aralıklarında spektrofotometrik olarak izlendi. β -karotenin renginin korunması pozitif aktivite değeri olarak değerlendirildi.

F. orientalis ve *S. hortensise* ait zamana bağlı β -karotenin renk korunumunun spektrofotometrik olarak değerlendirilmesinde kullanılan mikrotiter tabakların görünümü Şekil 3.8'de görülmektedir.

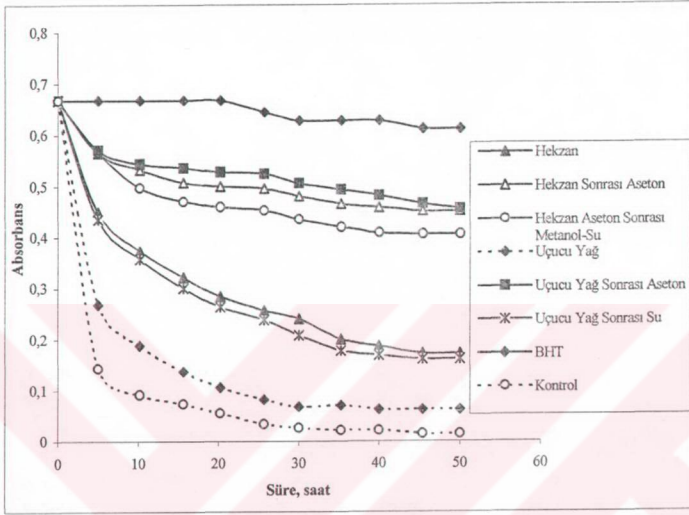


A: Antioksidan aktivite gösteren özütler ve pozitif kontrol BHT

B: Antioksidan aktivite göstermeyen özütler (sağ üst köşe), pozitif kontrol BHT ve boş kontrol (sol alt köşe).

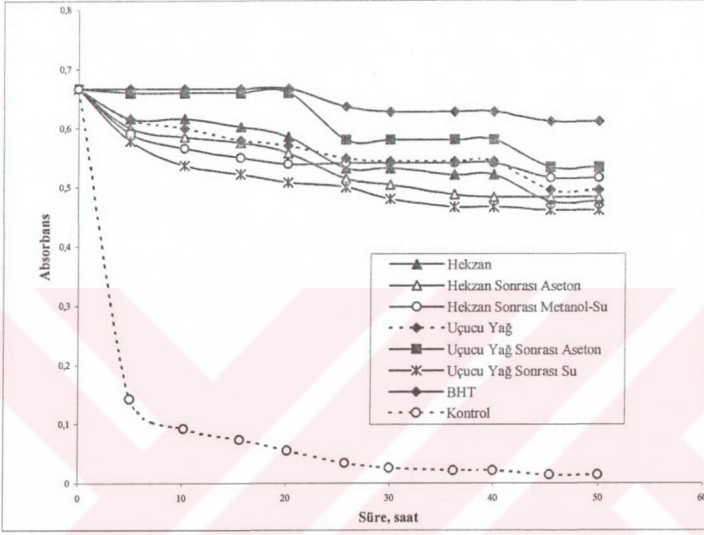
Şekil 3.8 β -karoten-linoleik asit sisteminde mikrotiter tabaklarının görünümü

Zamana bağlı olarak β -karotene ait 490 nm'deki absorbans değerindeki değişim sırasıyla Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. *F. orientalis* özütleri için zamana bağlı olarak β -karoten'e ait 490 nm'deki absorbans değerindeki değişimi.

DPPH testinin tersine *F. orientalis*'in çiçek ve yapraklarından elde edilen uçucu yağlar toprak üstü kısımlarından elde edilen yağla aynı davranışlar sergilediğinden şekil içinde gösterilmemiştir.



Şekil 3.10. *S. Hortensis* özütleri için zamana bağlı olarak β -karotene ait 490 nm'deki absorbans değerindeki değişim

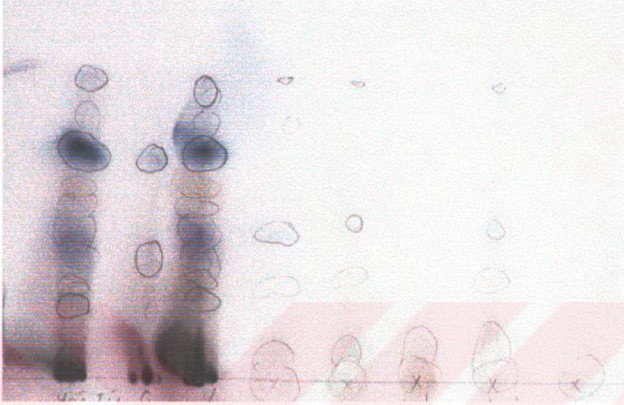
3.5. Kromatografik Analizler

3.5.1. Özütlerin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) İle Analizi

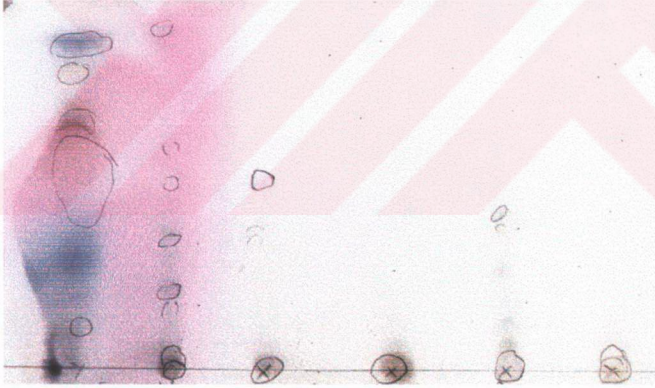
Çalışmada kullanılan bitkiler ve özütlenme yöntemi göz önüne alınarak İTK analizlerinde Bölüm 2.5.1.'de belirtilen yürütücü sistemleri hazırlanmıştır.

3.5.1.1. Uçucu Yağların İTK Analizi

Uçucu yağlar için toluen-etil asetat (93:7) karışımı yürütücü sistemi olarak kullanıldı. Boyama sonrası *F. orientalis* ve *S. hortensis* uçucu yağlarının İTK tabakaları Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



a- UY UY-Ç UY-Y HÖ HSAÖ MSÖ UYSA UYSS



b- UY HÖ HSAÖ MSÖ UYSA UYSS

Şekil 3.11. a- *F. orientalis* b- *S. hortensis* uçucu yağlarının ince tabaka kromatogramları

3.5.1.2. Diğer Özütlelerin İTK Analizi

Uçucu yağ dışında kalan özütleler İTK ile kabaca değerlendirildi ancak ayrıntılı bileşen analizi mevcut imkanlar doğrultusunda gerçekleştirilemedi. Hekzan, hekzan sonrası aseton, hekzan aseton sonrası metanol-su, uçucu yağ sonrası aseton ve uçucu yağ sonrası su özütlelerinde özellikle flavanoid ve fenolik bileşiklerin kaba kalitatif analizleri yapıldı. Etil asetat-formik asit-buzlu asetik asit-su (100:11:11:27) çözücü sisteminde (93:7 toluen-etilasetat) yürütülen özütlere ait kromatogramlar 254 nm dalga boyu UV lambası altında değerlendirildi.

F. orientalis'de hekzan sonrası aseton ve uçucu yağ sonrası aseton özütlelerinde benzer kromatogramlar elde edildi. Bu özütleler özellikle apolar bileşenler içerdiğinden fenolik bileşenlere özgü bileşen veya bileşen grupları gözlemlendi. Bu bileşen veya bileşen gruplarının belirlenmesi için ayrıntılı GC/MS, HPLC analizleri gerekmektedir. Uçucu yağın β -karoten-linoleik asit sisteminde aktivite göstermediği dikkate alınca bu bileşenlerin su buharı damıtmasıyla ayrılmayan fenolik bileşenler olduğu düşünülebilir. Çoğunlukla bitkiye doğal renklerini veren klorofil gibi bileşenlerin zenginliğine bağlı yeşil noktalar da gözlemlendi. Hekzan özütü, uçucu yağ özütüne benzerlik sergilerken uçucu yağ sonrası su özütü tamamen farklı bir davranış sergiledi. Diğer özütlelerde gözlenen noktalar bu özütte gözlenmedi. Muhtemelen bitkinin sahip olduğu en polar bileşenler bu özütte toplanmış olmalıdır.

3.5.2. Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizleri

Her üç yöntemde de aktivite gösteren tüm özütlelerin nitel ve nicel bileşen analizlerini yapmak mümkün olmamakla birlikte uçucu yağ özütlelerinde ayrıntılı yapı analizi yapılabilmektedir. DPPH yönteminde her iki türün uçucu yağlarında aktivite belirlenmesine rağmen β -karoten-linoleik asit yönteminde *S.hortensis*'de kuvvetli aktivite saptanmıştır. Her iki türün de bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.5.2'de ayrıntılarıyla tanımlanan GC/MS analizleri yapıldı. Uygulanan sıcaklık programı sonucunda elde edilen kromatogramın

değerlendirilmesi sonucunda elde edilen yağ içerikleri Çizelge 3.5 ve 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.5. *F. orientalis*'in uçucu yağ içeriği*

| t _R (dak.) | Bileşenler | % Bileşim |
|-----------------------|------------------------------|-----------|
| 8.222 | 2-Nonen | 0.2 |
| 9.730 | α -Pinen | 20.5 |
| 10.315 | Kamfen | 3.4 |
| 11.563 | β -Pinen | 1.0 |
| 12.356 | β -Mirsen | 2.8 |
| 13.011 | α -Fallendren | 13.0 |
| 14.289 | β -Fallendren | 19.1 |
| 14.676 | β -Osimen (Z) | 3.7 |
| 15.340 | β -Osimen (E) | 14.7 |
| 15.657 | γ -Terpinen | 0.1 |
| 16.658 | <i>m</i> -Krezol | 0.7 |
| 16.975 | Belirlenmedi + Terpinolen | 1.7 |
| 19.176 | 3,4-Dimetil-2,4,6-octatrien | 0.5 |
| 21.297 | 2-Asetil-5-metilthiophen | 2.3 |
| 21.584 | Terpinen-4-ol | 0.1 |
| 22.010 | Krypton | 0.2 |
| 22.823 | 2,3,6-Trimetil-fenol | 0.3 |
| 26.401 | 4-Hidroksi-2-metilasetofenon | 0.6 |
| 26.867 | Bornil asetat | 2.7 |
| 36.204 | Zingiberen | 0.1 |
| 36.759 | β -Bisabolol | 0.1 |
| 47.374 | α -Bisabolol | 1.4 |
| | Toplam | 89.2 |

Sıcaklık programı: 50 °C iken 3 °C/dak. hızla 150 °C'ye, bu sıcaklıkta 10 dakika tutulduktan sonra 10 °C/dak. hızla 250 °C'ye.

- GC/MS analizleri Atina Tarım Üniversitesi Laboratuvarlarında Prof.Dr. Moshos Polissiou tarafından yapılmıştır.

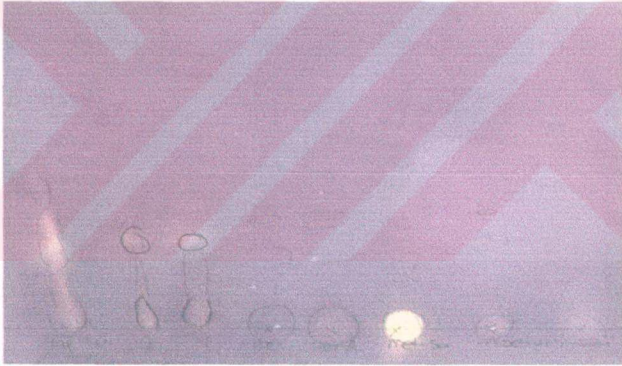
Çizelge 3.6. *S. hortensis*'in uçucu yağ içeriği

| t _R (dak.) | Bileşenler | % Bileşim |
|-----------------------|--|-------------|
| 9.444 | Tujen | 0.8 |
| 9.722 | α -Pinen | 3.0 |
| 11.654 | β -Pinen | 2.5 |
| 12.418 | β -Mirsen | 1.4 |
| 12.983 | α -Fallendren | 0.3 |
| 13.607 | α -Terpinen | 2.7 |
| 14.073 | p-Simen | 10.0 |
| 15.262 | β -Osimen | 0.1 |
| 15.956 | γ-Terpinen | 21.5 |
| 17.175 | Terpinolen | 0.1 |
| 21.041 | Borneol | 0.3 |
| 21.626 | Terpinen-4-ol | 0.3 |
| 25.769 | Pulegon | 0.1 |
| 26.908 | Anethol | 0.5 |
| 27.721 | Timol | 28.9 |
| 28.266 | Karvakrol | 26.1 |
| 30.179 | Timol asetat | 0.3 |
| 30.992 | Karvakrol asetat | 0.1 |
| 33.074 | Karyofillen | 0.4 |
| 33.906 | Dekahidro-1,1,7-trimetil-4-metilen-1H-cycloprop[e]azulen | 0.1 |
| 35.394 | Germacren B | 0.2 |
| 36.890 | β -Bisabolen | 0.1 |
| Total | | 99.8 |

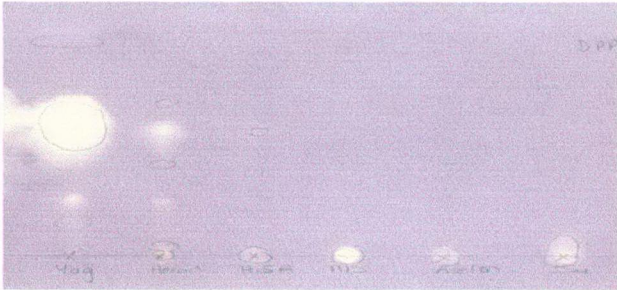
Sıcaklık programı: 50 °C iken 3 °C/dak. hızla 150 °C'ye, bu sıcaklıkta 10 dakika tutulduktan sonra 10 °C/dak. hızla 250 °C'ye.

3.5.3. İnce Tabaka Yöntemi İle Antioksidan Bileşenlerin Belirlenmesi

Antioksidan aktiviteden sorumlu muhtemel bileşen veya bileşen grupları doğrudan İTK tabakaları üzerinde belirlendi. Uygun yürütücü sistemlerinde yürütülen tabakalardaki ayrılan bileşenler UV altında belirlendi ve tabakalar üzerine % 0.2 (w/v) lik metanolde hazırlanan DPPH' çözeltisi püskürtüldü. 30 dakika sonra DPPH'nin karakteristik mor rengini mordan sarıya dönüştüren noktalar antioksidan aktivite gösteren bileşen veya bileşen grubu olarak değerlendirildi. *F. orientalis* ve *S. hortensis*'e ait DPPH çözeltisi püskürtülmüş tabakalar Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



a- UY UY-Ç UY-Y HÖ HSAÖ MSÖ UYSA UYSS



b- UY HÖ HSAÖ MSÖ UYSA UYSS

il 3.12. a- *F. orientalis* b- *S. hortensis*'e ait DPPH çözeltisi püskürtülmüş tabakalar.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1. Özüt Verimleri

Her iki bitkiden, Bölüm 2.3’de anlatıldığı şekilde farklı çözücüler ve özütleme yöntemi kullanılarak altı farklı özüt elde edildi. Elde edilen özütlerin her biri için antioksidan aktivite kapasiteleri araştırıldı ve kromatografik analizleri yapıldı. Elde edilen özütler arasında gerek antioksidan aktivitesi gerekse yapı analizi bakımından elde edilen farklılıklar Bölüm 3’de nitel ve nicel olarak değerlendirildi.

Özütlerden elde edilen verimler Çizelge 3.1’de sunulmuştur. Çizelgeden görüldüğü gibi hem *F. orientalis* hem de *S. hortensis*’de en iyi verimi g/kg olarak UYSS özütü ve MSÖ aynı özütlerde sağlamıştır. Özüt verimindeki bu değişkenlikler, çözücünün polar veya apolar olmasına bağlıdır. Özütleme işlemi Çizelge3.1’de yazılan sıraya göre yapıldığında, kullanılan çözücülerin polaritesi apolardan polara doğru gitmektedir. Bu durumda kullanılan en son çözücü sistemi sudur ve bitkilerden elde edilen verime bakıldığında iki bitki türü için de en yüksek verimi g/kg olarak UYSS özütü sağlamıştır. Suyun polar olması sebebiyle en polar bileşenler ve diğer çözücülerde ayrılamayan selüloz, lignin gibi türler UYSS özütünde toplanmıştır.

4.2. DPPH Testi

Tüm özütlerin antioksidan aktivite testleri Bölüm 2.4.1’de anlatıldığı şekilde uygulandı. DPPH yöntemi uygulanarak bazı özütlerden edilen bulgular *F. orientalis* (UYSA ve HSAÖ) ve *S. hortensis* (UY ve UYSS) için Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de sunulmuştur. Şekil 3.1’e bakıldığında *F. orientalis*’in serbest radikal temizleme aktivitesi (% inhibisyon olarak tanımlanan) derişime bağımlıdır ve artan özüt derişimleriyle artmaktadır. Örneğin *F. orientalis*’in UYSA özütünde 0.02-0.4 mg/mL derişim aralığında % inhibisyon değeri düzenli bir şekilde

arttıktan sonra 0.4 mg/mL'nin üzerindeki derişimlerde % 100 inhibisyon sağlanmaktadır.

S. hortensis'de ise UY özütünde derişim yaklaşık 1 mg/mL'ye kadar artırıldığında % inhibisyon da derişimle doğru orantılı olarak artmış, derişim 1 mg/mL'den sonra ise % 100 inhibisyon sağlanmıştır. UYSS özütünde ise 0.05-1.5 mg/mL derişim aralığında herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir ancak çok yüksek derişimlerde (>10 mg/mL) aktivite saptanmıştır.

F. orientalis'in tüm özütlerinin DPPH serbest radikalini temizleme yönünden derişimlere karşı % inhibisyon grafiklerinden yararlanılarak % 50 inhibisyon sağlayan derişimler karşılaştırılmalı olarak Şekil 3.3.'de görülmektedir. Böylece özütlerden en yüksek aktiviteye sahip olanlar en düşük derişimde % 50 inhibisyon sağlayan özütlerdir. BHT ve AA'in DPPH yönteminde, % 50 inhibisyon sağlayan derişimleri de aynı şekil içinde verilmiştir. *F. orientalis* özütlerinde serbest radikal temizleme aktivitesi pozitif kontroller BHT ve AA ile karşılaştırıldığında daha düşük olmasına karşın aktivite değerleri sırayla MSÖ, UYSA, HSAÖ ve UY özütleri yönünde azalmıştır. *S. hortensis* için ise Şekil 3.4'de elde edilen bulgulardan, özütlerin aktivite gösterme sırası MSÖ, UYSA, HSAÖ, HÖ ve UY şeklindedir.

Elde edilen veriler doğrultusunda özütlerin kararlı serbest radikal DPPH'ı temizlemesi yönünden değerlendirildiğinde en yüksek aktivitenin her iki bitki türünde de MSÖ'de sağlandığı görülmüştür. Bu bulguya göre daha çok polar çözücülerle yapılan özütleme yöntemi uygun görülmektedir. Bu özütleme için metanol-su karışımının kullanılması pek çok polar fenolik bileşimin özüt içine alınmasına olanak sağladığı düşünülmektedir. Literatürde fenolik bileşiklerin antioksidan özellik gösterdiği pek çok kez rapor edilmiştir (Gülçin ve ark., 2002; Kochan ve ark., 1999; Pearson ve ark., 1997; Moller ve ark., 1999; Bertelsen ve ark., 1995; Sawa ve ark., 1999). *Origanium*'dan elde edilen su özütlerinin hidroksil radikalini temizleme özelliğinin yüksek olduğu ve bunun da fenolik bileşiklerden kaynaklandığı belirtilmektedir (Moller ve ark., 1999). Antioksidan aktivitenin düşük olduğu diğer özütleme yöntemlerinde toplam fenolik içeriğinin daha düşük olduğu da belirtilmektedir. Yine *S. hortensis*'in antioksidan

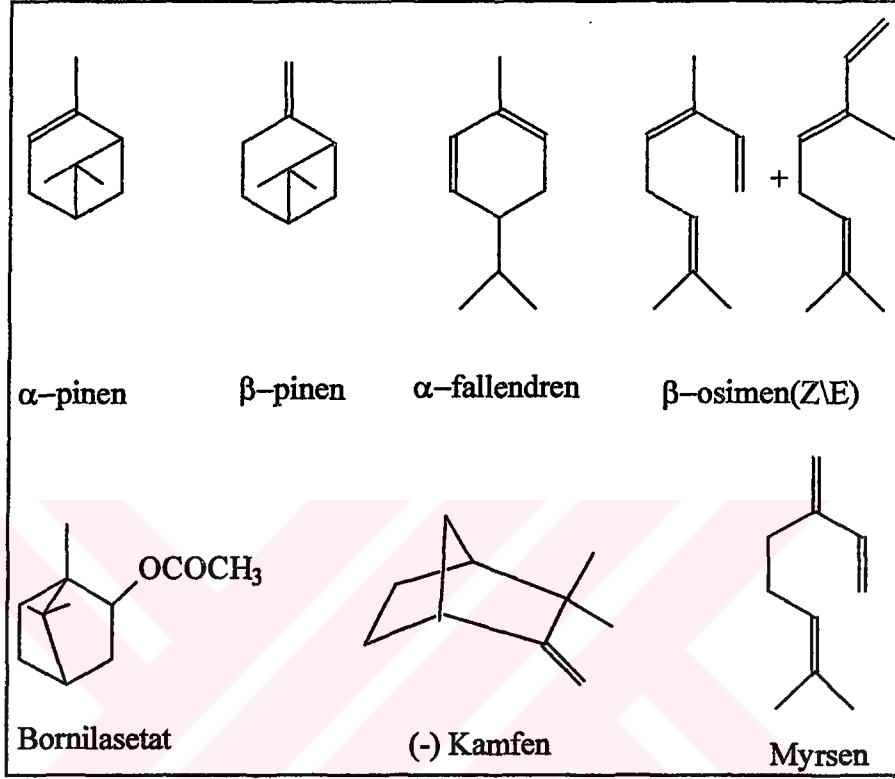
aktivitesiyle ilgili olarak Bertelsen *ve ark.* (1995), Madsen *ve ark.* (1998)'nin çalışmalarında antioksidan bileşen olarak bir fenolik asit olan rosmarinik asit göstermiştir. Her iki çalışmada da etanol özütleri kullanılmıştır.

Bitkisel kökenli fenolik bileşiklerin insan sağlığı ve besin lipitlerinin korunması gibi alanlarda kullanılabileceği daha önceden belirtilmiştir. Çeşitli bitkisel fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite potansiyelleri, düşük yoğunlukla lipoproteinlerin oksidasyonunu inhibe etmelerine göre değerlendirilmiş ve karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asitin güçlü aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Pearson *ve ark.*, 1997).

Çalışmada uygulanan özütleme yöntemi ele alındığında, apolar çözücülerle yapılan özütlerde gözlenen aktiviteden yine fenolik bileşiklerin etkin olduğu söylenebilir. İTK üzerine yapılan DPPH testlerinde de bu özellik gözlenmektedir.

F. orientalis'in İTK tabakasında apolar özütler UY,HÖ, HSAÖ ve UYSA içerikleri benzerlik göstermektedir. Şekil 3.12.a incelendiğinde bu özütlere karşılık gelen noktalar birbiriyle uyum içindedir. Dolayısıyla bu özütlerin içerikleri özellikle apolar fenolik bileşenler yönünden aynı olması beklenir. *F. orientalis*'in uçucu yağının GC/MS analizi sonucunda yağ içeriğinin toplam %89.2'si belirlenmiştir. %10.8'lik kısmı çok eser düzeydeki bileşenlere karşılık gelmekte olup (< %0.1) belirlenmesi yapılmamıştır. Yağ içeriğine bakıldığında en büyük oranda α ve β fellandrenler (toplam %32.1), α -pinen (% 20.5), β -pinen (% 1.0), E ve Z formunda β -osimen (% 18.4), β -myrsen (% 2.8), kamfen (%3.4), bornil asetat (% 2.7) ve α - β -bisabolen (toplam % 1.5) bulunmaktadır.

Genel anlamda monoterpen hidrokarbonlar ve oksijenli monoterpenler yağın içeriğini oluşturmaktadır. Yağ içinde bulunan önemli bileşenlerin açık formülleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *F. orientalis* uçucu yağında bulunan ana bileşenler

Bu bileşenlerden α -pinen, β - pinen ve terpinen-4-ol'ün saf maddeleriyle yapılan DPPH testinde herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Bununla beraber ana bileşenler olan α ve β -fallendrenlerin antioksidan aktivitesiyle ilgili literatürde herhangi bir veriye de rastlanmamıştır. Oysa β -osimenin (Z/E), cis/trans izomerlerinin bir karışımı ve mirsen ile yapılan antioksidan aktivite çalışmasında orta derecede aktiviteye sahip oldukları daha önceden Ruberto ve Baratta tarafından (2000) rapor edilmiştir. Aynı çalışmada γ -terpinen oldukça yüksek aktivite sergilerken bornil asetat, terpinen-4-ol ve kamfenin çok zayıf aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Bu çalışmada UY, HSAÖ ve UYSA özütlerinde benzer aktivitelerin gözlenmesi yukarıda bahsedilen fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır.

Timol, karvakrol ve γ -terpinenin güçlü antioksidanlar oldukları bilinmektedir (Burits ve Bucar, 2000; Fadel ve ark., 1999; Dorman ve ark., 2000; Ruberto ve Baratta, 2000). Bunların yanı sıra p-simen ve α -terpinin de oldukça iyi aktivite sergilediği belirtilmektedir (Ruberto ve Baratta, 2000). Dolayısıyla uçucu yağ ve uçucu yağa benzer özellikler sergileyen özütlerdeki aktivitenin bu türlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada terpinen-4-ol, p-simen, α - ve β -pinenler, timol ve karvakrolün saf maddeleriyle DPPH testi yapıldı. Timol (% 50 inhibisyon 161 $\mu\text{g/mL}$) ve karvakrol ((% 50 inhibisyon 245 $\mu\text{g/ml}$) güçlü radikal temizleme aktivitesi sergilerken diğer uçucu yağ bileşenlerinde hiç yada çok zayıf aktivite gözlemlendi.

UY ile karşılaştırıldığında da HÖ, HSAÖ ve UYSA özütleri uçucu yağdan daha iyi aktivite göstermektedir (Şekil 3.4). Muhtemelen su buharı damıtmasıyla ayrılamayan daha yüksek yapıli polifenoller ve flavonoidler gibi diğer türler ancak asetonla ayrılmakta ve uçucu yağ bileşenleriyle birlikte aktiviteye katkıda bulunmaktadır. Ancak bu bileşenler çalışma kapsamında incelenememiştir. Özellikle özütlerin toplam fenol içeriğinin ve polifenollerin belirlenmesinin daha ileri düzeyde araştırılması gerekmektedir.

4.3. β -Karoten Renk Açılımı Testi-Agar Difüzyon Yöntemi

Antioksidan aktivite testi için uygulanan diğer bir yöntem Bölüm 3.3'de ayrıntıları sunulan β -karoten renk açılımı-agar difüzyon yöntemidir. DPPH yönteminde DPPH'nin karakteristik mor renginin açılması beklenirken bu yöntemde DPPH'nin tersine, karoten'in karakteristik sarı renginin korunması amaçlanmıştır. *F. orientalis* ve *S. hortensis*'in taze hazırlanmış her bir özüt çözeltisinin Bölüm 2.4.2'de anlatıldığı şekilde tabaklara uygulanması sonucu elde edilen veriler görsel olarak Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de fotoğraflarla sergilenmiştir. Pozitif kontrol olarak yine BHT seçildi ve beklenildiği gibi BHT, linoleik asitin oksidasyonu sonucu oluşan konjuge dienler ve diğer bozunma ürünlerini inhibe ederek β -karotenin renginin açılımını engellemiştir. Kontrol

tabağında ise oksidasyonu önleyici herhangi bir bileşen bulunmadığından oluşan konjuge dienler β -karotenin sarı rengini 28 saat sonra tamamen beyazlaştırmıştır. Tüm özütlerin renkleri hem BHT hem de boş kontrolle ayrı ayrı karşılaştırılarak renk koruma kapasitelerine göre 0-5 aralığında değerlendirilip, veriler Çizelge 3.4'de sunulmuştur. Buradan elde edilen sonuçlar kendi aralarında değerlendirildiğinde ise *F. orientalis* için en iyi aktiviteyi HSAÖ ve UYSA özütü sağlamıştır. En düşük aktivite ise uçucu yağın çiçek kısmında gözlenmiştir.

F. orientalis için farklı çözücülerin kullanımı anlamlı sonuçlar sergilemiştir. En iyi aktivite aseton kullanılarak elde edilen özütlemeye saptanmıştır. Aynı bitkinin yaprak ve tüm toprak üstü kısımlarından elde edilen sonuçlar birbiriyle uyusmaktadır. Aynı bileşen grupları hem uçucu yağda hem de hekzan ve aseton özütlerinde vardır. Aktivitenin hem uçucu yağ içinde belirlenen bileşenlerden hem de bu özütlerde yukarıda bahsedildiği gibi polifenollerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

S. hortensis'de tüm özütlerde benzer değerler elde edilmiştir (Çizelge 3.3). Yine de apolar çözücüler kullanılarak özellikle de aseton kullanılarak yapılan özütlemenin daha uygun olduğu söylenebilir. Buradan şu sonucu çıkarabiliriz ki, konjuge dienlerin oluşumunu inhibe eden türler DPPH serbest radikal temizleyen türlerin tersine apolar bileşenlerdir.

Çizelge 3.4'de özütlerin BHT'ye eşdeğer antioksidan etkinlikleri verilmiştir. Bu çizelgeden *F. orientalis* için 84.84 değeri ile BHT'ye eşdeğer etkinlik yönünden en yüksek değeri UYSS özütü vermiştir. Buradan elde edilen sonuç ile Çizelge 3.3'deki sonuçlar uyusmaz gibi görünmesiyle beraber EA_{BHT} 'nin hesaplanmasında Çizelge 3.1'deki özüt verimleri hesaba katılmaktadır. Bu nedenle aktivite yönünden düşük olmasına rağmen verimi yüksek özütler de değerlendirilebilir. *S. hortensis*'de de *F. orientalis*'de olduğu gibi UYSS özütü 62.66 EA_{BHT} değeri ile en iyi eşdeğer antioksidan değerine sahip olan özüttür. Ancak yapılan işlemlerin bir ardışık özütleme tekniği olması nedeniyle, aynı materyalden elde edilen apolar özütlerin toplam EA_{BHT} etkinliklerini de hesaba katmak gerekir. Örneğin *S. hortensis*'da UY ve UYSA özütlerinin toplam EA_{BHT} değeri 32.70'e ulaşmaktadır. Kısacası antioksidan aktivitesi daha yüksek olan bir

özütün verimi düşük ise, EA_{BHT} değeri yüksek olabilir. Ancak seçilecek özütleme işlemi tamamen tercihe bağlıdır. Ya aktivitesi yüksek az verimli özüt ya da aktivitesi düşük verimi yüksek özütleme tercih edilebilir.

4.4. β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntemi

Antioksidan aktivitesinde uygulanan diğer bir test yöntemi de β -karoten renk açılım testi-spektrofotometrik yöntemidir. Bu yöntemde de diğer β -karoten yönteminde olduğu gibi β -karoten'in karakteristik sarı renginin korunumu esas alınmıştır. Bu yöntemde zaman bir ölçüt olarak alınmıştır. Belli sürelerde ölçülen absorbans değerleri zamana karşı grafiğe alındı ve sonuçlar *F. orientalis* ve *S. hortensis* için sırasıyla Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da sunulmuştur.

F. orientalis için Şekil 3.9'a bakıldığında da tüm özütler ve kontroller için belirli zaman aralıklarında absorbans değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Özütlerin ve kontrollerin tepkime karışımına ilavesi sonrası tüm örneklerin absorbans değerleri aynıdır. Zamana bağlı olarak aktivite olan özütlerin absorbansı önemli düşüş göstermezken, aktivite olmayan özütte ve boş kontrolde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. UYSA, HSAÖ ve MSÖ özütleri yakın absorbans değerleri gösterirken, HÖ ve UYSS özütlerinde benzer düşüşler gözlenmiştir. Buna göre, agar yönteminde elde edilen sonuçlarla uyumlu veriler elde edilmiştir. Yine antioksidan aktivite yönünden en uygun özütlemenin apolar çözücülerle özellikle de aseton ile sağlandığı söylenebilir. Özütlerin muhtemel içerikleri daha önce Bölüm 4.2'de ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Ancak gerek aktivite yönünden gerekse yüksek özüt verimi yönünden hekzan aseton sonrası metanol su özütünü de dikkate almak gerekir. 48 saat süre sonunda elde edilen verilerden anlamlılık testleri yapılarak UYSA, HSAÖ ve MSÖ arasında ve tüm özütler ve BHT arasında anlamlı fark olup olmadığı belirlenebilir. Yapılan anlamlılık testlerinde *F. orientalis*'in UYSA, HSAÖ ve MSÖ arasında anlamlı bir fark gözlenmezken [$t_{\text{deneysel}}(0.367) < t_{\text{kritik}}(2.78)$] bu özütlerle BHT arasında anlamlı farklar gözlenmiştir [$t_{\text{deneysel}}(17.59) > t_{\text{kritik}}(2.78)$].

S. hortensis için Şekil 3.10'a bakıldığında *F. orientalis*'in tersine, özütler arasında çok anlamlı farklar olmadığı görülmektedir. Bütün özütler pozitif kontrol BHT'ye göre yakın ve daha düşük değerler sergilemektedir. *S. hortensis*'in yapılan anlamlılık testlerinde UYSA özütü ile diğer özütler arasında anlamlı farklar gözlenmezken sadece UYSS özütü arasında anlamlı fark gözlenmiştir. [$t_{\text{deneysel}} (4.34) > t_{\text{kritik}} (2.78)$]. Ayrıca UYSA özütü BHT'den de anlamlı şekilde farklıdır. [$t_{\text{deneysel}} (16.97) > t_{\text{kritik}} (2.78)$]. Özütler kendi aralarında değerlendirildiğinde en iyi aktivite sergileyenin UYSA olduğu açıktır. En zayıf aktivite ise UYSS'da gözlenmiştir. Hekzan ve aseton kullanılarak hazırlanan özütlerdeki ana bileşenlerin uçucu yağ içeriğine benzerlik gösterdiği İTK çalışmalarıyla da gösterilmiştir (Şekil 3.11.b). Bu bileşenlerin yanı sıra yine flavonoid ve polifenolik bileşenlerin de olabileceği düşünülmektedir. Bölüm 3.5.1.2'de ayrıntılarıyla açıklanan İTK analizi ile kabaca flavonoid ve fenolik bileşiklerin varlığı gözlenmiştir. Ancak ayrıntılı analizler yapılamamıştır.

Agar ve spektrofotometrik yöntemler arasındaki küçük farklılıklar özütlerin uygulanan derişimden kaynaklanmaktadır. Agarda 1 g/L, spektrofotometride ise 2g/L'lik stoklar kullanıldı. Antioksidan aktivitenin derişime bağımlılığı ve görsel değerlendirme yapılması gözlenen farklılıkların kaynağı olabilir.

Antioksidanların bağıl etkinlikleri, antioksidanların etki tipine, test sistemine ve oksidasyon zamanına bağlıdır. Bu çalışmada da kullanılan test sistemlerinin etki tipine bağlı olarak her iki bitki türü içinde oldukça önemli aktivite sonuçları elde edilmiştir.

S. hortensis'in aktivitesi önceden biliniyor olmasına karşın *F. orientalis* için elde edilen sonuçlar ilk kez bu çalışmada rapor edilmektedir.

Sonuç olarak, antioksidan bileşenlerin seçimli olarak özütlenmesi için yukarıda ayrıntılı olarak tartışılan özütlenme yöntemleri genel hatlarıyla iki başlık altında toplanabilir. Serbest radikal temizlemede daha çok polar çözücülerle yapılan özütlenme yöntemi uygun görülmektedir. Lipit oksidasyonunun veya oksidasyon ürünlerinin engellenmesinde ise daha çok apolar çözücülerin kullanılması uygundur. EA_{BHT} değeri yönünde değerlendirildiğinde özütlenme işlemi tamamen tercihe bağlıdır. Ya aktivitesi yüksek az verimli özüt ya da

aktivitesi düşük verimi yüksek özütleme tercih edilebilir. Ancak burada yapılan genelleme sadece çalışılan bitki türleri için geçerlidir, diğer türler için farklı yöntemleri uygulamak gerekebilir.

Pek çok canlı türü reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan oksidatif türlere karşı kendilerini korumak için savunma sistemi geliştirmiştir. Son çalışmalar, oksidatif yıkıma karşı savunmada ve kanser, damar tıkanıklığı gibi farklı insan hastalıklarında ve yaşlanma sürecinde korunmada bitkilerin antioksidan özelliklerinin de etkin olacağını göstermektedir. Dolayısıyla hem *S. hortensis*'in hem de *F. orientalis*'in serbest radikal temizlemede gösterdikleri yüksek kapasite, bu türlerin kullanımında ne derece önemli olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bu bitkilerde belirlenen lipit oksidasyonu sonucu oluşan konjuge dienlerin engellenmesi yiyecek endüstrisinde koruyucu olarak kullanımına olanak sağlar. Aromatik bir bitki olan *S. hortensis*'in yaprakları ve çiçekleri hem taze hem de kurutulmuş olarak yiyecek endüstrisinde kullanılırken uçucu yağı, içecek sanayiinde ve parfümeride kullanılmaktadır. Bazı *F. orientalis* türleri eczacılıkta uyarıcı, kasılma önleyici ve balgam söktürücü olarak kullanılır (Duke, 2002). Özellikle doğal kaynaklı antioksidan türlerin geliştirilmesi ve kullanılması günümüzde önemli araştırma konuları arasında yerini alacaktır.

Ancak şunu da unutmamak gerekir ki antioksidanların yetersizliği gibi fazlalığı da organizmada hasara sebebiyet verebilir. Bu nedenle gerekli olan derişimlerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Ayrıca aynı bitkinin farklı bölgelerinden elde edilen veya farklı özütleme yöntemleriyle elde edilen aktivite aynı olmayabilir. Bu nedenle tüm bitki türleri bir bütün olarak değil, farklı yönleriyle ayrı ayrı değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Akaike, T.; Sato, K.; Ijiri, S.; Miyamoto, Y.; Kohno, M.; Ando, M.; Maeda, H. "Bactericidal Activity of Alkyl Peroxyl Radicals Generated by Heme-Iron-Catalyzed Decomposition of Organic Peroxides", *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 55-63 (1992).
- Baytop, T. "Genel Farmakognozi", İstanbul Üniversitesi Yayınları, (1986).
- Baytop, T. "Bitki Adları Sözlüğü", İstanbul Üniversitesi Yayınları, (1997).
- Bertelsen, G.; Christophersen, C.; Nielsen, P. H.; Madsen, H.L.; Stadel, P. "Chromatographic Isolation of Antioxidants Guided by a Methyl Linoleate Assay", *J. Agri. and Food Chem.*, 43 (5), 1272-1275 (1995).
- Burits, M.; Bucar, F. "Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil", *Phytother. Resear.*, 14, 323-328 (2000).
- Burits, M.; Asres, K.; Bucar, F. "The Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*", *Phytother. Res.*, 15, 103-108 (2001).
- Candan, F. "Serbest Radikaller ve Etki Mekanizmaları", Yük. Lis. Ders Notu (2001).
- Chen, Q.; Shi, H.; Ho, C-T. "Effects of Rosemary Extracts and Major Constituents on Lipid Oxidation and Soybean Lipoxygenase Activity", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 999-1002 (1992).
- Chevolleau, S.; Mallet, J. F.; Ucciani, E.; Gamisans, J.; Gruber, M. "Antioxidant Activity in Leaves of Some Mediterranean Plants", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 1269-1271 (1992).

- Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O. "Iridoid Glucosides With Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*", *Helv. Chim. Acta*, 80, 1144-1152 (1997).
- Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; van Beek, T. A.; Linssen, J. P. H. "Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania", *J. Sci. Food Agric.*, 77, 140-146 (1998).
- Davis, P.H. (Edt.) "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" Cilt: 7. University Press, Edinburgh (1965-1984).
- Dorman, H. J. D.; Surai, P.; Deans, S. G. "In vitro Antioxidant Activity of a Number of Plant Essential Oils and Phytoconstituents", *J. Essen. Oil Res.*, 12 (2), 241-248 (2000).
- Duke, J. A. "Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases", *Agri. Res. Serv.*, (2002).
- Fadel, H.; Marx, F.; El-Sawy, A.; El-Ghorab, A. "Effect of Extraction Techniques on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* Leaf Oils", *Food Res. and Technol.*, 208 (3), 212-216 (1999).
- Fowler, M. W. "Substrate Utilisation by Plant Cell Cultures", *J. Chem. Tech. and Biotec.*, 32, 338-346 (1982).
- Gutteridge, J.M.C.; Halliwell, B. "Free Radikals and Antioxidants in the Year 2000- a Historical Look to the Future", *Ann. N. Y. Acad.Sci.*, 899, 136- 147 (2000).

- Gülçin, İ.; Oktay, M.; Küfrevioğlu, Ö. İ.; Aslan, A. "Determination of Antioxidant Activity of Lichen *Cetraria islandica* (L) Ach", *J. Ethnophar.*, 79, 325-329 (2002).
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Aruoma, O. I. "The Deoxyribose Method: A Simple 'Test Tube' Assay for Determination of Rate Constants for Reaction of Hydroxyl Radicals", *Anal. Biochem.*, 165, 215-219 (1987).
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. "*Free Radicals in Biology and Medicine*", 2nd Ed., Clarendon Press, Oxford, 416-494 (1989).
- Halliwell, B. "How to Characterize a Biological Antioxidant", *Free Rad. Res. Commun.*, 9, 13-14 (1990).
- Kirby, A. J.; Schmidt, R. J. "The Antioxidant Activity of Chinese Herbs for Eczema and of Placebo Herbs –I.", *J. Ethnopharmacol.*, 56, 103-108 (1997).
- Kochan, E.; Wysokinska, H.; Chmiel, A.; Grabias, B. "Rosmarinic Acid and Other Phenolic Acids in Hairy Roots of *Hyssopus officinalis*", *Z. Naturforsch.* 54, 11-16 (1999).
- Koleva, I. I.; van Beek, T. A.; Linssen, J. P. H.; de Groot, A.; Evstatieva, L. N. "Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods", *Phytochem. Anal.*, 13, 8-17 (2002).
- Kramer, R. E. "Antioxidants in Clove", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 62, 111-113 (1985).
- Madsen, H. L.; Sorensen, B.; Skibsted, L. H.; Bertelsen, G. "The Antioxidative Activity of Summer Savory (*Satureja hortensis* L) and Rosemary

(*Rosmarinus officinalis*) in Dressing Stored Exposed to Light or in Darkness”, *Food Chem.*, 63 (2), 173-180 OCT (1998).

Mantle, D.; Anderton, J. G.; Falkous, G.; Barnes, M.; Jones, P.; Perry, E. K. “Comparison of Methods for Determination of Total Antioxidant Status-Application to Analysis of Medicinal Plant Essential Oils”, *Comp. Biochem. and Physio. B- Biochem. & Mol. Biol.*, 121,4, 385-391 (1998).

Moller J. K. S.;Madsen, H. L.; Aaltonen, T.; Skibsted, L. H. “Dittany (*Origanum dictamnus*) as a Source of Water- Extractable Antioxidants”, *Food Chem.*, 64 (2), 215-219 (1999).

Namiki, M. “Antioxidants/Antimutagens in Food”, *Crit. Rev. Food Sci. & Nutr.*, 29, 273-300 (1990).

Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. “Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay: A Comparative Study”, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3122-3128 (2002).

Pearson, D. A.; Frankel, E. N.; Aeschbach, R.; German, J. B. “Inhibition of Endothelial Cell-Mediated Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Rosemary and Plant Phenolics”, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 578-582 (1997).

Philipson, J. D. “Plants as Sources of Valuable Products. In Secondary Products from Plant Tissue Culture”, Edt. Charlwood, B .V. & Rhodes, M. J., Oxford, Clarendon Press 1-22 (1990).

Pokorny, J. “Natural Antioxidant for Food Use”, *Trends in Food Sci. Tech.*, 9, 223-227 (1991).

Ruberto, G.; Baratta, M. T. "Antioksidant Activity of Selected Essential Oil Components in Two Lipid Model Systems", *Food Chem.*, 69, 167-174 (2000).

Sawa, T.; Nakao, M.; Akaike, T.; Ono, K.; Maeda, H. "Alkylperoxyl Radical-Scavenging Activity of Various Flavonoids and Other Phenolic Compounds: Implications for the Anti-Tumor-Promoter Effect of Vegetables", *J. Agric. Food Chem.*, 47, 397-402 (1999).

Sökmen, A.; Gürel, E. "Bitki Biyoteknolojisi", Edt. Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. Bölüm 7, Sekonder Metabolit Üretimi. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya. , 211-261 (2001).

Svoboda, K. P.; Hay, R. K. M.; Waterman, P. G. "The Growth and Volatile Oil Yield of Summer Savory (*Satureja hortensis*) in a Cool Wet Environment", *J. Horticul. Sci.*, 65 (6) 659-665 (1990).

Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M. "Plant Drog Analysis", *Springer-Verlag*, (1984).

ÖZGEÇMİŞ

29/05/1977 Sivas doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Sivas'ta tamamladım. 1996 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandım ve Haziran 2000 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2000 Eylül ayında Cumhuriyet Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 2001 Ekim ayında Cumhuriyet Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Arş. Gör. Olarak göreve başladım. Halen Cumhuriyet Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde Arş. Gör. olarak çalışmaktayım.

