

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***ACHILLEA BISERRATA* VE *HYSSOPUS OFFICINALIS* TÜRLERİNİN
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ VE FENOLİK BİLEŞEN ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gönül HATİPOĞLU

**HAZİRAN 2010
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

***ACHILLEA BISERRATA* VE *HYSSOPUS OFFICINALIS* TÜRLERİNİN
ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ VE FENOLİK BİLEŞEN ANALİZLERİ**

Gönül HATİPOĞLU

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“Yüksek Lisans (Kimya)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07.06.2010
Tezin Savunma Tarihi : 21.06.2010**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ümmühan OCAK
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Rabiye TERZİ**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

“*Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* Türlerinin Antioksidan Aktiviteleri ve Fenolik Bileşen Analizleri” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenen, çalışmalarımın başlangıcından bitimine kadar çok değerli bilgi birikimlerini, destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’e, bitkilerden uçucu yağ ve özütlerin elde edilmesi sırasında yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e, uçucu yağların GC-MS analizlerini gerçekleştiren Atina Ziraat Üniversitesi (Agricultural University of Athens) Öğretim Üyesi Dr. Dimitra Daferera’ya, fenolik bileşenlerin analizleri sırasında yardımını gördüğüm Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN’e, yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Ersan BEKTAŞ, Mustafa CÜCE, İlknur TATLIDİL’e ve bana emeği geçen hocalarıma,

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, büyük emeği olan sevgili babam Hasan Basri HATİPOĞLU’na, annem Fatma HATİPOĞLU’na ve kardeşlerime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gönül HATİPOĞLU
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ	X
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Bitkisel Hammaddeler	5
1.3. <i>Achillea</i> Türleri ve Genel Özellikleri	6
1.4. <i>Hyssopus</i> Türleri ve Genel Özellikleri	8
1.5. Özütleme Teknikler	9
1.6. Antioksidan Maddeler ve Özütleme.....	9
1.7. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri.....	12
1.8. Fenolik Bileşikler.....	14
1.9. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Özütleme ve Kromatografisi	14
1.10. Flavonoidler	16
1.11. Proantosiyanidinler	16
1.12. Antosiyaninler.....	17
1.13. Amaç	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Yapılan Çalışmada Kullanılan Araç-Gereçler	19
2.2. Yapılan Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	19
2.3. Bitkisel Materyaller	19
2.4. Bitkilerin Toplanması ve Tanımlanması	20
2.5. Özütleme Elde Edilmesi	20
2.6. Antioksidan Aktivite Testleri	22
2.6.1. DPPH Yöntemi	23
2.6.2. β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem	23

2.7.	Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizleri...	24
2.8.	Fenolik Bileşen Analiz	25
2.8.1.	Toplam Fenol İçeriği	25
2.8.2.	Flavonoid Miktarının Belirlenmesi.....	26
2.8.3.	Proantosiyanidin Miktarının Belirlenmesi.....	26
2.8.4.	Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi	27
2.8.5.	HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi	28
3.	BULGULAR.....	29
3.1.	Özütler ve Verimleri	29
3.2.	Antioksidan Aktivite Test Bulguları.....	29
3.2.1.	DPPH Yöntem Bulguları	29
3.2.2.	β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem Bulguları	34
3.3.	Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi Analiz Bulguları	36
3.4.	Fenolik Bileşen Analiz Bulguları	40
3.4.1.	Toplam Fenol Miktarı	40
3.4.2.	Flavonoid Miktarı	42
3.4.3.	Proantosiyanidin Miktarı	44
3.4.4.	Antosiyanin Miktarı	46
3.4.5.	HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analiz Bulguları	47
4.	TARTIŞMA	52
5.	SONUÇLAR	63
6.	ÖNERİLER.....	66
7.	KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ		

ÖZET

Bu tez; Asteraceae familyasına ait *Achillea biserrata* M. Bieb ve Lamiaceae familyasına ait *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius* bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform ve su özütleriyle uçucu yağlarının *in vitro* antioksidan aktivitelerini araştırmak üzere tasarlanmıştır. Bunu takiben aktivite saptanan özütlerin toplam fenol, flavonoid, proantosiyanidin ve antosiyanin miktarları belirlendi. Tüm bitkilerin kurutulmuş çiçek ve yaprak karışımları farklı polaritedeki çözücülerle özütlendi ve özüt verimleri belirlendi.

Antioksidant aktivitenin ölçümünde iki farklı test metodu kullanıldı. Serbest radikal temizleme aktivitesi DPPH metodu ile, oksidasyonunun inhibisyonu ise β -karoten-linoleik asit yöntemi ile ölçüldü. Her iki yöntemde de sentetik antioksidan butillenmiş hidroksi toluen (BHT) pozitif kontrol olarak kullanıldı. DPPH yönteminde tüm su özütleri yüksek oranda radikal temizleyici etki gösterdi. β -Karoten yönteminde hekzan ve kloroform özütleri yüksek aktivite gösterdi. Zayıf aktivite sergilemesine rağmen uçucu yağların kimyasal içerikleri GC-MS ve GC-FID analizleri ile belirlendi.

Aktivite gösteren özütlerin fenolik içerikleri farklı yöntemler kullanılarak belirlendi. Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak özütlerin gallik asit eşdeğeri toplam fenolik içerikleri belirlenmiş olup *Achillea biserrata*'nın su özütünde % 3,39; *Hyssopus officinalis*'in su özütünde ise % 4,70 toplam fenol miktarı bulunmuştur. *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis*'in su özütlerinde flavonoid miktarları sırasıyla % 1,12 ve % 1,30 olarak bulunmuştur. *Achillea biserrata*'nın en fazla metanol-su özütünde (7125 mg/L), *Hyssopus officinalis*'in ise kloroform özütünde (10250 mg/L) proantosiyanidin bulundu. Her iki bitkinin antosiyanin miktarları en fazla kloroform özütlerinde bulunmuştur. *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis*'in fenolik bileşen türleri ve nicel miktarları HPLC yöntemiyle belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Achillea biserrata* M.Bieb, *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*, DPPH testi, β -karoten testi, GC-MS, toplam fenol, flavonoid, proantosiyanidin, antosiyanin.

SUMMARY

The Antioxidant Activities and Phenolic Compounds Analyses of *Achillea biserrata* and *Hyssopus officinalis* Species

This thesis is designed to investigate the *in vitro* antioxidant activities of the hexane, chloroform, water extracts and essential oils obtained from *Achillea biserrata* M. Bieb belong to Asteraceae and *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius* belong to Lamiaceae families. Following this total phenolic, flavonoid, proanthocyanidine and anthosiyamid constituents of the active extracts were determined. Aerial parts of dried plant materials were extracted employing solvents with different polarity and extract yields were determined.

Two different test methods were employed for the measurment of antioxidant activity. Free radical scavenging activity was measured with DPPH method and inhibition of the oxidation was measured with β -carotene-linoleic acid method. Synthetic antioxidant butylated hydroxy toluene (BHT) was used as positive control in both tests.

In DPPH method, water extracts exhibited high free radical scavenging action. However, in β -caroten-linoleic acid method hexane and chloroform extracts showed higher activity. Although essential oils exhibit low activity their chemical compositions were determined by GC-MS and GC-FID analysis.

Phenolic constituents of the extract which have antioxidant activity were determined by different methods. Gallic acid equivalent total phenolic constituents were determined by using Folin-Ciocalteu reagent and it was found that water extracts of *Achillea biserrata* (3.39%) and *Hyssopus officinalis* (4.70%) had higher total phenolics. Flanonoid content of *Achillea biserrata* and *Hyssopus officinalis* were found 1.12% and 1.30%, respectively. While methanol-water extract of *Achillea biserrata* had the highest proantocyanidin content (7125 mg/L), chloroform extract of *Hyssopus officinalis* was the highest (10250 mg/L). Antosiyanin amounts were high in chlorofom extracts of both plant species. Composition and the quantification of the phenolic compounds were determined by HPLC.

Key Words: *Achillea biserrata* M.Bieb, *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*, DPPH test, β -caroten test, GC-MS, total phenolic content, flavonoid, proantocyanidin, anthosiyandin.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Farklı pH'lardaki antosiyaninlerin yapısal değişimleri.....	27
Şekil 2. DPPH yönteminde <i>Achillea biserrata</i> 'nın kloroform özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri	30
Şekil 3. DPPH yönteminde <i>Achillea biserrata</i> 'nın su özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri	30
Şekil 4. DPPH yönteminde <i>Achillea biserrata</i> 'nın metanol- su özütü derişimine karşı %inhibisyon değerleri	31
Şekil 5. DPPH yönteminde <i>Hyssopus officinalis</i> 'in kloroform özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri	31
Şekil 6. DPPH yönteminde <i>Hyssopus officinalis</i> 'in su özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri	32
Şekil 7. DPPH yönteminde <i>Hyssopus officinalis</i> 'in metanol- su özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri	32
Şekil 8. DPPH yönteminde <i>Achillea biserrata</i> 'nın özütleri ve BHT' nin IC ₅₀ derişimleri	33
Şekil 9. DPPH yönteminde <i>Hyssopus officinalis</i> 'in özütleri ve BHT' nin IC ₅₀ derişimleri	33
Şekil 10. <i>Achillea biserrata</i> özütleri ve BHT' nin % BAA değerleri	35
Şekil 11. <i>Hyssopus officinalis</i> 'in özütleri ve BHT'nin %BAA değerleri	35
Şekil 12. <i>Achillea biserrata</i> uçucu yağının ana bileşenlerinin % miktarları.....	38
Şekil 13. <i>Hyssopus officinalis</i> uçucu yağının ana bileşenlerinin % miktarları	40
Şekil 14. Gallik asit derişim absorbans grafiği	41
Şekil 15. <i>Achillea biserrata</i> özütlerinin % toplam fenol miktarları	41
Şekil 16. <i>Hyssopus officinalis</i> özütlerinin % toplam fenol miktarları	42
Şekil 17. Kuarsetin derişim absorbans grafiği	43
Şekil 18. <i>Achillea biserrata</i> özütlerinin % flavonoid miktarları	43
Şekil 19. <i>Hyssopus officinalis</i> özütlerinin % flavonoid miktarları	44
Şekil 20. <i>Achillea biserrata</i> özütlerinin proantosiyanidin miktarları.....	45
Şekil 21. <i>Hyssopus officinalis</i> özütlerinin proantosiyanidin miktarları	45
Şekil 22. <i>Achillea biserrata</i> özütlerinin antosiyanin miktarları	46
Şekil 23. <i>Hyssopus officinalis</i> özütlerinin antosiyanin miktarları.....	47
Şekil 24. HPLC 280 nm' deki fenolik standart pikleri.....	47

Şekil 25. HPLC 315 nm' deki fenolik standart pikleri	48
Şekil 26. <i>Achillea biserrata</i> ' nın 280 nm' deki kromatogramı	48
Şekil 27. <i>Achillea biserrata</i> ' nın 315 nm' deki kromatogramı	49
Şekil 28. <i>Hyssopus officinalis</i> 'in 280 nm' deki kromatogramı	49
Şekil 29. <i>Hyssopus officinalis</i> 'in 315 nm'deki kromatogramı	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Bitkilerin lokaliteleri ve toplanma zamanları	20
Tablo 2. Ekstraksiyon Parametreleri	22
Tablo 3. <i>Achillea biserrata</i> , <i>Hyssopus officinalis</i> özütleri ve verimleri	29
Tablo 4. <i>Hyssopus officinalis</i> 'in artan uçucu yağ hacimleri için % inhibisyon değerleri ve bu hacimlere karşılık gelen derişimler	34
Tablo 5. <i>Achillea biserrata</i> 'nın uçucu yağ bileşenleri	37
Tablo 6. <i>Hyssopus officinalis</i> 'in uçucu yağ bileşenleri	39
Tablo 7. <i>Achillea biserrata</i> ve <i>Hyssopus officinalis</i> 'in fenolik bileşen içerikleri	50

SEMBOLLER DİZİNİ

BAA : Bağlı Antioksidan Aktivite

BHT : Butillenmiş hidroksi tolueen

DPPH : 2,2-difenilpikrilhidrazil

DF : Seyreltme faktörü

MW : Moleküler ağırlığı

% IC₅₀ : Yüzde elli inhibisyon

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Canlıların temel besin gereksinimlerini karşılayan bitkisel kökenli karbohidratlar, protein ve yağlar birincil kaynaklardır. Bunun yanı sıra bitkisel kaynaklardan selüloz, zambak 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). Bitkiler bu bağlamda tam anlamıyla canlı “organik kimya fabrikalarıdır”.

Bitkiler doğal yaşam ortamlarında çok çeşitli düşmanlarla kuşatılmış durumdadır. Bitkilerin, düşmanlarından kaçmak için yer değiştirmeleri söz konusu olmadığına göre, birtakım özel savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunlardan birisi de ürettikleri özel kimyasallardır. İnsanoğlu ise, bu özellikten faydalananarak, tarihin ilk yıllarından günümüze kadar çok sayıda bitkiyi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmıştır. Bu yaklaşım *etnofarmakoloji* adı verilen bir disiplinin oluşmasına yol açmıştır. Özellikle bitkilerin iyileştirici etkilerinin bulunduğu inancı insanlığın çok eski devirlerine kadar gitmektedir. Erişilebilen ilk yazılı kaynaklardan elde edilen bilgilere göre ilk insanlar, çeşitli hastalıkların tedavisi için bitkilerden yararlanmışlardır. Kullanım biçimleri ise asıl etken madde olan doğal ürünlerden çok, bitkinin kendisine veya değişik yollarla elde edilen özütlerine dayanmaktaydı (Tepe, 2002; Ceylan, 1995). Yontma taş (paleolitik) çağından (M.Ö. 50000–7000) günümüze kadar Anadolu’da yaşamış olan “Anadolu insanı” çevresindeki bitkilerden yararlanmıştır. Bunları gıda, yakacak, silah, ilaç veya mesken yapımı için kullanmıştır. Hakkari’nin güneyinde yer alan Sanıdar Mağarası’nda ortaya çıkartılan 50000 yıllık Neanderthal mezarı içinde bulunan ve halen bu bölgede, tıbbi amaçlı kullanılan bitki örnekleri (*Achillea*, *Alchemilla*, *Althea*, *Centaurea*, *Ephedra*, *Muscari* ve *Senecio* türlerine ait örnekler) bu varsayımın sağlam kanıtlarındandır (Baytop, 1989; Lietava, 1992; Baytop, 1999). Tüm dünyada bitkisel ilaçlarla tedavi giderek artmakta ve şimdiye kadar görülmemiş bir popülerite kazanmaktadır (Teixeira vd., 2003)

Bu uygulama özellikle gelişmiş ülkelerde daha yaygındır (Çubukçu vd., 2002). Bitkisel ilaçlara yönelmenin başlıca nedenleri:

- Yeterli düzeyde kimya endüstrileri gelişmemiş, kalkınma yolundaki ülkelerin, bitkilerden yararlanarak kolay ve ucuz bir tedavi olanağı elde etmeleri,
- Tedavi alanına sokulan yeni sentetik bileşiklerin bazılarında görülen tehlikeli yan etkiler (bitkisel droglar çok uzun zamandan beri kullanıldıkları için yan etkileri çok iyi bilinmektedir),
- Bazı ilaç etken maddelerinin, bitkisel drogların sentetik olanlardan daha ucuz ve daha kolaylıkla elde edilebilmeleri,
- Bitkisel drogların birkaç etkiye birden sahip olmaları, buna karşın sentetik bileşiklerin ise genellikle tek bir etkiye sahip olmaları,
- Bazı sentetik ilaçların (antibiyotikler gibi) yan etkilerini önleyebilmek için diğer bazı ilaçlarla birlikte kullanılma ihtiyacı göstermeleri (Baytop, 1999).

Günümüzde dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler, ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun % 80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse toplam dünya nüfusunun % 64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (Farnsworth, 1990).

Önceleri sekonder metabolitler, bitkiler tarafından oluşturulan ve hiç bir işlevi olmayan atık maddeler olarak kabul edilmekteydi. Fakat daha sonra sekonder metabolitlerin; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş karmaşık mekanizmaların kimyasallar olduğu anlaşılmıştır (Philipson, 1990). 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 sanayinde hammadde olarak kullanılmasını sağlamıştır.

İlaç sanayinde 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, geranial ve neral gibi bileşikler tatlandırıcı, koku verici ve koruyucu olarak besin ve gıda sanayinde kullanılan bitkisel kökenli maddelerdir. Gül yağı, lavanta yağı, yasemin yağı, parfümeride kullanılırken; nikotin, anakardik asit, piretrin, sinerin ve

yasmolin zirai mücadelede kullanılan maddelerdir. Halk arasında “kocakarı ilaçları” olarak bilinen bitkilerden yeni ilaçlar geliştirilmesinde, etnofarmakoloji biliminin önemli katkısı olmuştur. Vinkristin, vinblastin, rezerpin, kinin ve hatta aspirin, ekonomik ve sağlık açısından bugünkü önemlerini bu araştırmalara borçludurlar (Cox, 1990).

Bitkisel kökenli moleküller tedavide kullanılırken, her maddenin yararlı fizyolojik etkilerinin yanı sıra toksik bir etkisinin de bulunabileceği unutulmamalıdır. Basit bir örnek olarak atropini göz önüne aldığımızda aslında son derece zehirli bir madde olmasına karşın, tedavilerde önemli bir ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır (Yeşilada, 2002). Bu yüzden bitkisel ilaçların ve uygulamalarını iyi anlayabilmek için onların botaniklerinin, kimyasının, farmakolojisinin, toksikolojisinin ve klinik etkilerinin iyi bilinmesi gerekmektedir (Çubukçu, 2002).

Anadolu’da tarih boyunca bitkilerin yaygın kullanımının nedeni şüphesiz ki bu bölgenin sahip olduğu fitocoğrafik özelliklerin bir sonucudur. Çeşitli iklim tiplerinin etkisinde bulunması ve sahip olduğu coğrafik konum, Anadolu’daki flora çeşitliliğinin oluşumunda en önemli etkenlerdir (Başer, 2000).

Özütlerden hazırlanan merhemlerin mikrop öldürücü ve yara iyileştirici etkisi, bitkilerin tedavi edici özellikleri bakımından akla gelen önemli ve tarihi işlevleridir. Troya savaşında yaralanan Aşil ve askerlerinin tedavisi için kullanılan *Achillea* (civanperçemi) türleri için de geçerlidir (Könemann, 1999 ve Lis-Balchin, 2006).

Yara iyileştirici ve mikrop öldürücü aktivite, büyük ölçüde, kokulu (aromatik) bitkilere dayanır. Bu özellik *aromaterapi* adı verilen tedavinin önemli bir bölümünü oluşturur. Aromaterapi çok çeşitli bedensel ve ruhsal hastalıkların tedavisi için kullanılan tarihi yöntemler bütünüdür ve bu amaçla uçucu yağ içeren bitkilerden yararlanılır.

Uçucu, aromatik ya da eterik yağ “oda sıcaklığında sıvı, bazen donabilen, buharlaştığında damlatıldığı kağıt üzerinde leke bırakan ve bitkilerden su buharı veya su distilasyonu ile elde edilen, kokulu karışım” olarak tanımlanabilir (Tanker vd., 1990). Açıkta bırakıldıklarında buharlaşabildiklerinden dolayı “uçucu ya da eterik yağ” adı ile anılırlar. Ayrıca genellikle güzel kokulu olduklarından bunlara “esans” da denilmektedir İlk kez İsveçli Paracelsus von Hohenheim tarafından “*Quintia essentia*” olarak adlandırılmıştır (Guenther, 1948). Ancak uçucu yağın elde edilmesinde kullanılan distilasyon yöntemi yaklaşık 2000 yıl öncesinde, Mısırlılar, Persler ve Hintliler tarafından kullanılmıştır (Bauer, 2001). Avrupa da distilasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ise Paracelsus’un uçucu yağ tanımıyla başlar (Guenther, 1948).

Bitki kimyasalları arasında yer alan uçucu yağlar uzun yıllardan beri tedavide kullanılan droglar arasında yer almaktadır. Halk tıbbında kullanılma amaçları esas alınarak bu droglar üzerinde yapılan farmakolojik araştırmalar sonucunda biyolojik etkilerinin bazıları bilimsel olarak da açıklanmıştır (Çubukçu vd., 2002). Uçucu yağ farmakoloji de, eczacılıkta, fitopatolojide, tıbbi ve klinik mikrobiyolojide, koruyucu madde olarak da yiyeceklerde kullanılmaktadırlar (Magiatis, 2002). Bu özelliklerinden dolayı birçok tıbbi bitki arasına uçucu yağ taşıyan bitkilerde girmiştir. Uçucu yağların iritan (uyarıcı), rubefiyen (deriyi kızartan), nervinatik (sinir yatıştırıcı), antiromatizmal, ekspektoran (balgam söktürücü), antitussif (öksürüğü kesen), diüretik (idrar söktürücü), karminatif (gaz giderici), stomasik (midevi), koleretik (safra sökücü), antihelmentik (solucan düşürücü), antienflamatuar, antiseptik, antibiyotik ve sedatif etkileri tespit edilmiştir (Sakar ve Tanker, 1992; Zeybek, 1985; Ceylan, 1987). Çiçekli bitkilerin bulunduğu bazı familyalarda çok sayıda türün uçucu yağ içerdiği iyi bilinmektedir. Önemli uçucu yağ taşıyan familyalar *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Coniferae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae*,’ dir (Sakar ve Tanker, 1992; Zeybek, 1985; Ceylan, 1987).

Uçucu yağlar parfüm ve kozmetik, gıda, meşrubat ve ilaç sanayinde ham madde olarak değerlendirilmektedir (Hammer, 1999; Zeybek vd., 2002). Günümüzde uçucu yağların ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik yönden önem taşımaktadır. Uçucu yağ ve bileşenlerinin farmakolojik özellikleri incelenerek tıp, kozmetik ve endüstriyel alanlarda kullanılabilme olanakları güncelliğini korumaktadır (Kırdağ ve Bağcı, 2000). Aromatik taksonlar içinde yer alan *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae* ve *Rosaceae*, gibi bazı familyalara ait türlerde bulunduğu bilinen uçucu yağlar, yaygın olarak çalışma konusu olmuşlardır (Kırdağ ve Bağcı, 2000).

Lamiaceae türlerinin ürettiği “terpen” sınıfına giren kimyasallar bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların ana bileşenidir. Ancak bu bitkilerin ürettiği ekonomik açıdan değerli bileşikler uçucu terpenlerle sınırlı değildir. Uçucu olmayan diterpenler; karnosik asit, karnozol ve türevlerinin güçlü antioksidatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. (Frankel vd, 1996).

Fenolik bileşikler adı verilen kimyasallar da bitkilerin ürettiği ve esasen patojen, böcek ve herbivor saldırılarına karşı savunma amaçlı üretilen ürünlerdir (Taiz ve Zeiger, 2002). Labiyatik asit ve diğer fenolik asitler, flavonoidler ve polifenoller, *Lamiaceae* türlerinde sıklıkla rastlanan nutrasotik ve biyoaktif kimyasallardır (Exarchou vd., 2002;

Mastelic ve Jerkovic, 2003). Bu grup bileşikler ayrı başlıklar alt başlıklar altında ilerleyen kısımlarda verilmiştir.

1.2. Bitkisel Hammaddeler

Aşağıda sıralanan etkin türler sentetik olarak üretilebildiği gibi çoğunlukla da bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. 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. Karbohidratlar: 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. Alkaloidler: Bünyesinde azot bulunan, bazik karakterli bitkisel maddelerdir. Bir bitkide tek bir alkaloidin bulunuşu nadirdir. Genel olarak bitkide, bünyece birbirine oldukça yakın, bir grup alkaloid bulunur. Alkaloidler 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. Reçineli Maddeler: Karmaşık kimyasal bünyeli, sıvı, katı ve genellikle amorf maddelerdir. Suda çözünmezler fakat etanol, eter ve kloroformda kısmen ya da tamamen çözünürler. Genellikle bitkilerde özel salgı kanalları ve ceplerinde bulunurlar.

10. 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 hazırlanmaktadır.

11. Antibiyotikler: Canlılar tarafından meydana getirilen ve çok seyreltik çözeltilerde bile bazı mikroorganizmaları öldüren ve çoğalmalarını önleyen maddelerdir.

12. Uçucu Yağlar: Uçucu yağlar hemen hemen bütün kokulu bitkilerden distilasyonla izole edilebilen, genellikle oda sıcaklığında sıvı (sıvı olmayanları da vardır, gül yağı, anason yağı gibi) ve yeni distile edildiğinde çoğunlukla renksiz, yağ kıvamında, uçucu karışımlardır. Petrol eteri, kloroform, benzen, eter, etanol ve sabit yağlar gibi lipofilik çözücülerde kolayca çözülür. Sudaki çözünürlüğü az (1/200 veya daha az oranda), kaynama noktaları yüksektir (150-300 °C). Yoğunlukları 0.84 ile 1.18 g/mL arasında değişir, yağların çoğu sudan hafiftir, bazıları ise (tarçın yağı, karanfil yağı gibi) sudan ağırdır. Aromatik ve tıbbi bitkilerin uçucu terpen hidrokarbonları (alifatik, siklik) ile onların yerini tutan oksijenli izoprenoid türevleri ve analogları geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Bu maddelerin karışımları uçucu yağ olarak bilinmektedir (Magiatis, 2002). Çeşitli bileşiklerin karışımları olan uçucu yağların % 90'ı terpenlerdir. Uçucu yağlar başlıca monoterpen, seskiterpen ve diterpenlerden meydana gelmektedir (Başer, 2002). Diğer bileşikler ise fenilpropen türevleri, basit fenoller ve onların eterleri, fenol karbonik asitler, dallanmamış hidrokarbürler ve bunların türevleri, kısa zincirli asitler, kükürt içerikli bileşikler ve azot içeren bileşiklerdir (Sakar ve Tanker, 1991). Uçucu yağların drogdaki miktarları çok değişiktir. Tipik uçucu yağ içeren droglar en az % 0.01, genellikle % 1–2, uçucu yağ taşırlar.

1.3. *Achillea* Türleri ve Genel Özellikleri

Asteraceae (Compositae) kozmopolit bir familyadır fakat daha çok ılıman ve subtropik bölgelerde yaygındır (Takhtajan, 1997). 1100'den fazla cinsi ve 23000'den fazla türü ile çiçekli bitkilerin en büyük familyasıdır. Ülkemizde 133 cinsi ve 1156 kadar türü bulunur. Çoğu seskiterpen içerir. Türleri genellikle her dem yeşil, çalı, yarı çalı veya çok

yıllık otsudur (Heinrich vd., 2002; Seçmen vd., 1995; Baytop 1972). *Asteraceae* familyasına ait yedi cins ki bunlardan *Achillea*'nın yedi, *Anthemis*'in altı türü olmak üzere toplam 20 türü, halk ilacı olarak kullanılmaktadır (Kınmer, 1999). *Achillea* 120'ye yakın türüyle yabani olarak yetişen ve tıbbi bitki familyaları arasında yer alan *Asteraceae*'nin önemli bir cinsidir (Trifunovic vd., 2003; Palic, 2000; Güner, 2001). Kuzey yarımkürede geniş bir dağılım gösterir (Karamenderes ve Apaydın, 2003; Kubelka vd., 1999). Ilıman kuşakta da yetişir (Trifunovic vd., 2003), Akdeniz iklim bölgelerinin tipik bitkisidir (Magiatis, 2002). Avrupa ve Asya'da yaklaşık 85 ve kuzey Amerika'da ise birkaç tür ile temsil edilir (Könemann, 1999). Türkiye florasında 42 türü bulunmaktadır ve bunların 23'ü endemiktir. (Huber-Morath 1975; Duman, 2000). *Achillea* türleri tedavi edici özelliklerinin yanında çiçeklerinin güzelliği ile de dikkatleri çekmiştir. Bu özelliklerinden dolayı kültür ve süs bitkiciliği konularında ekonomik açıdan oldukça önemlidirler (URL-1).

Halk arasında 'civanperçemi' olarak tanınır (Baytop, 1999). Cinsin farklı türlerinin toprak üstü kısımları, birçok tıbbi özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Günümüzde de hala yara iyileştirici özelliğinden dolayı halk arasında tedavide kullanılmaktadır (Könemen, 1999). Yapılan kimyasal çalışmalar sonucunda *Achillea* uçucu yağlarının monoterpen (Skocibusic vd., 2004), seskiterpen (Palic, 2000; Glasl,1999), alkan (Palic, 2000), germakren ve flavonoidlerden (Palic, 2000; Vieira vd., 1997) meydana geldiği saptanmıştır. *Achillea* cinsine ait birçok türler flavonoidler içerir: flavonoller ve flavonlar ve onların türevleri. *Achillea* (Yarrow) türleri, tüm dünyada binlerce yıldır etnofarmakoloji de kullanılmıştır (Nemeth ve Bernath, 2008) Bu bitkilerin toprak üstündeki bazı kısımları, uçucu yağları ve ekstraktları farmakolojide, kozmetikte, solunum, sindirim, üreme, boşaltım ve dolaşım sistemleri düzensizliklerinde kullanılmaktadır (Magiatis, 2002). Çeşitli *Achillea* türleri; Kronik hazımsızlık, gastrit, gastrik ve duodenal ülser, anoreksia (kilo kaybı), gibi sindirim sistemi düzensizliklerinde, sindirim sistemi mukozası için genel bir tonik ve gaz giderici, kan basıncını düşürücü olarak, mensurasyon periyodunun düzenlenmesinde, üriner sistemde meydana gelen tüm enfeksiyonlarda, böbrek ve mesanede antiseptik olarak ayrıca hemoroit tedavisinde, soğuk algınlığı ve grip gibi üst solunum yolu enfeksiyonlarında; öksürük, ateş ve fazla mukus salgılanmasının giderilmesinde, iltihaplı ağır yaraların iyileştirilmesinde ve enfeksiyon veya kaşıntı gibi bazı durumlarda göz gibi organların temizlenmesinde cilt yıkayıcı olarak kullanılmaktadır (Glasl vd., 2001; Acartürk, 1997). Literatüre göre farmakolojik etkileri esasen uçucu yağ, proazulen ve diğer seskiterpen laktonların dikafeoliquinik asit ve flavonoidler nedeniyle

(Nemeth ve Bernath, 2008). Irak'daki paleontolojik analizler sırasında araştırmacılar *Achillea* türü çiçekler buldu ve bunların yüzyıllar boyunca iyileştirici etkilerinin iyi olarak bilindiği sonucuna vardılar (Ceylan, 1995). Onların kullandığı yazılı dökümanlar orta çağın eski kitaplarında gözükmektedir *Achillea* üyeleri arasından en çok bilinen tür *A. millefolium* (civanperçemi)'dur. Gerek ekonomik değeri gerekse iyileştirici özelliklerinden dolayı uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonu ve antimikrobiyal aktivitesi en fazla çalışılmış olan türdür (Baytop, 1999; Candan vd., 2003; Başer vd., 2001)

Achillea uçucu yağlarının çoğu 1,8-sineol, kamfor ve borneol den fazla miktarda içermektedir (Yeşilada, 2002; Çubukçu,2002). Maffei ve arkadaşları 10 *Achillea* türünün uçucu yağ kompozisyonlarını GC/MS analizi ile belirlemişlerdir. Söz konusu türlerin uçucu yağlarının temel bileşen analizleri sonucunda, bu türlerin orijinleri ile ilgili bir ayırım sunmuşlardır (Maffei vd, 1994). *Achillea biserrata*'nın toprak üstü kısımlarından % 0,07 verim elde edilmiş ve *Achillea* türünün uçucu yağ kompozisyonlarını GC/MS analizi ile belirlemişlerdir. Türlerin analizi sonucunda *Achillea biserrata* uçucu yağı *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niger*'e karşı *A. salicifolia*'dan daha yüksek aktivite göstermiştir (Azaz vd., 2004).

1.4. *Hyssopus* Türleri ve Genel Özellikleri

Hyssopus officinalis'in ait olduğu *Lamiaceae* familyası önemli uçucu yağ taşıyan familyalardan biridir (Barbour vd., 2004; Zeybek vd., 1985; Ceylan, 1987). Asya, Avrupa ve Amerika'nın sıcak bölgelerinde yetişir. Türkiye florasında bir grup tarafından bu cins temsil edilmektedir, *Hyssopus officinalis* L. (Davis, 1982). Ülkemizde de yetişen 'zufaotu', 50-120 cm boylanabilen, çok yıllık, kokulu, çalimsı bitkidir. *Hyssopus officinalis* yüzlerce yıldır şifalı bitki ve yemeklik olarak bilinmektedir. Bronşit, öksürük, boğaz ağrısı ve kronik nezlede, yaralarda, ülser ve tumor tedavilerinde kullanılır (Simon vd., 1984; Bown, 1995). Modern tıpta genel soğuk algınlığına eşlik eden solunum sisteminin hafif tahrişi için uygun etkili tedavi olarak *Hyssopus* düşünülmüştür (Tyler, 1993). Ayrıca uçucu yağı, çoğunlukla gıda, farmakoloji ve kozmetik endüstrisinde kullanılır. Bileşiminde %1 oranında uçucu yağ, ayrıca flavonid, glizit, diosmin ile tanen bulunan ve uzun yıllardan beri yararları bilinen zufaotu, günümüzde bazı yemeklere koku ve çeşni katmak üzere küçük miktarlarda eklenir (URL-2).

1.5. Özütleme Teknikleri

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

1. Kaynar alkol metodu: 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 metodu: Taze ve kuru materyalin belli bir süre boyunca metanol buharı ile tüketilmesi 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 özütlemesi: 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.

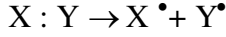
1.6. Antioksidan Maddeler ve Özütlenmesi

Antioksidanların, hücrelerin normal solunumu sırasında yan ürünü olarak oluşan reaktif oksijen türlerine (ROS) 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.

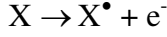
Yukarda belirtilen serbest radikallerin yanı sıra alkil peroksi radikali (ROO[•]), alkoksil radikali (RO[•]), tiyol radikalleri (RS[•]), karbon merkezli radikaller de mevcuttur.

Serbest radikaller üç yolla meydana gelir.

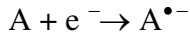
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi,



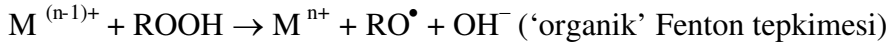
2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi.



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 olduğu rapor edilmiştir (Akaike vd., 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 önemli etkileri vardır. Zira hücresel metabolik faaliyetler sürekli zararlı serbest radikaller üretir ve bu radikalleri bertaraf edecek hücresel mekanizmalar mevcuttur. Ancak bu savunma mekanizmasının da bir kapasitesi vardır. Kapasite aşıldığında oksidatif stres açığa çıkar. Nihayetinde serbest radikaller reaktif oksijen türevleridir ve lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, protein ve karbohidratların oksidasyonuna yol açacak

hücresel yaşlanma, kanser, inflamasyon, romatoid artrit'e yol açmakta ve hatta hücre ölümü gerçekleşmektedir (Mantle vd., 1998; Eryılmaz, 2001). Dolayısı ile dış kaynaklı antioksidanlarla bu savunma mekanizmasını güçlendirme gereği duyulur.

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

- a. Süpürücü/Temizleyici (Scavenging) 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. Söndürücü (Quencher) 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. Zincir kırıcı (Chain breking) etki gösterenler: Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilmektedir.
- d. Tamir edici (Repair) etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri, metionin sülfoksid redüktaz sayılabilir.

Antioksidan maddeler serbest radikallerin neden olduğu bu zararlı etkilere karşı oksidasyonun çeşitli aşamalarında, yukarıda özetlenen mekanizmalar yoluyla koruyucu özellik gösteren maddelerdir. Günümüzde, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) gibi besin endüstrisinde ticari olarak kullanılan çeşitli sentetik antioksidan maddeler mevcuttur. Ancak bu sentetik antioksidanların olumsuz sağlık sorunlarını tetiklediğine dair bilgiler bulunmaktadır (Koleva, 2002; Namiki, 1990; Pokorny, 1991). Örneğin bu kimyasalların akciğerde hasara, karaciğerde nekroz ve kanamaya bağlı ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (Candan ve Sökmen, 2004). Bu kısıtlayıcı nedenlerden dolayı sentetik antioksidan ajanların yerini alabilecek doğal antioksidan maddeler ile ilgili araştırmalarda bitkiler çok önem kazanmıştır. Bitkisel kökenli antioksidanlar genellikle fenolikler sınıfında toplanır ve bu kimyasalların antioksidan etkileri redoks özelliklerine dayanır. Bu yüzden indirgeyici ajanlar, hidrojen vericiler, tekli oksijen önleyiciler ve metal şelat yapıcılar olarak etki ederler. Bitki fenolikleri, fenolik asitler, fenil propanoitler, monoterprenik fenoller, flavonoidler, tanenler, vs. gibi maddelerdir (Başer, 2004).

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 vd., 2002). Bazı yiyecek ve sebzeler antioksidan maddelerin en önemli kaynaklarıdır. Bitkisel materyalden uygun yöntemlerle antioksidan bileşenler etkin bir şekilde ayrılabilir.

Bazı yazarlar, farklı çözücüler ve özütleme teknikleri kullanıldığında antioksidan aktivitede farklılıklar olduğunu göstermiştir. 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.

1.7. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

In 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 kalitatif ve kantitatif olarak gösteren pek çok yöntem mevcuttur. Bu tür testlerin yapılmasında uygulanmak üzere yeni yöntemler de geliştirilmiştir (Halliwell vd., 1987, 1989, 1990; Ou vd., 2002).

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

Kararlı organik radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH $\cdot$) tekli bileşenler, bitki özütleri ve yiyecek maddeleri antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Koleva vd., 2002). Yöntem, DPPH $\cdot$ 'ın alkolde hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidan madde varlığında radikal olmayan DPPH-H' a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. DPPH $\cdot$ 'nin 517 nm'deki

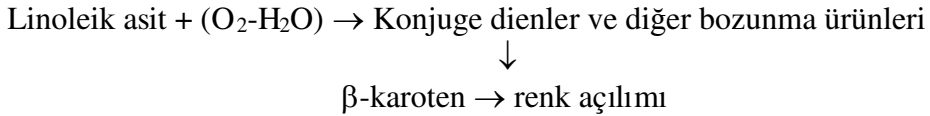
soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilebilir:



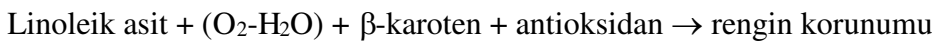
Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan $\text{DPPH}^\bullet$ derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalının rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesi olarak gösterilir. Metot hızlıdır, 30 dakikalık analiz süresi ve insan gücü açısından kolay çok özel cihaz ve reaktifler gerektirmediginden dolayı da tercih edilir.

Literatürde antioksidan aktivitelerin belirlenmesinde birden fazla yöntemin uygulanması gerekliliğı belirtilmektedir (Ou vd., 2002; Ruberto vd., 2000; Mantle vd., 1998). β -karoten renk açılımı yöntemi, önerilen diğer yöntemler arasındadır.

β -karoten renk açılımı yönteminde linoleik asit ve oksijenle doymun 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 antioksidan tür tarafından temizlendiğinden β -karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.



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

1.8. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler fenil alanından türetilen sekonder metabolitlerin büyük bir grubunu oluşturur (Mann, 1987; Harborne, 1994). Fenolik bileşikler meyvelere ve yapraklara renk katma, böcek çekici veya itici olma, antimikrobiyal hareket, antiviral aktive, zararlı ultraviyole radyasyondan koruma ve otçul hayvanlardan korunma görev yaparlar (Harborne, 1967; Macheix vd., 1990; Harborne ve Williams, 2000). İnsan tüketimi için bir bitkinin potansiyeli değerlendirilirken bu tür bileşiklerin potansiyel antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşimlerine bakılır. Bir bitkinin fenolik bileşimi genellikle bitki türlerine özgüdür ve büyüme iklimiyle değişebilir (Manach vd., 2004). Bazı fenolik bileşikler sinerjik etki olarak adlandırılan karşılıklı etkileşime girerek toplam antioksidan aktiviteyi artırır. Kimyasal olarak, fenolik bileşikler aromatik halkada bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bileşiklerdir (Harborne, 1967; Macheix vd., 1990; Shahidi ve Naczk, 1995).

Bitkilerde 8.000 'den fazla fenolik bileşik bulunur (Wrolstad, 2005) ve bitkilerdeki başlıca fenolik bileşikler fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Macheix vd., 1990; Robbins, 2003). Bitkilerdeki fenolik asitler çoğunlukla hidroksinamik ve hidroksibenzoik asitlerin türevlerinin yerini almaktadır.

1.9. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Özütlenmesi ve Kromatografisi

Fenolik bileşiklerin pek çoğu bitkilerde vakullerde yer alır ve genellikle alkoller veya diğer organik çözücülerle özüt edilir. Genellikle bir ekstraksiyon sisteminde fenolik bileşiklerin depolama sırasında enzimatik bozunma ve polimerazasyona uğrayacağı olasılığından dolayı kurutulmuş veya dondurulmuş halde ekstre edilir (Price vd., 1997). Ekstraksiyon çözücüsü materyale doğrudan eklenir, parçalama ve homojenizasyon yapılarak bulamaç haline getirilir. Bu işlemler sırasında ekstraksiyon oranını artırmak için ultrasonik ortamda yapılabilir. Bunun dışında perkolasyon veya sokslet ekstraksiyonunda kullanılabilir (Cimpan ve Gocan, 2002). Fenolik bileşiklerin çözünürlüğü kullanılan çözücünün polaritesine bağlıdır. Genellikle %60-80 (v/v) oranında sulandırılmış aseton, etanol, etil asetat veya metanol çözelti karışımları kullanılır. Uygun bir ekstraksiyon sistemi ile birlikte kullanıldığında bu çözelti sistemleri hücre duvarını parçalar. Sulu metanol çözeltileri özellikle fenolik asitler ve flavonoidlerin meyve ve sebzelerden ekstraksiyonu için kullanılmaktadır. Çünkü bu bileşikler metanol çözeltileri içinde oldukça

kararlıdır. Örneğin, flavon ve flavonollerin metanol içinde + 4 °C’ de üç aydan daha fazla kararlı kalabildiği rapor edilmiştir (Hertog vd., 1992b).

Sıcak veya kaynayan su da bitkilerden flavonoid ve flavonik asitlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Ekstraksiyon süresi bu bileşiklerin geri kazanım oranlarını etkilemektedir. Bu süre 1 dakikadan 24 saate kadar değişebilir. Antosiyaninler genellikle asitlendirilmiş organik çözücü ile özütlenir ve bunun için asetik asit veya triflorasetik asit kullanılır. Asidik ortam daha çok tercih edilen antosiyanin kırmızı flavilyum katyon yapısını sağlar ve bu yapı daha fazla çözünür, kararlıdır (Green, R.C., 2007). Düşük derişimlerinden dolayı antosiyanin özütleri analiz veya saflaştırma öncesinde evapore yapılması gerekir. Ancak bu işlem sırasında uçucu olan açıl ve karbohidrat konjuge antosiyanin yapıları özütten kaybedilebilir. Çözücü ekstraksiyonuyla bitkiden çözünebilen fenolik bileşikler ayrılırken bitkiye karbohidrat ve protein ile lignin gibi yüksek moleküler ağırlıkla fenolik bileşikler özütlenemez. Bunu önlemek için sapofikinyasyon olarak adlandırılan ve bitkiyle çözünmeyen fenolik bileşiklerin ester bağlarını kıran bir ön işlem tüm fenoliklerin özütlenmesini olanak sağlar (Robbins, 2003).

Fenolik bileşiklerin ayrılması, saflaştırılması ve belirlenmesi için çeşitli kromatografi teknikleri kullanılmaktadır. (Merken ve Beecher, 2000; Robbins, 2003; Shahidi ve Nacz, 2004). Bunlar, gaz kromatografisi (GC) (Dabrowski ve Sosulski, 1984; Liggins, vd., 1998; Tasioula-Maragari ve Okogeri, 2001), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Merken ve Beecher, 2000; Proestos vd., 2005), kolon kromatografisi (Salagoity-Auguste ve Bertrand, 1984; Fulcrand vd., 1999), PC (Haslam, 1965; Jackmanve vd., 1987) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) (Mabry vd., 1970; Azar vd., 1987).

Fenolik bileşiklerin belirlenmesi ve izolasyonu için en yaygın kullanılan teknik HPLC’ dir. (Merken ve Beecher, 2000; Maatta vd., 2003; Robbins, 2003). HPLC çevresel, endüstriyel, klinik, adli ve tüketici ürün örneklerinin kalitatif ve kantitatif analizleri için geniş çapta kullanılır. Fenolik bileşikler özütlenme sırasında filtre edilerek doğrudan ters faz HPLC kolonuna uygulanabilir veya jel kromatografik tekniklerle bir ön fraksiyonlama, sıvı-sıvı ekstraksiyonu veya katı faz ekstraksiyonu uygulanabilir. Tek kullanımlılık C18 kartuşları kullanılabilir. Katı faz ekstraksiyonu fenolik asitler ve flavonoidlerin fraksiyonlanması ve temizlenmesi için tercih edilmektedir. Elüsyon sistemleri genellikle ikili sulu asitlendirilmiş polar çözücülerdir: Sulu asetik asit, formik asit, perklorik asit veya fosforik asit iken ikinci çözücü sistemi metanol veya asetonitril gibi daha az polar organik çözücülerdir. Termostatik olarak kolonlar kontrol edilmekte ve sıcaklık oda sıcaklığının

biraz üzerinde tutulmalıdır. Genellikle 1 ile 100 µl'lik örnek çözeltileri enjekte edilmektedir (Robbins, 2003).

Fenolik bileşikler UV ışınlarını absorblar ve 190-380 nm aralığında tipik absorbsiyon spektrumlarına sahip oldukları için bir UV dedektöründe veya fotodiod dedektörlerle (DAD) kolayca analiz edilebilir. Oysaki antosyaninler 510 ile 525 nm aralığındaki görünür bölge ışınlarını absorblayan pigmentlerdir. Flovanoidlerin yapısal özellikleri UV görünür bölge spektrumunda belirlenebilir ve bu bölgedeki Band I ve Band II olarak tanımlanan iki spesifik dalga boyunda absorbsiyonları okunabilir. Band II 240 ile 285 nm aralığındaki maksimuma karşılık gelir ve bu absorbsiyonun flavonoidlerdeki A-halkasından kaynaklandığına inanılmaktadır. Diğer taraftan Band I 350 ile 550 nm aralığında olup B-halkasından kaynaklanır. A ve B halkaları arasında çok az veya hiç konjugasyon olmadığından flavonların ve izoflavonların UV spektrumları genellikle şiddetli Band II piklerini gösterirken küçük Band I pikleri oluşur. Bu şekilde iki farklı dalga boyunda çalışan bir dedektör sistemi ile yapılan HPLC analizi çok daha güvenli sonuçlar verecektir (Green, R.C., 2007).

1.10. Flavonoidler

Flavonoidler oksijenli heterosiklik piran halka ile bağlı iki fenolik halkasını içeren ortak bir temel yapıdadır (Harborne, 1967). Bu bileşikler toplam besinsel fenolik bileşiklerin % 60'ından sorumludur (Harborne ve Williams, 2000; Shahidi ve Naczki, 2004; Nichenametla vd., 2006) ve 4000 flavonoid türünün olduğu tahmin edilmektedir (Wrolstad, 2005). Flavonoidler çoğunlukla glikozit türevleri olarak meydana gelmelerine rağmen bazen bir glikonez gibi bitkilerde görülür. Flavonoid iskelet yapısında benzil, sinamil, hidroksil, isoprenil ve metoksil grupları bulunabilir. (Harborne ve Williams, 2000) Flavonoidler, antosiyanin, isoflavon, flavanol, flavanon, flavon, flavonol içeren altı farklı alt sınıfa ayrılabilir.

1.11. Proantosiyanidinler

Fenolik bileşiklerin basit monomerik çözünür şekillerine ilaveten tanenler gibi çözünürlüğü değişen polimerize şekilleri de vardır. Gallik asit polimerlerine dayalı

hidrolize tanenleri ve sıkıştırılmış tanenler veya flavanol polimerlerinden meydana gelen proantosiyanidinleri içeren iki asıl tanenler vardır (Manach vd., 2004). Proantosiyanidinler polimerizasyondaki zorluklar nedeniyle (iki, üç veya dört monomerdan oluşan polimerler) olarak tanımlanır (USDA, 2004a).

Proantosiyanidinler (PA) veya başka bir adı kondanse tanenler, polifenollerin büyük bir grubudur ve flavan-3-ol, flavan-3,4 diollerin polimerleri şeklinde bitkilerde yaygın olarak bulunur. Son araştırmalar biyolojik özellikleri ile ilişkilendirilmiş sağlık ve biyokullanımlarına yöneliktir, özellikle kronik hastalıklar ve gastrointestinal bozuklukları engellenmesi ile ilgili çalışmalardır (Beecher, 2004; Rasmussen, 2005; Saura-Calixto ve Pérez-Jiménez, 2009). Gıda ve günlük besinlerdeki proantosiyanidin içeriğini bilmek insan sağlığındaki önemini açıklamak için gereklidir. Bu bakımdan, çok sayıda makale ve seçilmiş gıdalarda proantosiyanidin içeriğini derleyen USDA gibi veritabanları mevcuttur (US Department of Agriculture NDL, 2004).

1.12. Antosiyaninler

Antosiyaninler, suda çözünebilen pigmentlerdir ve çoğu bitki türlerinde kırmızı, mavi ve mor renkleri sağlamaktan sorumludurlar. Antosiyanin temel aglikonu kararsızdır ve antosiyanidin olarak adlandırılır. Altı temel antosiyanidin vardır ve bunlar, siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin ve petunidindir (Brouillard, 1982). Bu pigmentlerin temel yapılarındaki modifikasyonlar sonucu bitkilerde 500 den fazla antosiyanin bulunduğu rapor edilmiştir (Mazza ve Miniati, 1993). Antosiyaninler ile bağlı en genel açıl grupları, hidrosinamik asitleri, özellikle kafeik, ferulik ve p-kumarik asitler ve alifatik dikarboksilat, malonik asittir (Williams ve Grayer, 2004).

1.13. Amaç

Achillea biserrata M. Bieb. halk arasında “Civanperçemi” olarak bilinmekte ve bu bitkilerin toprak üstündeki bazı kısımları, uçucu yağları ve ekstraktları farmakolojide, kozmetikte, solunum, sindirim, üreme, boşaltım ve dolaşım sistemleri düzensizliklerinde yaygın biçimde kullanılmaktadır. Türkiye’de yetiştiği yerler Kuzey ve Doğu Anadolu bölgeleridir. *Achillea biserrata* M. Bieb’in nın yanı sıra *Hyssopus officinalis* L.ssp.

angustifolius' de bu amaçla çalışılmıştır. *Hyssopus officinalis* ülkemizde “Zufootu” olarak bilinir, hafif tüylü, ince uzun ve ucu sivri olan yaprakları şerit ya da mızraksı biçimlidir. *Hyssop* türleri balgam söktürücü, soğuk algınlığında terletici, sindirimi kolaylaştırıcı, bronşit, öksürük, boğaz ağrısı ve kronik nezlede etkili olarak kullanılır.

Bu çalışmada antioksidan bileşenleri etkin bir şekilde ayırmak amacıyla, farklı polaritelere sahip çözücü ve özütlenme yöntemleri, antioksidan aktiviteleri, uçucu yağların kimyasal içerikleri, aktivitesi olan özütlerin fenolik içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Yapılan Çalışmada Kullanılan Araç-Gereçler

Hewlett Packard 5890 II GC

HP 5972 Kütle seçici

Rotary - Re 100 Evaporatör

Chrit Alpha - 4 Ld Liyofilizatör

Gerhardt Soxtherm Manager SX PC Sokstherm cihazı

2.2. Yapılan Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Merk, Darmstad markasında çözücü ve kimyasallar kullanılmıştır.

2.3. Bitkisel Materyaller

Bu çalışmada *Achillea biserrata* M. Bieb. ve *Hyssopus officinalis* L.ssp. *angustifolius* bitkileri araştırılmıştır.

- *Achillea biserrata* M. Bieb.

Asteraceae/Aster, çok yıllık 20-100 cm boyunda yumuşak tüylü otsu bitkilerdir. Çiçeklenme dönemi Haziran-Eylül aylarındadır. Kurak topraklarda, tarlalarda, yol kenarlarında yetişir. Deniz seviyesinden 1600 m'ye kadar yetiştiği gözlenmiştir. Türkiye'de özellikle Kuzey Anadolu, Doğu Anadolu'da yaygındır. Dünyada yaygın olarak Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da bulunmuştur (Könemann, 1999). Asteraceae ailesinden *Achillea* L. cinsinin dünyada yaklaşık 137 türünü içermektedir, Türkiye'de 22'si endemik olan 43 tür bulunmaktadır (Azaz vd., 2009).

- *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*

Lamiaceae/ Labiatae (Ballıbabagiller), 50-120 cm boyunda çok yıllık, kokulu, çalimsı bitkilerdir. *Hyssopus officinalis*, Asya, Avrupa ve Amerika'nın sıcak bölgelerinde yetişmektedir. *Hyssopus*, Kuzey Akdeniz kıyı ve Anadolu çevresinde bulunur (Könemann 1999). Türkiye florasında bir grup tarafından bu cins temsil edilmektedir, *Hyssopus*

officinalis L. ssp. *angustifolius* (Davis,1982). Deniz seviyesinden 1200-1300 m arasında kadar yetiştiği gözlenmiştir.

2.4. Bitkilerin Toplanması ve Tanımlanması

Çalışmada *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* bitkilerinin toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Toplanan bitkilerin botanik tanımlama ve adlandırması Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. H.Aşkın AKPULAT tarafından yapılmış ve adlandırmada P. H. Davis'in (1965-1988) "Flora of Turkey and the Aegean Islands" adlı eserinden yararlanılmıştır. Tez kapsamında çalışılan *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* bitkilerinin lokaliteleri, toplanma zamanları ve kısımları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Bitkilerin lokaliteleri ve toplanma zamanları

Bitki adı	Lokale	Toplanma zamanı	Toplanan kısım
<i>Achillea biserrata</i>	A8: Trabzon, Tonya, Kadırga yaylası, 1600m, 20.VI.2009	Haziran	Toprak üstü kısımları
<i>Hyssopus officinalis</i>	A8: Rize, İkizdere, Anzer yaylası yol üzeri, 1200-1300m 17.VII.2009	Temmuz	Toprak üstü kısımları

Bitkiler toplandıktan sonra toprak üstü kısımları, gölgede, iyi havalandırılan bir ortamda, oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan bitkilerin çiçek ve yaprakları ayrıldı ve karışım halinde öğütücüyle toz haline getirildi. Toz halindeki bitkisel materyaller daha sonra özütlerin hazırlanmasında kullanıldı.

2.5. Özütlerin Elde Edilmesi

Achillea biserrata ve *Hyssopus officinalis* bitkilerinden beş farklı özüt hazırlandı. Uçucu yağ doğrudan bitkiden özütlenirken diğer özütler farklı polaritede çözücülerin kullanıldığı birbirini izleyen özütleme (hekzan, kloroform, su) veya doğrudan özütleme (metanol-su) işlemleri ile elde edilmiştir. İzlenen yöntemlerin detayları aşağıda verilmiştir.

1. Uçucu Yağ Elde Edilişi (UY):

50 g kuru materyallerden, Clevenger aparatında 4 saat su distilasyonu yöntemi sonucunda bitkilerin uçucu yağları elde edildi. Uçucu yağlara susuz sodyum sülfat eklendi ve aktivite çalışmaları yapılncaya kadar buzdolabında, karanlıkta ve + 4 °C’de saklandı.

2. Hekzan Özütü (HÖ):

Hekzan ve giderek artan polaritedeki çözücülerle özütleme işlemi tamamen otomatik Sokstherm cihazında (Gerhardt Soxtherm Manager SX PC) yapılmıştır. Materyallerden 5'er g tartılarak, toplam 20 g olmak üzere ekstraksiyon kartuşlarına konuldu. Hazırlanan kartuşlar, içinde çözücü olarak 100 mL hekzan bulunan dört ekstraksiyon beherlerine yerleştirildi. Hekzan ile özütleme (ekstraksiyon) için en uygun değerler bilgisayar yardımıyla programdan seçilerek özütleme işlemi başlatıldı. Hekzan özütlemesinde kullanılan optimize edilmiş parametreler Tablo 2’de verilmiştir.

3.Kloroform Özütü(KÖ):

Hekzan özütlemesi için kullanılan materyal önce metanol ile 5 saat 25 dk. özütlendi. 130 mL metanol konulan ve boş ağırlığı ölçülen beherlere hekzan özütlemesinden kalan materyaller yerleştirildi. Farklı denemeler sonucunda belirlenen optimize değerler programlanarak otomatik sistemde metanol ile özütleme işlemi başlatıldı. Metanol ile özütleme işlemi için programa girilen optimize değerler Tablo 2’de verilmiştir. Özütleme işlemi bittikten sonra beherde kalan metanol uçurulup elde edilen özüt miktarı hesaplandı.

Elde edilen özütler daha sonra 1:1 oranında kloroform ve su karışımı ile sıvı-sıvı özütlemesine tabi tutularak suda çözünen kısım ve kloroformda çözünen kısım olmak üzere iki farklı faz elde edildi. Kloroform ve su fazı ayırma hunisiyle boş ağırlıkları ölçülen beherlere alınarak birbirinden ayrıldı. Oda sıcaklığında kloroform tamamen uçuruldu ve beherlerin ağırlıkları ölçülerek özüt verimleri hesaplandı.

4 . Su Özütü(SÖ):

Kloroformdan ayrılan su fazı -80°C’de donduruldu ve daha sonra liyofilizatörde suyu uzaklaştırıldı. Beherlerin ağırlıkları ölçülerek özüt verimleri hesaplandı.

Tablo 2. Ekstraksiyon Parametreleri

Parametreler	Hekzan	Metanol
T - Sınıflandırması	200 °C	200 °C
Özütleme Sıcaklıkları	120 °C	140 °C
İndirme Süreci	1 dk. 30 s.	1 dk. 30 s.
İndirme aralığı	3 s	4 s.
Sıcak Özütleme	0 sa. 30 dk.	2 sa. 30 dk.
Buharlaştırma A	9xinterval	8xinterval
Özütleme Süresi	0 sa. 40 dk.	2 sa. 30 dk.
Buharlaştırma B	3xinterval	5xinterval
Buharlaştırma C	10 dk.	10 dk.
Program Süresi	1 sa. 43 dk.	5 sa. 25 dk.

5. Metanol-Su Özütü (MSÖ): 20 g materyalin 100 mL metanol-su karışımı (1:1) içinde 24 saatlik sürekli çalkalanmasıyla elde edilen karışım evapore edildi ve -40 °C’ de liyofilize edilerek metanol-su özüt verimleri hesap edildi.

Özütler ağzı kapalı kaplarda karanlıkta +4 °C’ de saklandı ve taze hazırlanmış çözeltileri testlerde kullanıldı. Tüm çalışma boyunca yüksek kaliteli çözücü ve kimyasallar (Merk, Darmstad) kullanılmıştır.

2.6. Antioksidan Aktivite Testleri

Bitki özütleri gibi pek çok kompleks içeriğin antioksidan aktivitesinin belirlenebilmesi için çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu çeşitli yöntemlerden sadece bir tanesini uygulayarak özütün veya kompleks karışımın olası antioksidan aktivitesini belirlemek mümkün değildir. Bundan dolayı bu çalışmada iki ayrı antioksidan etkinliği ölçme yöntemi kullanılmıştır:

1-DPPH (2,2-Difenilpikrilhidrazil)Yöntemi

2-β-karoten Renk Açılımı -Spektrofotometrik Yöntem

2.6.1. DPPH Yöntemi

Hazırlanan tüm özütlerin antioksidan aktiviteleri literatürde tanımlanan yöntem izlenerek yapılmıştır (Cuendet vd., 1997; Kirby ve Schmidt 1997, Burits ve Bucar, 2000; Burits vd., 2001). DPPH yöntemi için kloroform, su, hekzan ve metanol-su özütlerinden içeriği 30 mg/mL veya üzeri olacak şekilde stoklar hazırlanarak uçucu yağlar ise doğrudan kullanılmıştır.

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 hazırlanan 50 µL'lik metanol içinde hazırlanan çözeltisi %0.004'lük (w/v) DPPH çözeltisinin 5 mL'si ile karıştırılır. 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 özüt derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek her bir özütün %50 renk açılımını sağlayan derişimleri %50 inhibisyon (IC₅₀) değeri olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak sentetik bir antioksidan olan butillenmiş hidroksi tolue (BHT) kullanıldı.

2.6.2. β-Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem

Bu yöntem için elde edilen hekzan, kloroform, su, ve metanol-su özütlerinden ve uçucu yağlardan derişim 2 mg/mL olacak şekilde etanolde çözülerek test örnekleri hazırlandı.

Pozitif kontrol olarak aynı derişimde BHT çözeltisi kullanıldı. β -Karoten-linoleik asit karışımı şu şekilde hazırlandı: 0,5 mg β -karoten 1mL kloroformda çözüldü. 25 μ L Linoleik asit 200 mg Tween 20 ile emisyon haline getirilerek β -karoten çözeltisine eklendi. Karışım iyice çalkalandıktan sonra evaporatörde 50 °C’de kuvvetli vakum uygulanarak kloroform tamamen uçuruldu. Burada dikkat edilmesi gereken nokta kloroformun tamamen uzaklaştırılmış olmasıdır. Aksi takdirde berrak bir test çözeltisi elde edilemeyeceğinden absorpsiyon ölçümlerinde ciddi hatalara yol açmaktadır. Karışım üzerine, linoleik asitin oksidasyonunu sağlayacak olan önceden 30 dakika boyunca oksijenle doyurulmuş (akış hızı 100 mL dak⁻¹) distile 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 2500 μ L’lik kısımlar örnek tüplerine alındı. Her bir özüt ve kontrol için üç tekrarlı seriler hazırlandı. 350 μ L’lik test çözeltileri ilgili serilere ilave edildi. Aynı miktar etanol boş kontrol ve BHT çözeltisi ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Daha sonra, tüpler ağızları kapatılarak oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletildi ve çözeltilerin 490 nm’ de absorbansları ölçüldü. Yine BHT’ nin ve özütlerin absorbans değerleri (üç tekrarın ortalaması) karşılaştırılarak bağıl antioksidan aktivite (BAA) değerleri aşağıdaki eşitliklerden hesaplandı.

$$\% \text{ BAA} = \frac{A_{\text{özüt}}}{A_{\text{BHT}}} \times 100$$

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

Uçucu yağ özütlerinde aktivite belirlenmesi nedeniyle bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla GC/MS analizleri yapıldı. Uçucu yağların analizi, bir FID detektör ve bir Rtx-5MS kapiller kolon ile donanımlı (30 m x 0.25 mm, film kalınlığı 0.25 μ m) Hewlett Packard 5890 II GC kullanıldı. Hewlett Packard 5890 II GC’ye bir HP 5972 Kütle seçici detektörü eklendi. GC/MS saptaması için 70 eV iyonizasyon enerjili bir elektron iyonizasyonu sistemi ilave edildi. Enjektör ve detektör sıcaklıkları sırasıyla 220 ve 290°C’ ye ayarlandı. Kolon sıcaklığı kademeli olarak 50°C den 240°C’ ye 3°C/dk’ lık bir hızla artırıldı. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldı. Helyumun akış oranı 1 mL/dk’ya ayarlandı.

Aseton ile 1/100 oranında seyreltilen örneklerden 1.0 µL enjekte edildi. Kovats Endekslerinin saptanmasında (KI) n-alkanlar referans noktaları olarak kullanıldı.

Bileşenlerin belirlenmesi alıkonma süreleri (t_R), ilgili Kovats indeksi (KI), GC/MS sisteminin NIST 98, Wiley 275 kütüphanesi ve literatür verileri (Robert P. Adams, 2007) ile kütle spektrumları karşılaştırılmasına dayandırıldı. Bileşiklerin bağıl yüzdeleri pik alanlarının integrasyonundan elde edildi.

2.8. Fenolik Bileşen Analiz

Fenolik bileşen analizinde beş farklı yöntem izlenmiştir. Bu yöntemlerden bazıları birbirini tamamlar niteliktedir. Örneğin Folin–Ciocalteu reaktifinin kullanıldığı spektrofotometrik yöntem özütlerinin toplam fenol içeriğini belirlerken diğer yöntemler spesifik fenolik bileşikleri belirlemektedir.

2.8.1. Toplam Fenol İçeriği

Folin–Ciocalteu yöntemi tungsten ve molibden elementlerinin bir karışımı olan reaktifin kimyasal olarak indirgenmesini temel alan spektrofotometrik bir yöntemdir. Singleton bu yöntemi şarap analizine adapte ederek iki temel derleme yayınlamıştır (Singleton ve Rossi., 1965). Metal oksitin indirgenmesi sonucu 765 nm’de absorpsiyon gösteren mavi bir renk oluşur. Bu rengin şiddeti fenollerin derişimiyle doğru orantılıdır. Renk oluşumu yavaş olup örneğin hafif ısıtılmasıyla hızlandırılabilir. Fakat çok fazla ısıtma yapılırsa renk kaybına da neden olur (Monica Guisti, M. ve Wrolstad, R.E, 2001).

Artan derişimlerde gallik asit standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. Bu amaçla 10 mg gallik asit 1 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiden 1-40 µL’lik kısımlar alınarak metanol ile 1 mL’ye seyreltildi. Seyreltilmiş her bir çözeltiden 50 µL’lik kısımlar tüplere alınarak üzerine 750 µL Folin–Ciocalteu’s reaktifi/su (1:14) karışımı ve % 20’lik Na_2CO_3 ’dan 200 µL eklendikten sonra karanlıkta 30 dk. bekletildi ve oluşan yeşil renkli kompleksin 760 nm’deki absorpsiyonu ölçüldü. Gallik asit derişimine karşı ölçülen absorpsiyon değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi.

Kloroform, su, metanol-su özütlerinin stok çözeltilerinden (5 mg/mL) 50 µL numune alınıp, 750 µL Folin–Ciocalteu’s reaktifi/su (1:14) karışımı ve % 20’lik Na_2CO_3 ’dan 200

μL eklendikten sonra karanlıkta 30 dk. bekletildi. Kontrol olarak 50 μL metanol alınıp numuneye uygulanan işlemler yapıldı. Kör olarak metanol kullanılarak örneklerin absorbansı 760 nm’de ölçüldü ve her bir deney üç kez tekrarlandı. Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplandı (Singleton ve Rossi, 1965).

2.8.2. Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Artan derişimlerde kuarsetin standartları kullanılarak kalibrasyon grafiğı elde edildi. Bu amaçla 0,05 mg kuarsetin 1 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiden 20-800 μL ’lik kısımlar alınarak metanol ile 1 mL’ye seyreltildi. Seyreltilmiş her bir çözeltiden 0,5 μL ’lik kısımlar tüplere alınarak üzerine 1,5 μL $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ eklendikten sonra karanlıkta 10 dk. bekletildi ve 430 nm’deki absorpsiyonu ölçüldü. Kuarsetin asit derişimine karşı ölçülen absorpsiyon değeri grafiğı geçirilerek kalibrasyon grafiğı çizildi.

Kloroform, su, metanol-su özütlerinin stok çözeltilerinden (4 mg/mL) 0,5 mL örnek alınıp, % 2’lik $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ’ün metanoldeki çözeltilisinden 1,5 mL eklendikten sonra karanlıkta 10 dk bekletildi. Kontrol olarak 0,5 mL metanol alınıp numuneye uygulanan işlemler yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda 430 nm’ de absorbansları okundu ve kör olarak % 2’lik $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ’ün metanol çözeltilisi kullanıldı. Kontrol olarak 0,5 μL metanol alınıp numuneye uygulanan işlemler yapıldı, örneklerin absorbansı 430 nm’ de ölçüldü ve her bir deney üç kez tekrarlandı. Özütlerin flavonoid miktarları, kuarsetinin kalibrasyon grafiğinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplandı (Lamaison ve Carnat, 1991).

2.8.3. Proantosiyanidin Miktarının Belirlenmesi

Kloroform, su, metanol-su özütlerinin stok çözeltilerinden (4 mg/mL) 0,5 mL örnek alınıp, 0,5 mL metanol, 6 mL n-BuOH/ HCl (95:5 v/v) ve 0.1 mL 2 M HCl de hazırlanmış % 2’lik $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ çözeltilisi eklendi. Isıtılmadan önce ve 95 ° C’de 40 dk. ısıtıldıktan sonra 550 nm de özütlerin absorbans değeri okudu. Her bir deney 3 kez tekrar edildi. Özütlerdeki yüzde proantosiyanidin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Porter vd., 1986).

$$\text{Proantosiyanidin miktarı} = (A_{550\text{nm}} \text{ örnek} - A_{550} \text{ kontrol} / \epsilon \cdot L) \cdot \text{MW} \cdot \text{DF} \cdot 1000$$

A_{550} örnek = 550 nm’de örnek absorbansı

A_{550} kontrol = 550 nm’de kontrol absorbansı

ϵ = Syanidinin molar absorbans katsayısı ($17,360 \text{ L}^{-1}\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

L = Küvet genişliği (1 cm)

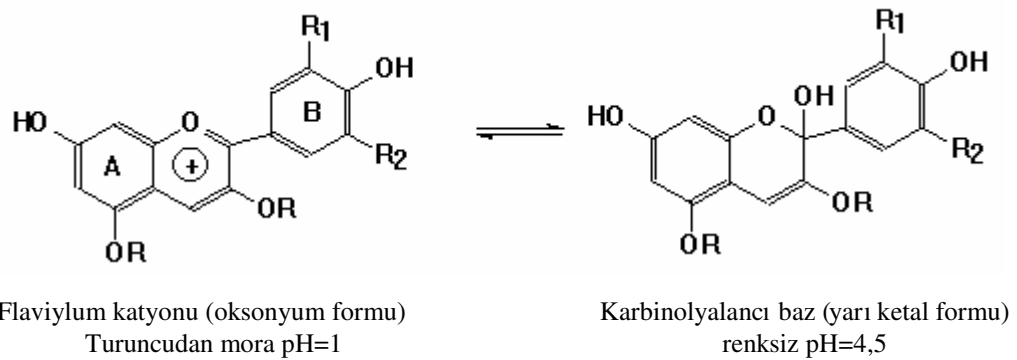
MW = Syanidinin moleküler ağırlığı (287 g/mol)

DF = Seyreltme faktörü (g/L)

1000 gram dan miligrama dönüşme faktörü

2.8.4. Antosiyanin Miktarının Belirlenmesi

Toplam antosiyanin miktarının belirlenmesinde Giusti ve Wrolstad (2001) tarafından tanımlanmış olan pH farklılığı yöntemi kullanılmıştır. Bu metod farklı pH’larda antosiyanin pigmentlerinin geri dönüşümlerin yapısal dönüşümleri üzerine kurulmuş bir metod olup toplam antosiyanin ölçümlerinin hızlı ve doğru bir şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır. Yöntem polimerize olarak parçalanmış pigmentlerin ve diğer girişimci bileşiklerin varlığında dahi iyi sonuçlar vermektedir. Farklı pH’lardaki antosiyaninlerin yapısal değişimleri Şekil 1’de gösterilmiştir (Monica Guisti, M. ve Wrolstad, R.E, 2001).



Şekil 1. Farklı pH’lardaki antosiyaninlerin yapısal değişimleri

Kloroform, su, metanol-su özütlerinin stok çözeltilerinden (6 mg/mL) 40 μL örnek alınıp üzerine pH 1 (25 mL %1.49 KCl + 67 mL % 1,7 HCl) ve pH 4.5 (% 1.64 AcONa) tampon çözeltilerinin 960 μL ’si eklenir. Kör olarak su alınıp 700 ve 510’nm de özütlerin

absorbans değerleri okunur. Her bir deney 3 defa tekrar edildi. Özütlerdeki toplam antosiyanidin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Giusti ve Wrolstad, 2001).

$$\Delta A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH 1.0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH 4.5}$$

$$TACY = (\Delta A \times MW \times DF \times 1000) / \epsilon \times 0.1$$

TACY = Toplam antosiyanin miktarı (yüzde mg siyanidin 3-glikozid olarak ifade edilir

MW = Siyanidin 3-glikozidin moleküler ağırlığı (449.2 g/L).

DF = Seyreltme faktörü

1000= gram dan miligramla dönüşme faktörü

ϵ = Siyanidin 3-glikozidin molar absorbans katsayısı (26,900 M⁻¹cm⁻¹).

0.1dönüşme faktörü

2.8.5. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

HPLC ile fenolik bileşenlerin belirlenmesinde daha önce hazırlanan özütler yerine literatürde önerilen yöntemle yeni özütler hazırlanmıştır. *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* kuru örneklerinden 0,5 g alınarak 3 saat boyunca metanolle ultrasonik banyoda özütleme yapıldı ve 40°C’de rotary evaporatörde metanol uçuruldu. Kalıntı 5 mL destile suda çözülerek etil asetat ve dietileter ile kısımlandırıldı ve organik fazlar birleştirilerek çözücüler uçuruldu. Kalıntı uygun miktarda metanolde çözülerek HPLC analizlerine geçildi. HPLC analizleri iki dalga boyunda aynı anda cevap alınabilen UV dedektör ile donanımlı Shimadzu LC-UV sisteminde yapıldı. Tüm analizler için bir ters faz C18 kolon (150 mm × 4.6 mm iç çap, 5 µm tanecik boyutu; Agilent) kullanıldı. Hareketli faz olarak iki ayrı çözeltinin karışımı uygulandı; asetik asitin sudaki % 2’lik çözeltisi (A) ve 80:20 asetonitril/su çözeltisi (B). Enjeksiyon hacmi 50 µL ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C’ye ayarlandı. Akış hızı 1 mL/dk, dedektör 280 ve 315nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda çalıştırıldı. Gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferrulik asit, benzoik asit, rutin, *o*-kumarik asit, 2,4-*cis*, *trans*-absisik ve *trans*-sinnamik asit ve kuersetin standart olarak kullanıldı. Bileşenlerin nicel değerlendirmesinde her bir bileşenin bilinen derişimlerinde hazırlanan standart karışımı kullanıldı. Aynı şartlarda koşturulan örnek ve standartların pik alanlarının integrasyonu ile miktar analizi yapıldı. Nicel hesaplamalarda propil paraben HPLC’ de iç standart olarak kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Özütler ve Verimleri

Achillea biserrata ve *Hyssopus officinalis*'in Bölüm 2.3'de belirtilen şekilde hazırlanan hekzan, kloroform, su, metanol-su, uçucu yağ özütleri ve verimleri Tablo 3'de sunulmuştur.

Tablo 3. *Achillea biserrata*, *Hyssopus officinalis* özütleri ve verimleri.

	Hekzan (% g/g)	Metanol		Metanol-su (% g/g)	Uçucu Yağ (% g/g)
		Kloroform fazı (% g/g)	Su fazı (% g/g)		
<i>Achillea biserrata</i>	3,01	2,90	12,16	4,55	0,4
<i>Hyssopus officinalis</i>	2,42	4,14	18,33	5,26	1,3

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

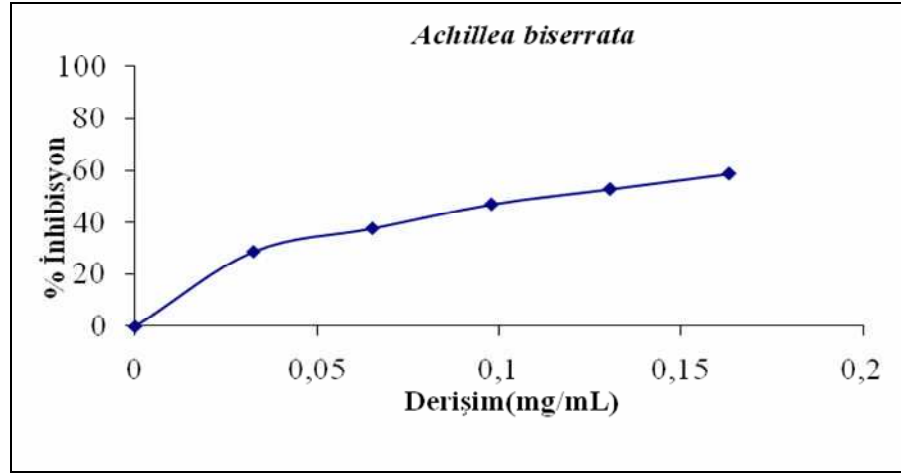
3.2. Antioksidan Aktivite Testleri ve Bulguları

3.2.1. DPPH Yöntem Bulguları

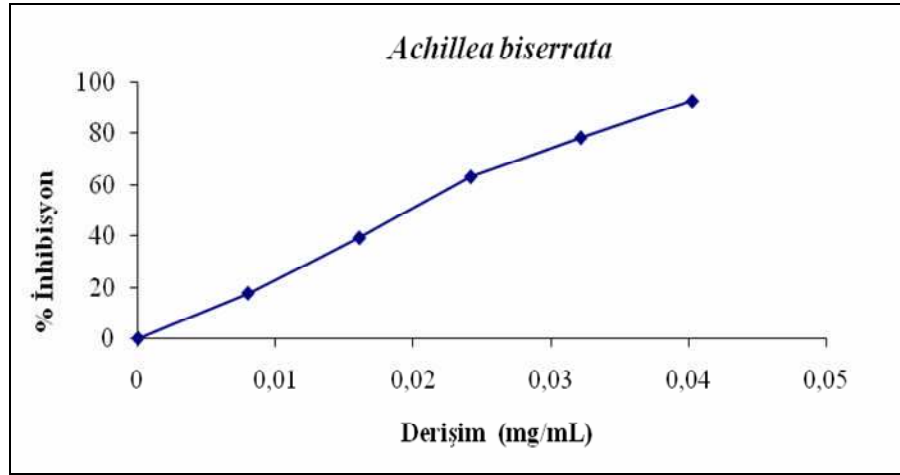
Materyal ve yöntem bölümünde ayrıntılarıyla anlatılan yöntem izlenerek; kararlı DPPH radikalinin *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* bitkilerinden elde edilen hekzan, kloroform, su, metanol-su özütlerinin ve uçucu yağlarının varlığındaki davranışı incelendi. Stokları hazırlanan örneklerin ardışık seyreltme yoluyla elde edilen farklı derişimlerinin %0,004'lük DPPH çözeltisinde renk açma kapasiteleri % inhibisyon olarak belirlendi.

Düşük derişimlerden yüksek derişimlere kadar bir seri stok çözeltiyle çalışılmasına rağmen *Achillea biserrata* türünün hekzan özütlerinde ve uçucu yağlarında aktivite gözlenmedi. Bu nedenle bu türlerin serbest radikal temizleme özelliğinin ölçüsü olan

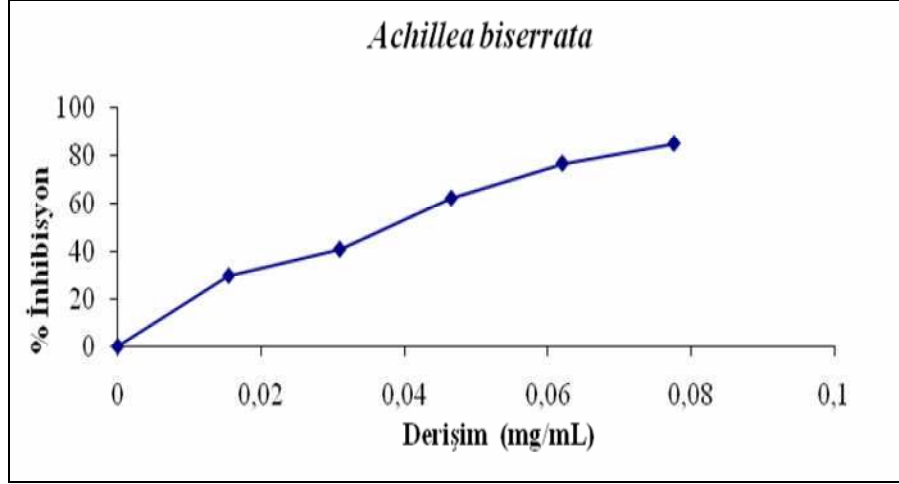
DPPH testi verileri dahil edilmemiştir. *Achillea biserrata*'nın aktivite gösteren, kloroform, su, metanol-su özütleri derişimlerine karşı % inhibisyon değerleri Şekil 2, 3 ve 4'de verilmiştir.



Şekil 2. DPPH yönteminde *Achillea biserrata*'nın kloroform özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri

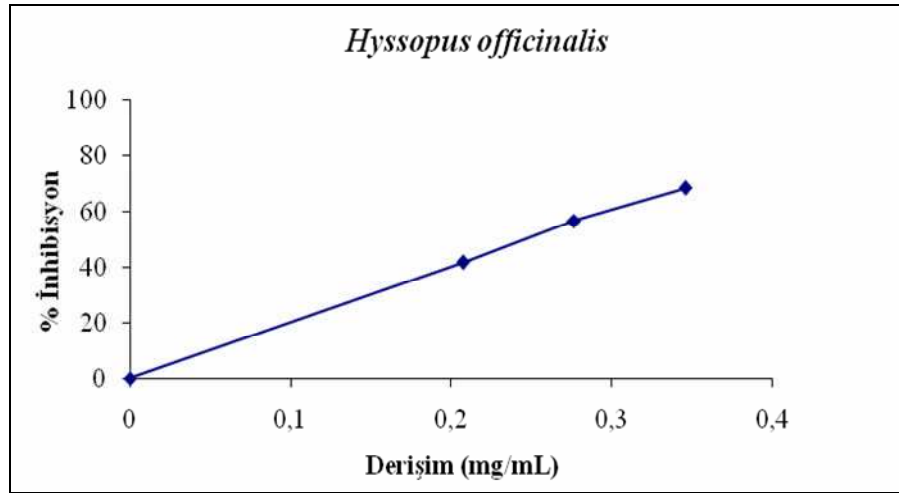


Şekil 3. DPPH yönteminde *Achillea biserrata*'nın su özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri

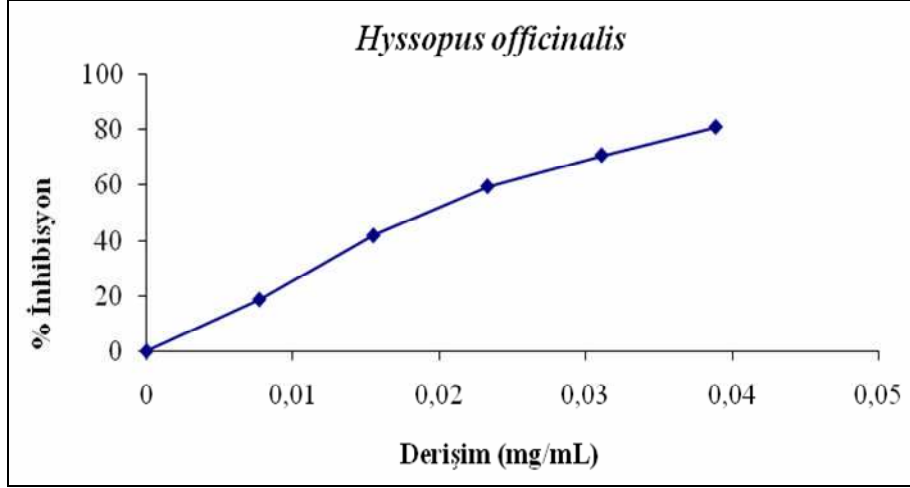


Şekil 4. DPPH yönteminde *Achillea biserrata*'nın metanol- su özütü derişimine karşı %i nhibisyon değerleri

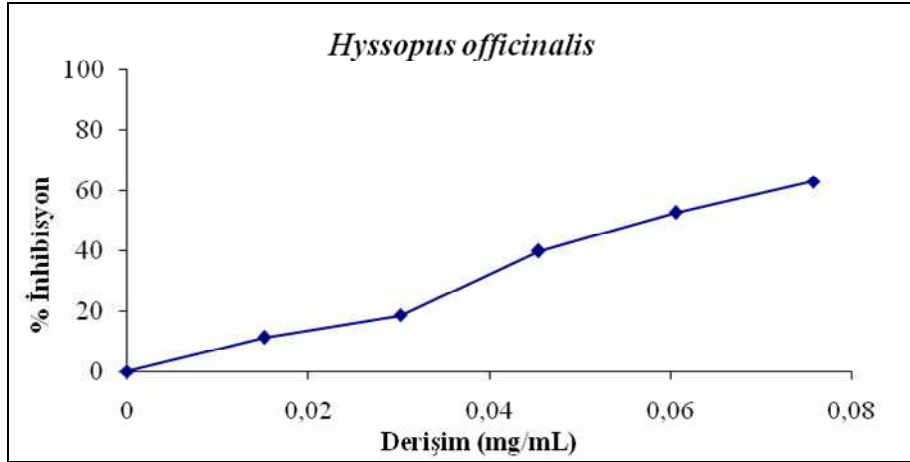
Benzer şekilde ardışık seyreltme yöntemiyle test edildi. *Hysopus officinalis*' in aktivite gösteren, kloroform, su, metanol-su her bir özütün derişimlerine karşı elde edilen % inhibisyon değerleri Şekil 5, 6 ve 7' de verilmiştir.



Şekil 5. DPPH yönteminde *Hysopus officinalis*'in kloroform özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri

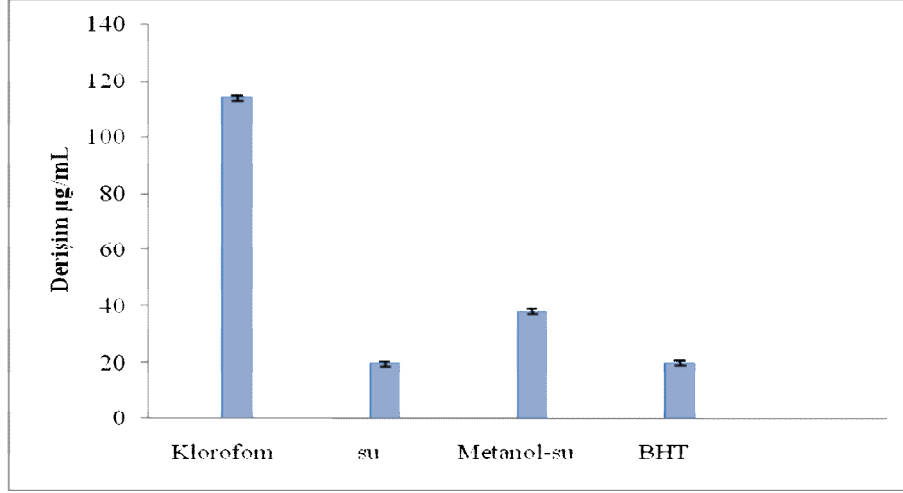


Şekil 6. DPPH yönteminde *Hyssopus officinalis*'in su özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri



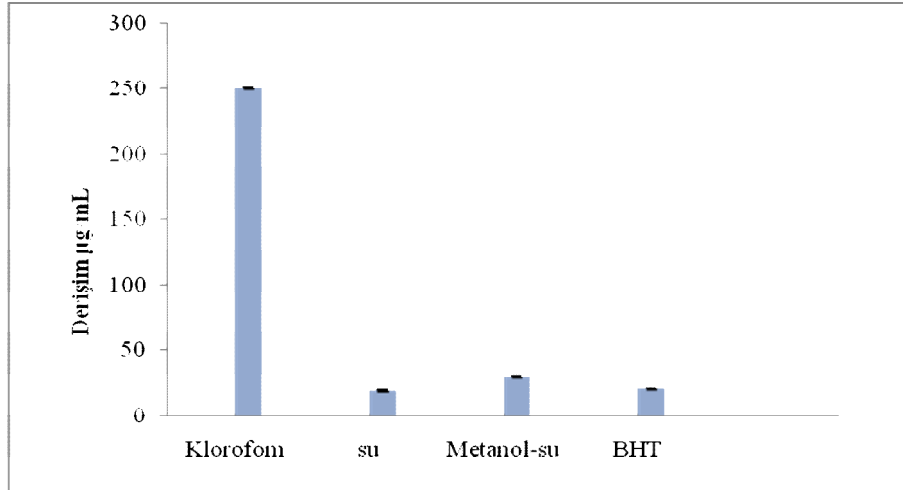
Şekil 7. DPPH yönteminde *Hyssopus officinalis*'in metanol- su özütü derişimine karşı % inhibisyon değerleri

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 veya $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu. Aynı çalışma şartlarında pozitif kontrol BHT için de derişim değerleri bulundu. Her bir türün farklı çözücülerle elde edilen özütleri için elde edilen bulgular karşılaştırmalı olarak Şekil 8 ve Şekil 9'da sunulmuştur.



Şekil 8. DPPH yönteminde *Achillea biserrata*'nın özütleri ve BHT' nin IC₅₀ derişimleri

Achillea biserrata'ın, DPPH testinde hekzan herhangi bir aktivite ve uçucu yağ özütünde ise çok zayıf bir aktivite gözlenmediğinden grafiğe dahil edilmemiştir. Özütlerden en yüksek aktiviteye sahip olanlar en düşük derişim sağlayan özütlerdir. *Achillea biserrata* özütlerinde derişimi en düşük olan su özütünde en yüksek aktivite, derişimi en yüksek olan kloroform özütünde ise en düşük aktivite gözlenmiştir.



Şekil 9. DPPH yönteminde *Hyssopus officinalis*'in özütleri ve BHT' nin IC₅₀ derişimleri

Benzer şekilde *Hyssopus officinalis*'in, DPPH testinde hekzan ve düşük derişimdeki uçucu yağ özütlerinde ise herhangi bir aktivite gözlenmediğinden grafiğe dahil edilmemiştir. Bu türde de IC₅₀ derişimi en düşük olan su özütünde en yüksek aktivite, derişimi en yüksek olan kloroform özütünde ise en düşük aktivite gözlenmiştir.

Güçlü bir serbest radikal temizleme özelliği göstermemesine rağmen doğrudan uçucu yağın kullanıldığı bir seri çalışma yapılmıştır. Uçucu yağ hacmine karşı gözlenen % inhibisyon değerleri ve çalışma şartlarındaki uçucu yağ derişimleri Tablo 4'de sunulmuştur. Genel olarak yüksek hacimlerde (veya yüksek derişimlerde) uçucu yağ ile elde edilen IC₅₀ değerleri antioksidan aktiviteleri çok zayıf aktivite olarak değerlendirilir.

Tablo 4. *Hyssopus officinalis*'in artan uçucu yağ hacimleri için % inhibisyon değerleri ve bu hacimlere karşılık gelen derişimler

Miktar(µL)	Derişim(mg/mL)	%I
50	9,4	32,96
60	11,2	36,08
70	13,1	38,69
80	14,9	41,70
90	16,7	45,22
100	18,6	50.00

3.2.2. Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntem ve Bulguları

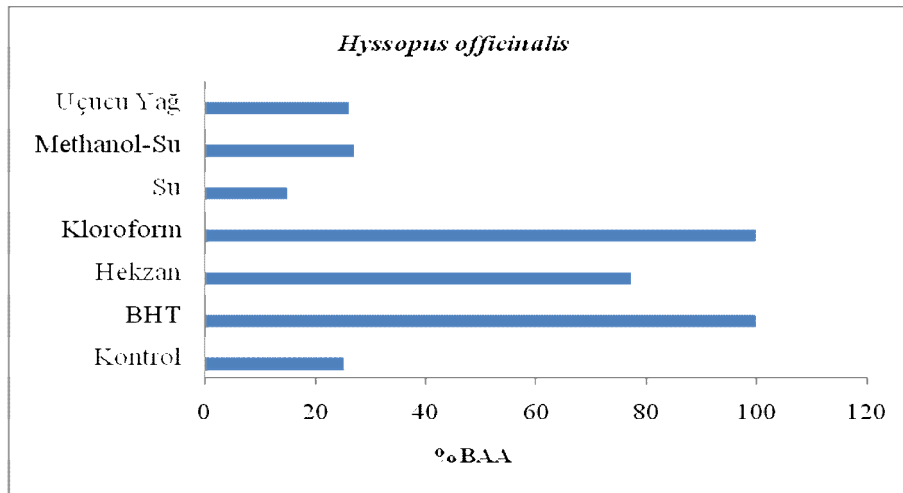
Antioksidan aktivitesinde uygulanan diğer bir test yöntemi de β-karoten renk açılımı-spektrofotometrik yöntemidir. Etanolde çözülerek hazırlanan pozitif kontrol BHT, özütler ve kontrol test örneklerinin varlığında β-karoten-linoleik asit sisteminde β-karoten'nin karakteristik sarı renginin belli bir periyotta korunumu esas alındı. 24 Saatlik inkübasyon süreci sonucunda absorbans değerleri BHT' nin absorbansına karşı değerlendirildi, % BAA değerleri hesaplandı. β-Karoten renginin korunması pozitif aktivite değeri olarak değerlendirilmiştir. Linoleik asitin ortamdaki çözünmüş oksijen tarafından oksidasyonunun engellenmesini ölçen bu yöntemde 2 g/L derişimli BHT' nin oksidasyonu % 100 engellediği ve özütlerin bu derişimde engelleme oranları karşılaştırılmaktadır. *A. biserrata* özütlerinden elde edilen % BAA değerleri şekil 10' da ve *H. officinalis* özütlerinden elde

edilen değerler ise Şekil 11’ de verilmiştir. Her iki grafikte kontrol olarak verilen değerler özüt içermeyen sadece oksidasyon sistemini ve çözücüyü içermektedir.



Şekil 10. *Achillea biserrata* özütleri ve BHT’ nin % BAA değerleri

Achillea biserrata özütlerinin % BAA değerleri apolar çözücülerle hazırlanan özütlerin % BAA değerleri kloroform için % 208,73, hekzan için % 67,42 olarak gözlenmiştir.



Şekil 11. *Hyssopus officinalis*’ın özütleri ve BHT’ nin %BAA değerleri

Hyssopus officinalis özütlerinde de benzer aktiviteler gözlenmiştir. Kloroform özütünde % 165,08 ve hekzan özütünde % 77,40 inhibisyon elde edilmiştir.

3.3. Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analiz Bulguları

Tez kapsamında çalışılan *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* uçucu yağları toprak üstü kısımlarından, Bölüm 2’ de verilen yöntemle elde edildi. Bu iki bitkiye ait uçucu yağların verimleri sırasıyla % 0,4 ve % 1,3 olarak hesaplandı (Bkz. Bölüm 3, Tablo 3). Her iki yöntemde de aktivite gösteren tüm özütlerin kalitatif ve kantitatif bileşen analizlerini yapmak mümkün olmamakla birlikte uçucu yağ özütlerinde ayrıntılı yapı analizi yapılabilmektedir. Uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 2’ de ayrıntılarıyla tanımlanan GC/MS analizleri yapıldı. Uygulanan yöntem sonucunda elde edilen uçucu yağların kimyasal içerikleri Tablo 5 ve Tablo 6’ da verilmiştir.

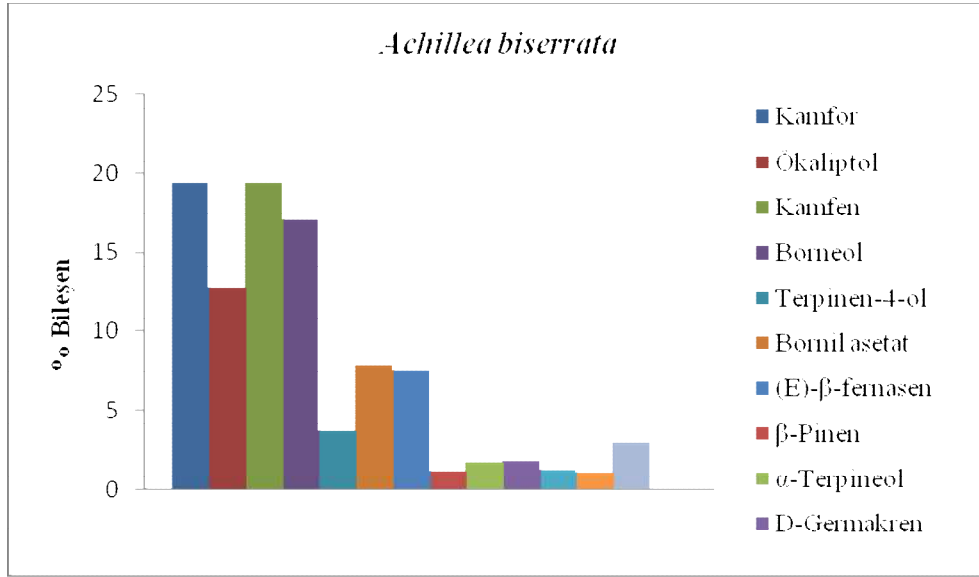
Tablo 5. *Achillea biserrata*' nın uçucu yağ bileşenleri

Pik No	K.I.*	Bileşen	%
1.	924	β -Tujen	0,2
2.	932	β -Pinen	1,3
3.	946	Kamfen	4,8
4.	969	Sabinen	0,5
5.	974	β -Pinen	1,2
6.	1014	β -Terpinen	0,3
7.	1020	<i>p</i> -Simen	0,7
8.	1024	Limonen	0,3
9.	1026	Ökalyptol	12,8
10.	1054	β -Terpinen	1,1
11.	1065	<i>cis</i> -Sabinen hidrat	0,3
12.	1086	Terpinolen	0,2
13.	1095	Linalool	0,4
14.	1118	<i>cis</i> -Ment- 2 en-1-ol	0,1
15.	1124	Krisantanon	0,1
16.	1136	<i>trans</i> -Ment-2-en-1-ol	0,3
17.	1141	Kamfor	19,4
18.	1165	Borneol	17,1
19.	1174	Terpinen-4-ol	3,7
20.	1186	β -Terpinol	1,8
21.	1194	Mirtenol	0,2
22.	1207	<i>trans</i> -Piperitol	İz ^{&}
23.	1215	<i>trans</i> -Karveol	İz
24.	1226	<i>cis</i> -Karveol	0,3
25.	1241	Karvakrol metil eter	0,2
26.	1287	Bornil asetat	7,9
27.	1298	Karvakrol	0,1
28.	1356	Öjenol	0,3
29.	1359	Neril asetat	0,3
30.	1374	β -Kopaen	0,3
31.	1417	β -Karyofillen	0,2
32.	1454	(<i>E</i>)- β -Farnesen	7,6
33.	1462 1464	Kabreuva oksit B, β -Akoradien	0,3
34.	1484	D-Germakren	1,9
35.	1500	Bisiklogermakren	0,1
36.	1505	β -Bisabolen	0,3
37.	1521	β -seskifellandren	3,0
38.	1544	β -Kalakoren	0,3
39.	1561	(<i>E</i>)-Nerolidol	0,7
40.	1570	Dendrolasin	0,5
41.	1577	Spathulenol	0,6
42.	1582	Karyofillen oksit	0,2
43.	1594	Salvial-4(14)-en-1-one	0,2
44.	1685	β -Bisabolol	0,7
45.	1712	Kurkunem-15-al	0,1
		Toplam	92,9

* K.I.: Kovats Indeks, referans alınarak ve DB-5 non-polar kolon kullanılarak elde edildi.

& İz miktarda: %0.07 den düşük değerler.

Achillea biserrata uçucu yağ örneğinin GC-MS analizleri sonucunda toplam 45 pik saptandı. Bu piklerin uçucu yağın % 92.9' unu oluşturmaktadır (Tablo 3.3). Uçucu yağın ana bileşenlerinin sırasıyla kamfor (% 19.4), borneol (% 17.1), bornil asetat (% 7.9), (*E*)- β -farnasen (% 7.6), okaliptol (% 12.8), kamfen (% 4.8), terpinen-4-ol (% 3.7), β -seskifellandren (% 3), D-germakren (% 1.9), β -terpinol (% 1.8), β -pinen (% 1.3), β -pinen (% 1.2) ve β -terpinen (% 1.1) olduğu sonucuna varıldı. Ana bileşenlerin % oranları Şekil 12'de grafik halinde sunulmuştur.



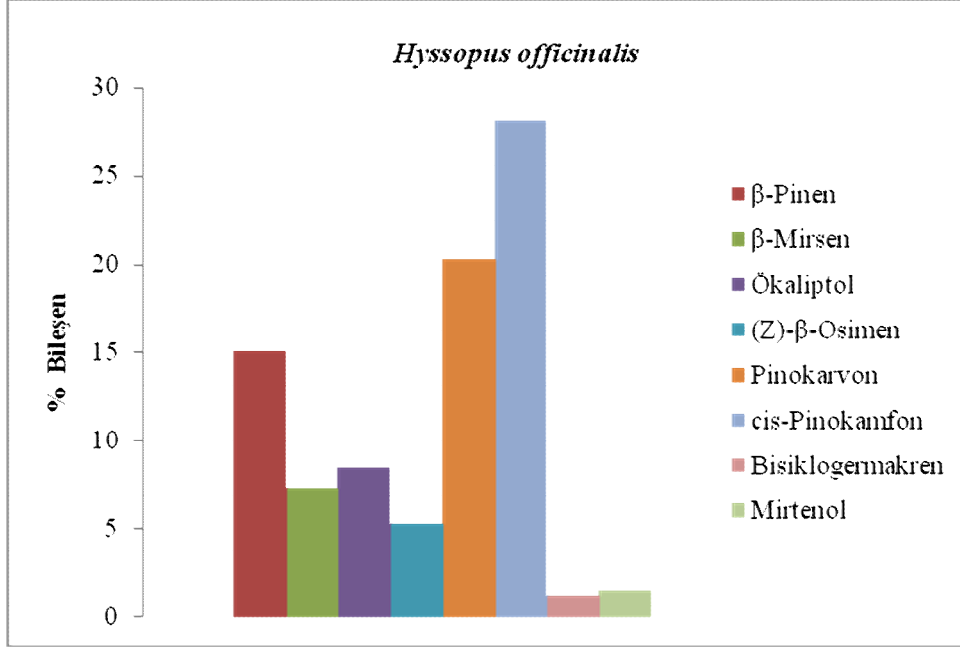
Şekil 12. *Achillea biserrata* uçucu yağının ana bileşenlerinin % miktarları

Hyssopus officinalis uçucu yağ içeriğinin GC-MS analizleri sonucunda toplam 32 pik saptandı. Bu pikler uçucu yağın % 94,3'ünü oluşturmaktadır. Uçucu yağın ana bileşenlerinin sırasıyla *cis*-pinokamfon (%28,1), pinokarvon (%20,3) ve β -pinen (%15,1), okaliptol (%8,5), β -mirsen (%7,3), mirtenol (%1,5), bisiklogermakren (%1,2) yağı oluşturan ana bileşenleri olduğu sonucuna varıldı ve Şekil 12 'de grafik halinde sunuldu.

Tablo 6. *Hyssopus officinalis* 'in uçucu yağ bileşenleri

Pik No	K.I.*	Bileşen	%
1.	924	β -Tujen	0,1
2.	932	β -Pinen	0,8
3.	946	Kamfen	İz ^{&}
4.	969	Sabinen	0,6
5.	974	β -Pinen	15,1
6.	988	β -Miyirsen	7,3
7.	1008	β -3-karen	0,1
8.	1020	<i>p</i> -Simen	0,2
9.	1026	Ökalyptol	8,5
10.	1032	(Z)- β -Osimen	5,3
11.	1044	(E)- β -Osimen	0,3
12.	1054	β -Terpinen	0,3
13.	1065	<i>cis</i> -Sabinee hidrat	0,1
14.	1086	Terpinolen	İz
15.	1095	Linalool	0,1
16.	1112	<i>trans</i> -Tujon	0,2
17.	1135	Pinokarveol	0,3
18.	1158	<i>trans</i> -Pinakamfon	0,6
19.	1160	Pinokarvon	20,3
20.	1172	<i>cis</i> -Pinokamfon	28,1
21.	1186	β -Terpineol	0,5
22.	1194	Mirtenol	1,5
23.	1241	Karvakrol metil eter	0,1
24.	1289	Timol	0,6
25.	1298	Karvakrol	0,1
26.	1335	β -Elemen	0,1
27.	1417	β -Karyofillen	0,7
28.	1452	β - Karyofillen	0,1
29.	1484	D-Germakren	0,1
30.	1500	Bisiklogermakren	1,2
31.	1577	Spatulenol	0,9
32.	1582	Karyofillen oksit	0,1
		Toplam	94,3

* K.I.: Kovats Indeks, referans alınarak ve DB-5 non-polar kolon kullanılarak elde edildi. [&] İz miktarda: %0.07 den düşük değerler.

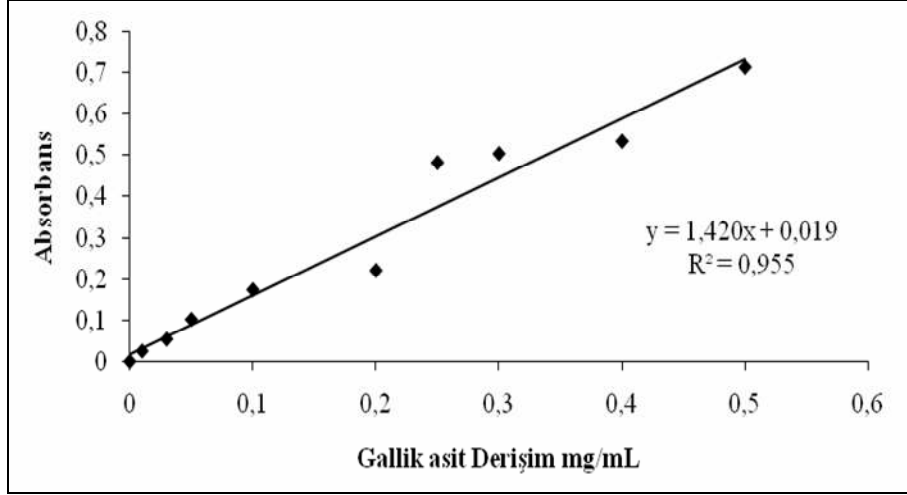


Şekil 13. *Hyssopus officinalis* uçucu yağının ana bileşenlerinin % miktarları

3.4. Fenolik Bileşen Analiz Bulguları

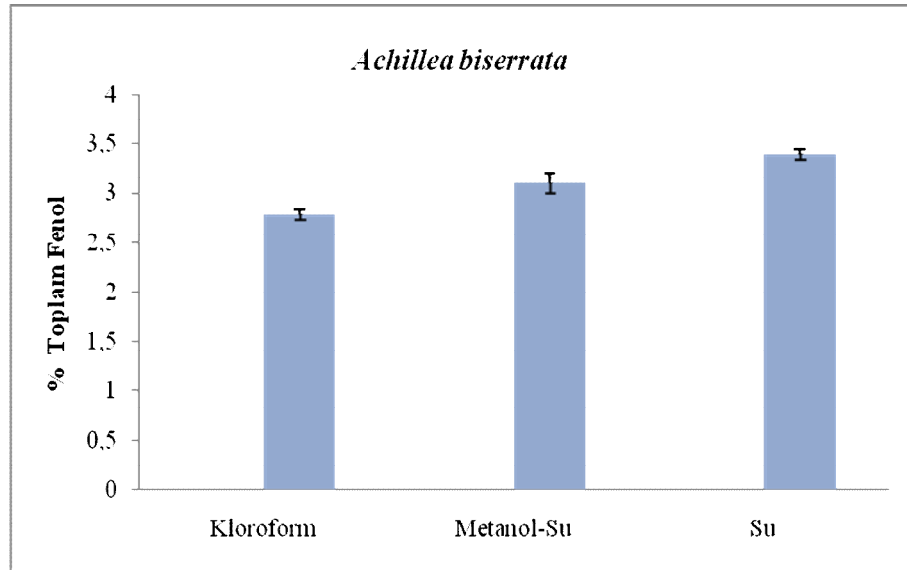
3.4.1. Toplam Fenol Miktarı

Bölüm 2'nin 2.6.1. kısmında belirtilen yöntem izlenerek tüm özütlerde toplam fenolik içeriği Folin Ciocalteu yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemde fenolik bileşikler galik asit eşdeğeri olarak hesaplanmaktadır. Bu amaçla 0- 0,6 mg/mL derişim aralığında galik asit standartlarıyla bir kalibrasyon grafiğı oluşturuldu. Her çalışma öncesinde standart kalibrasyon grafiğı hazırlanmıştır (Şekil 3.19). Elde edilen verilerin regresyonu ile doğru denklemi ($y = 1,4209x + 0,0198$) ve regresyon katsayısı ($R^2 = 0,955$) hesaplanmıştır. Şekil 14'deki grafikten yararlanılarak hesaplamalar yapıldı. Elde edilen veriler Şekil 15 ve Şekil 16'da sunuldu.



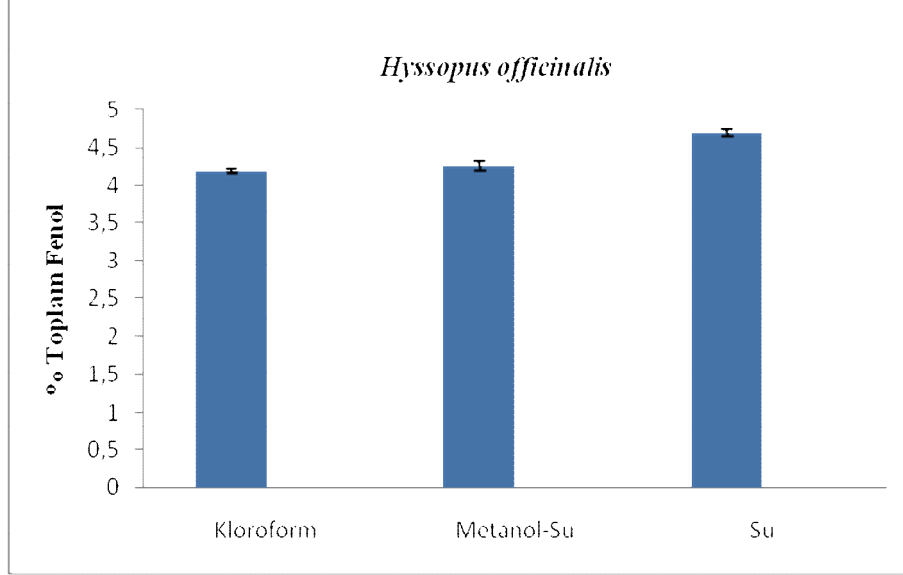
Şekil 14. Gallik asit derişim absorbans grafiği

Toz halindeki bitkisel materyallerin, kloroform, su ve metanol-su özütlerinin stok çözeltileri (5mg/mL) metanol de çözümlenerek test çözeltileri hazırlandı. Spektrofotometrik bir yöntem olan Folin–Ciocalteu yöntemiyle toplam fenol miktarını belirlemek için artan derişimlerde gallik asit standartları kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. Özütlerin 760 nm ölçülen absorpsiyon verileri kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemden kullanılarak özütlerin % toplam fenolik içerikleri hesaplandı. *A.biserrata* için elde edilen veriler Şekil 15’de, *H.officinalis* için elde edilen veriler ise Şekil 16’da verilmiştir.



Şekil 15. *Achillea biserrata* özütlerinin % toplam fenol miktarları

Achillea biserrata'nın su özütünde toplam fenol miktarı % 3,39 iken kloroform özütünde % 2,78 olarak bulunmuştur.

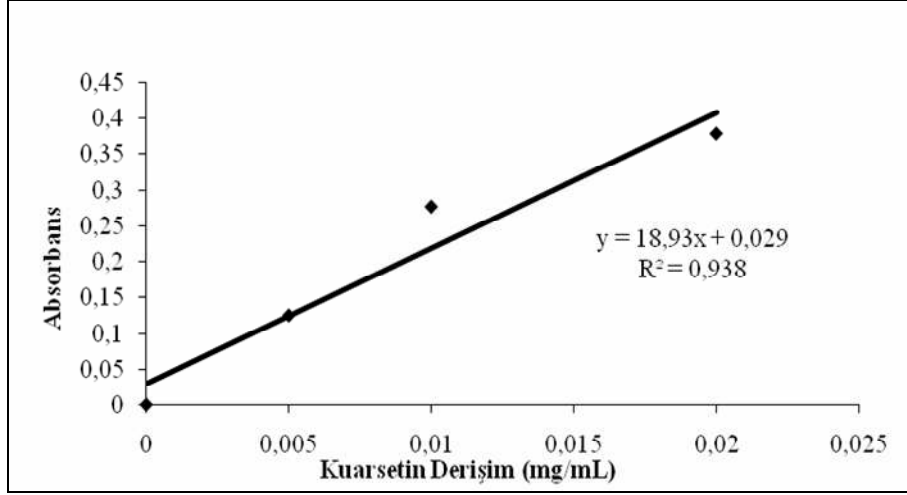


Şekil 16. *Hyssopus officinalis* özütlerinin % toplam fenol miktarları

Hyssopus officinalis'in su özütünde toplam fenol miktarı % 4,70 iken kloroform özütünde % 4,19 olarak bulunmuştur.

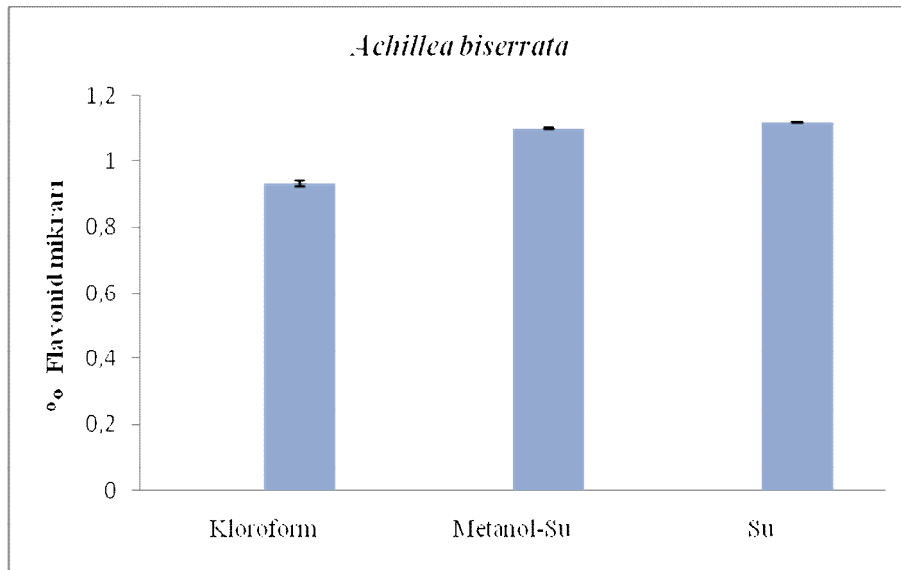
3.4.2. Flavonoid Miktarı

Antioksidan aktivite testlerinde aktif bulunan özütlerde toplam flavonoid miktarları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar bölümü, 2.6.2 kısmında belirtilen yönteme göre önce 0-0,025 mg/mL derişim aralığında hazırlanan kuarsetin standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon grafiğı hazırlandı. Şekil'deki verilerden elde edilen kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi ($y=18,931x + 0,029$) ve regresyon katsayısı ($R^2=0,9389$)



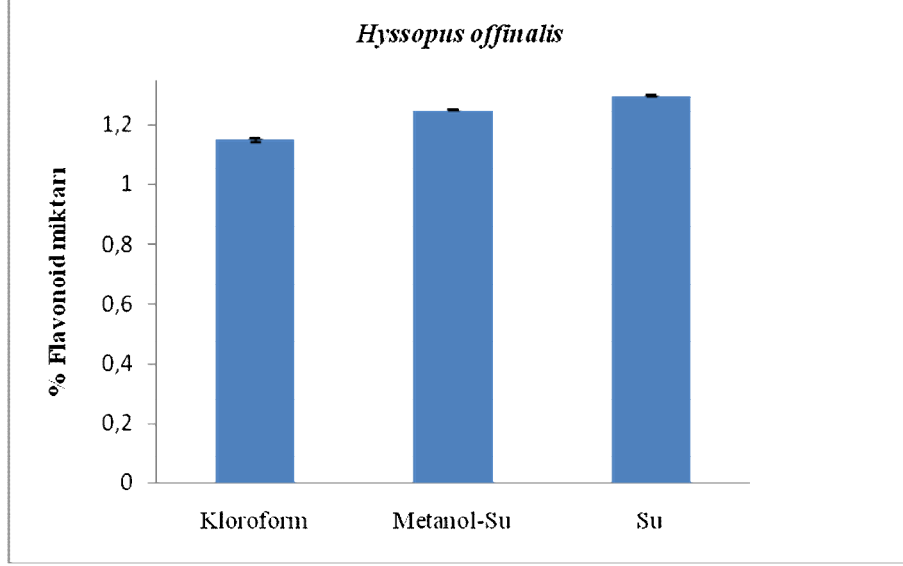
Şekil 17. Kuarsetin derişim absorbans grafiğı

Antioksidan testlerinde aktivite gösteren bitkisel materyallerin, kloroform, su ve metanol-su özütleri stok çözeltileri (4mg/mL) hazırlandı ve aynı yöntemle test edildi. Artan derişimlerde kuarsetin standartları kullanılarak kalibrasyon grafiğı elde edildi. Her bir özütten 250 µL'lik kısımlar tüplere alınarak üzerine 750 µL $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ eklendikten sonra karanlıkta 10 dk. bekletildi ve 430 nm' deki absorbsiyonları ölçüldü. Özütler için elde edilen absorbsiyon verileri kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklemden yararlanılarak özütlerin flavonoid miktarı ve % flavonoid değerleri hesaplandı. *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* için elde edilen veriler Şekil 18 ve Şekil 19' da verilmiştir.



Şekil 18. *Achillea biserrata* özütlerinin % flavonoid miktarları

Achillea biserrata özütlerinde flavonoid değerleri % 0,93-1,12 aralığında değişmekte olup en yüksek flavonoid içeriği su özütünde bulunmuştur.

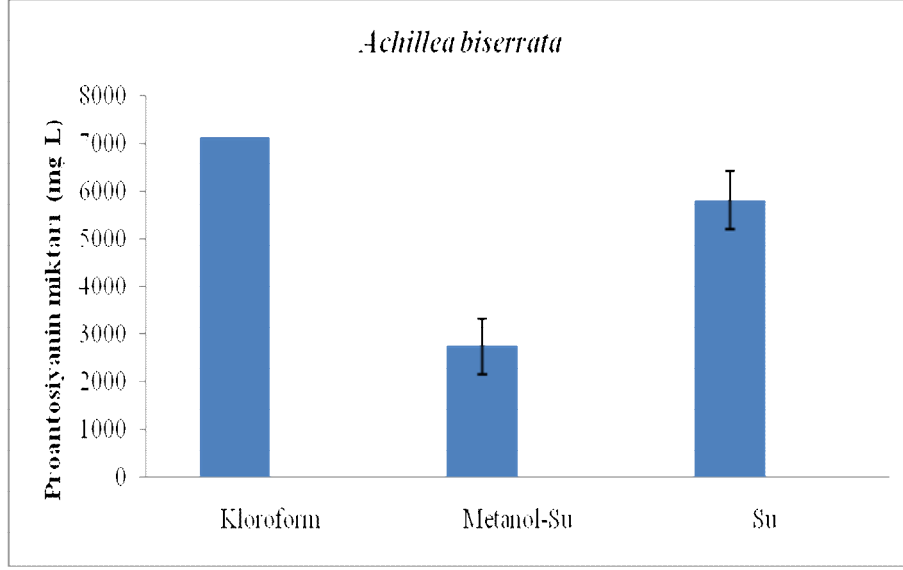


Şekil 19. *Hyssopus officinalis* özütlerinin % flavonoid miktarları

Çalışılan özütlerde flavonoid değerleri % 1,15-1,30 aralığında değişmektedir. Metanol-su özütünün içeriği daha yüksek bulunmuştur.

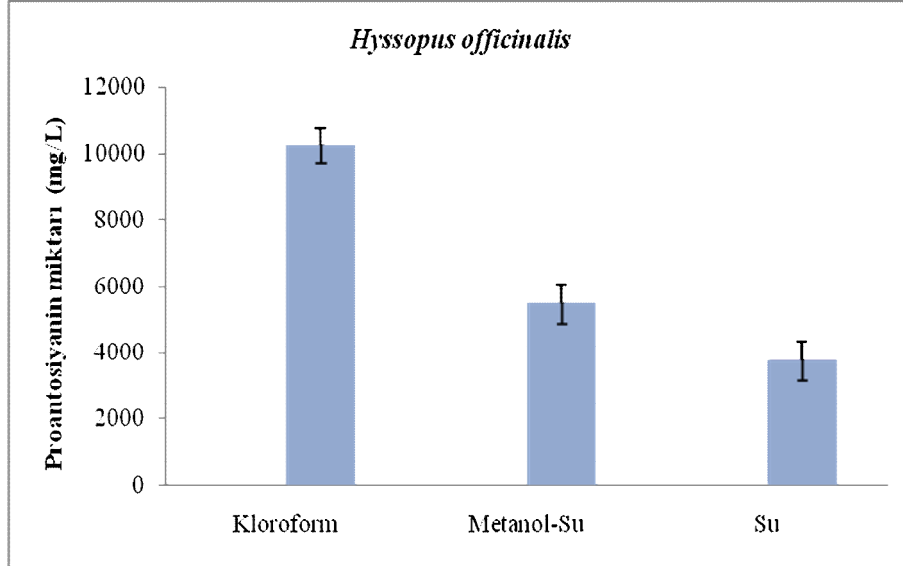
3.4.3. Proantosiyanidin Miktarı

Bölüm 2, kısım 2.6.3' de detayları verilen ve bu yöntem için tanımlanan denklem kullanılarak proantosiyanidin miktarları mg/L olarak belirlenmiştir. *Achillea biserrata*'nın kloroform, metanol-su, su özütleri için elde edilen veriler Şekil 20'de, *Hyssopus officinalis* özütleri için elde edilen veriler Şekil 21'de görülmektedir.



Şekil 20. *Achillea biserrata* özütlerinin proantosiyanın miktarları

Proantosiyanın içeriği en yüksek olan kloroform özütü (7125 mg/L) iken bunu metanol-su özütü (2733,33 mg/L) ve su özütü (5808,33 mg/L) içermektedir.



Şekil 21. *Hyssopus officinalis* özütlerinin proantosiyanın miktarları

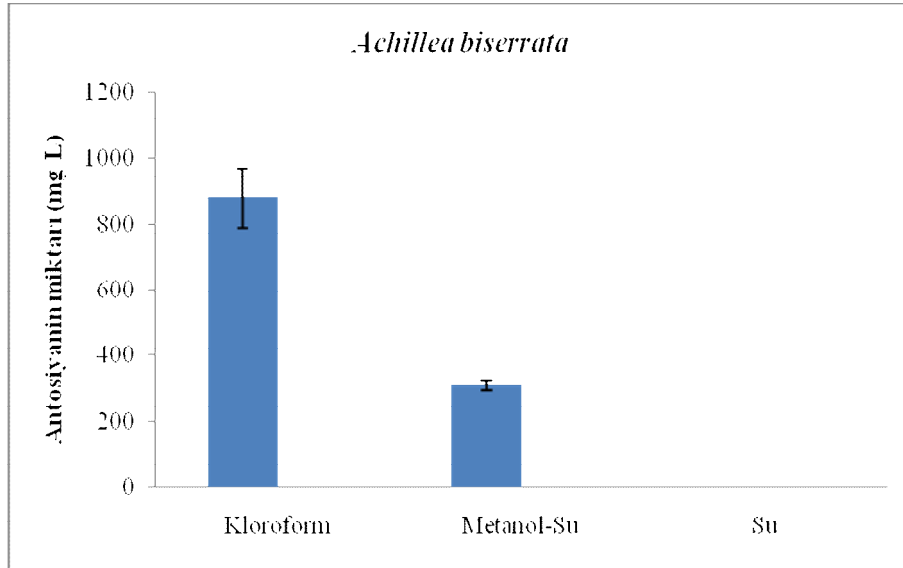
Hyssopus officinalis kloroform özütünde proantosiyanın oldukça yüksek olmasına karşın (10250 mg/L) diğer özütlerde oldukça düşük bulunmuştur.

3.4.4. Antosiyanin Miktarı

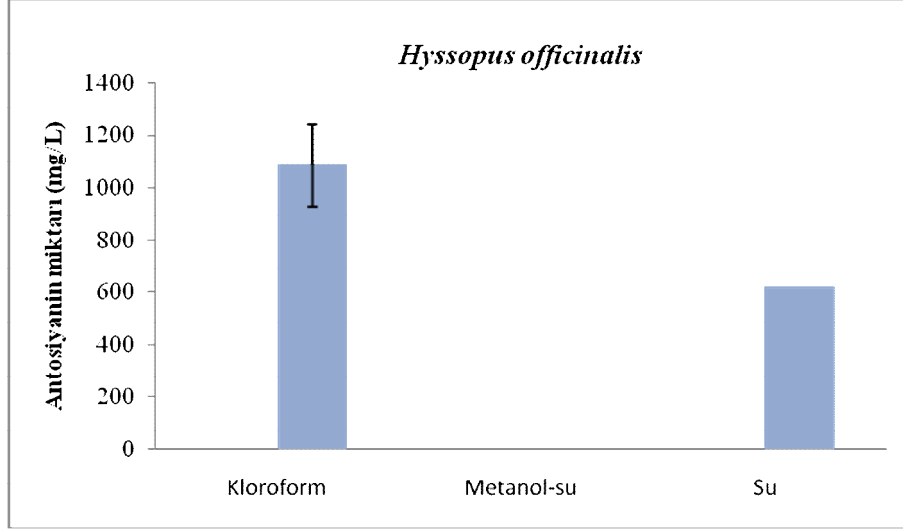
Antioksidan özelliklerle doğrudan bağlantılı bileşenlerden olan antosiyaninlerin belirlenmesinde Bölüm 2’de belirtilen yöntem ve hesaplamalar kullanılmıştır. Proantosiyanin analizinde olduğu gibi çalışılan özütler için ilgili hesaplama eşitliğinden antosiyanin miktarı mg/L olarak hesaplanmıştır.

Achillea biserrata için elde edilen verilerde (Şekil 22) kloroform özütünde 879,33 mg/L antosiyanin mevcutken metanol-su özütünde bu değer 310 mg/L düşmektedir. Su özütünde ise antosiyanin belirlenmemiştir.

Şekil 23’de *Hyssopus officinalis* için elde edilen veriler incelendiğinde yine kloroform özütünün en yüksek antosiyanin içeriğine sahip olduğu (1087,06 mg/L) görülmektedir. Su fazınında azımsanmayacak oranda (621,20 mg/L) antosiyanin bulunmasına rağmen metanol-su özütünde hiç belirlenememiştir.



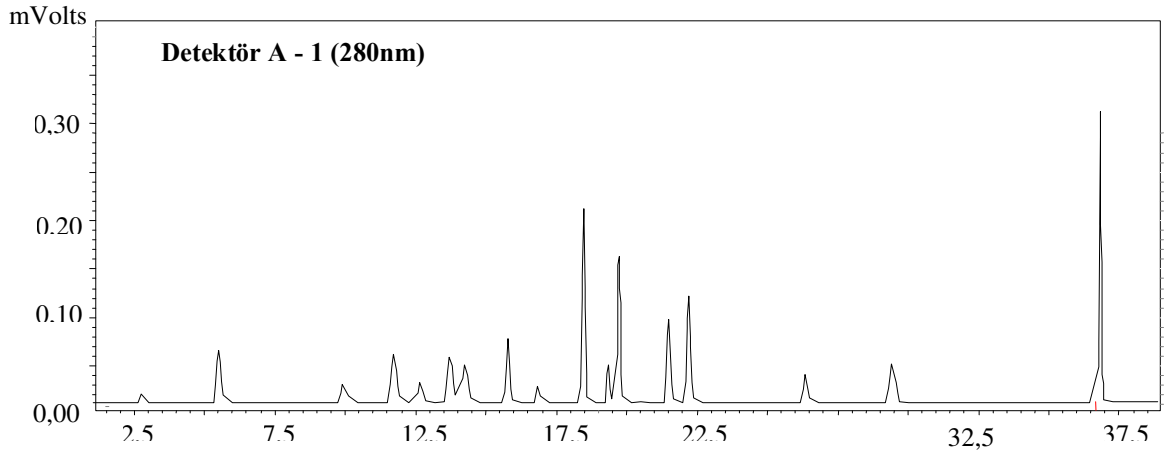
Şekil 22. *Achillea biserrata* özütlerinin antosiyanin miktarları



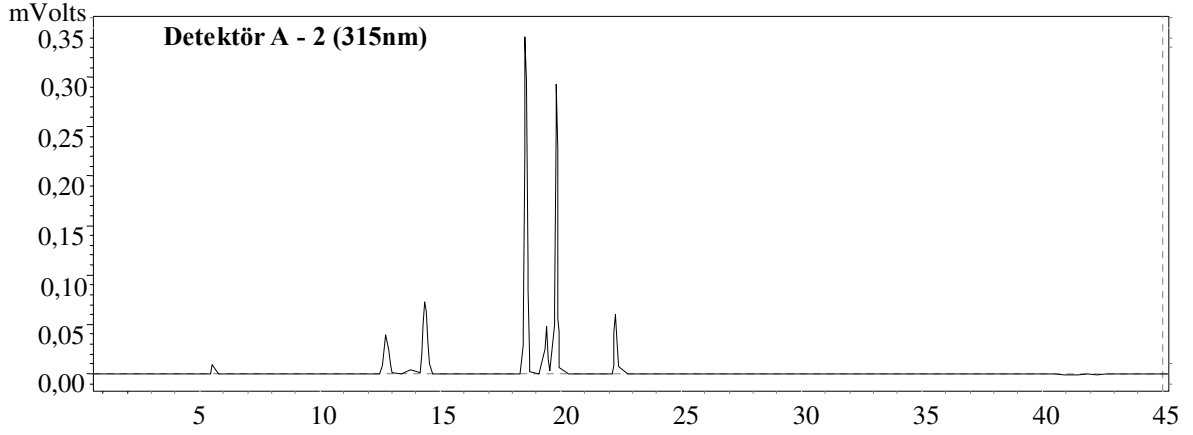
Şekil 23. *Hyssopus officinalis* özütlerinin antosiyanin miktarları

3.4.5. HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analiz Bulguları

Bazı fenolik bileşikler 280 nm’de çalıştırılan dedektörle belirlemek mümkün olmadığında dedektör hem 280 hem de 315 nm’de çalıştırılarak kromotogramlar elde edilmiştir. Mevcut fenolik türlerin standartları ve standart çözeltinin, asetik asitin sudaki % 2’lik çözeltisi (A) ve 80:20 asetonitril/su çözeltisi (B) çözeltilerinin karışımı hareketli faz ve kolondaki kromotogramları her iki dalga boyunda da alınarak çalışılan türlerdeki bileşenlerin nicel ve nitel analizleri yapılmıştır. Standart çözelti içindeki fenolik bileşenler ve derişimleri Tablo 7’ de verilmiştir. 280 ve 315 nm’de ölçülen standart karışımının HPLC kromotogramı Şekil 24 ve Şekil 25’de görülmektedir.



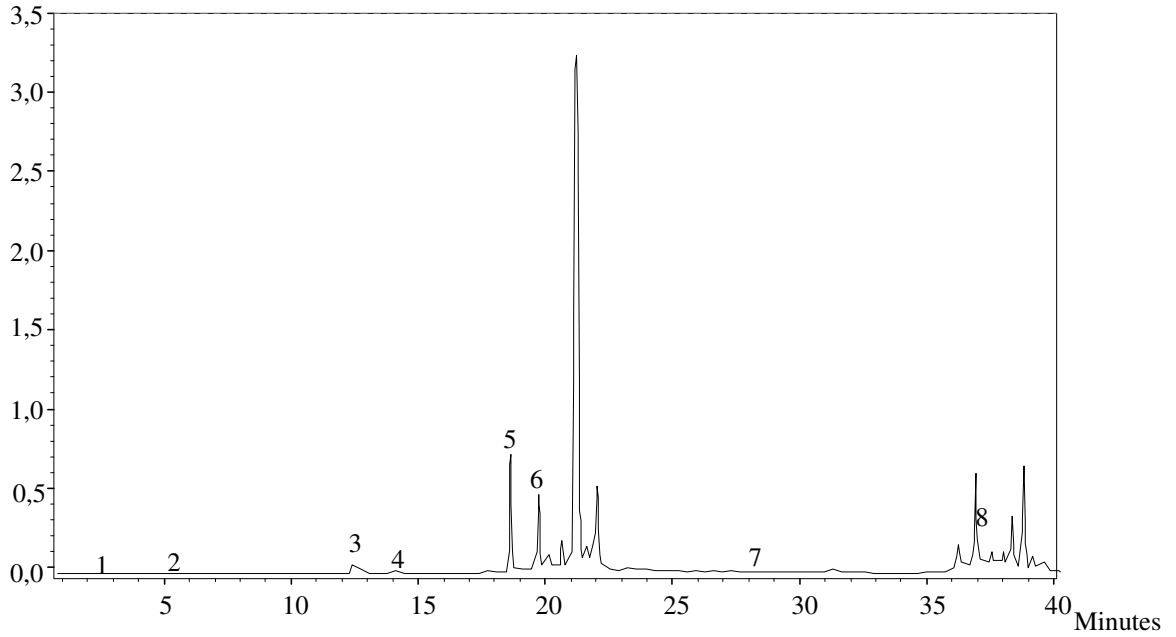
Şekil 24. HPLC 280 nm’ deki fenolik standart pikleri



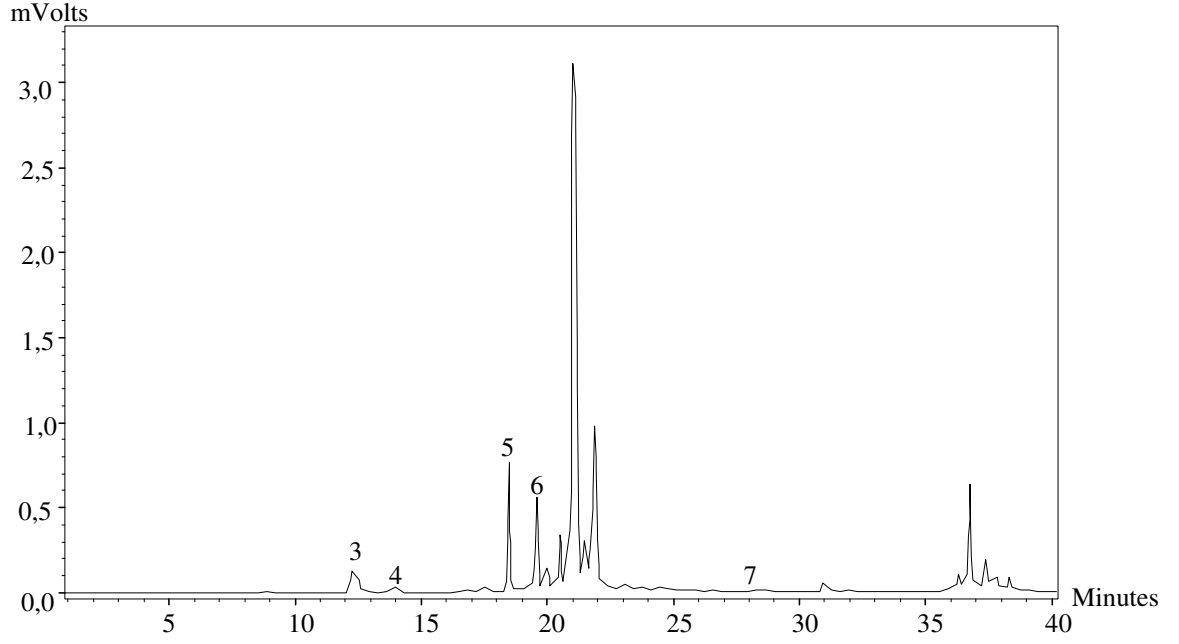
Şekil 25. HPLC 315 nm’ deki fenolik standart pikleri

Gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kateşin, klorojenik asit, vanillik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferrulik asit, benzoik asit, rutin, *o*-kumarik asit, 2,4-*cis,trans*-absisik ve *trans*-sinnamik asit ve kuersetin standart olarak ve iç standart olarak (IS) propil paraben kullanıldı.

Achillea biserrata ve *Hyssopus officinalis*’in detayları Bölüm 2’de verilen HPLC yöntemiyle fenolik bileşen analizi yapılarak aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

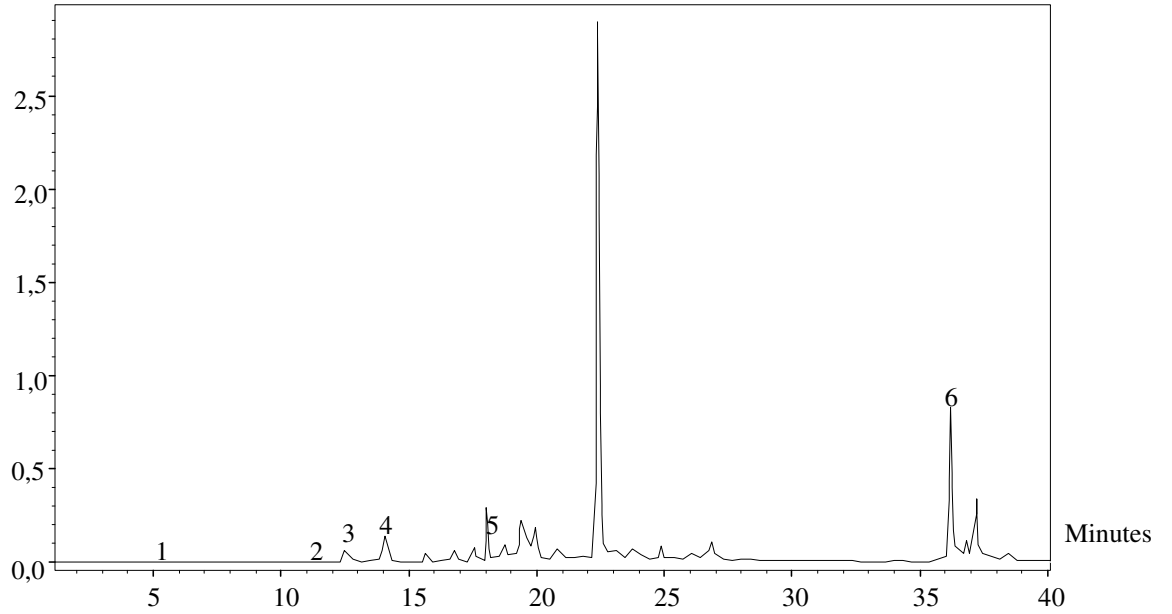


Şekil 26. *Achillea biserrata*’nın 280 nm’ deki kromatogramı

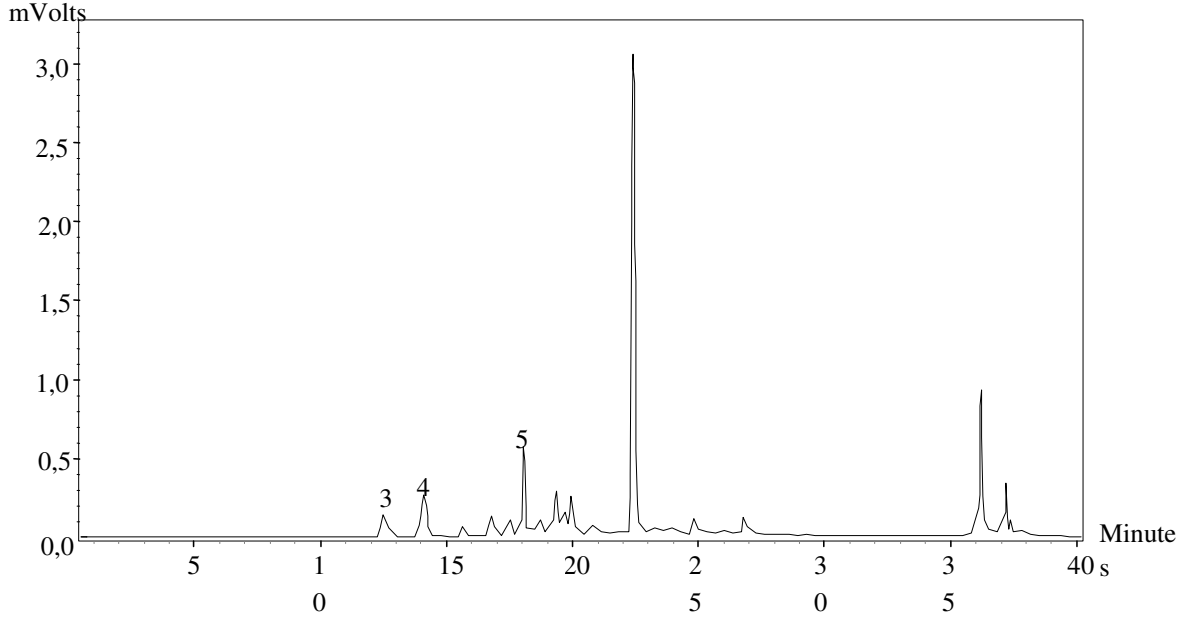


Şekil 27. *Achillea biserrata*'nın 315 nm' deki kromatogramı, (1) Gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) klorojenik asit, (4) kafeik asit, (5) *p*-kumarik asit, (6) ferrulik asit, (7) kuersetin, (8) propil paraben

Aynı yöntemle elde edilen *H.officinalis* özütünün 280 nm' deki HPLC kromotogramı ise Şekil 28' de 315 nm' deki HPLC kromotogramı ise Şekil 29' de verilmiştir.



Şekil 28. *Hyssopus officinalis*'in 280 nm' deki kromatogramı



Şekil 29. *Hyssopus officinalis*'in 315 nm'deki kromatogramı, (1) Protokatekuik asit, (2) Kateşin, (3) Klorojenik asit, (4) Kafeik asit, (5) *p*-Kumarik asit,(6) Propil paraben.

Çalışılan her iki türün HPLC analizi ile belirlenen fenolik bileşenlerin miktarları Tablo 7' de görülmektedir.

Tablo 7. *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis*'in fenolik bileşen içerikleri

FENOLİK BİLEŞENLER	<i>Achillea biserrata</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>
Gallik asit	34,78	-
Protokatekuik asit	177,83	5,67
p-OH Benzoik asit	-	-
Kateşin	-	2,99
Klorojenik asit	164,78	166,21
Vanillik asit	-	-
Kaffeik asit	12,32	111,09
Şringik asit	-	-
Epikateşin	-	-
p-Koumarik asit	86,08	6,95
Ferulik asit	-	-
Benzoik asit	-	-
Rutin	-	-
o-Koumarik asit	-	-
Absisik asit	-	-
t-Sinamik asit	-	-
Kuersetin	1,90	-

*Sonicasyon $\mu\text{g/g}$ kuru bitki olarak verilmiştir.

Achillea biserrata’ da en fazla miktarda protokatekuik asit (177,83 µg/g) en az miktarda kuarsetin (1,90 µg/g), *Hyssopus officinalis*’de ise en fazla miktarda klorogenik asit (166,21 µg/g) , en az miktarda kateşin (2,99 µg/g) fenolik bileşenlerinin bulunduğu Tablo 7’de verilmiştir.

4. TARTIŞMA

• Özüt Verimleri

Achillea biserrata ve *Hyssopus officinalis*'den Bölüm 2'de anlatıldığı şekilde farklı çözücüler ve özütleme yöntemi kullanılarak beş farklı özüt elde edildi. Elde edilen özütlerin her biri için antioksidan aktivite kapasiteleri araştırıldı ve kromatografik analizleri yapıldı. Elde edilen özütlerin gerek antioksidan aktivite gerekse içerik analizlerinden elde edilen veriler Bölüm 3'de nitel ve nicel olarak değerlendirildi.

Özütlerin her birinden elde edilen verimler Tablo 3'de sunulmuştur. Tablodan görüldüğü gibi çalışılan her iki türde de en iyi verim ardışık su özütlemesi ve doğrudan metanol-su özütlemesi ile elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan otomatik özütleme sistemi ile her bir çözücünün bitkisel materyalden geçiş sıcaklığı ve süresi otomatik olarak kontrol edilmektedir. Bu nedenle klasik sokslet özütleme sistemlerinde daha zor olan sıcaklık kontrolü daha başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Ayrıca tüm sistem kapalı devre çalıştığından çözücü veya özütlenen uçucu bileşenlerin kaybı da minimuma indirgemektir. Bu sistemin bir başka avantajı ise özütleme sonrası çözücünün sistem tarafından ayrılarak tekrar kullanılabilmesi ve ikincil bir çözücüyü giderme (evaporasyon) işlemine gerek duyulmamasıdır. Özüt verimindeki değişkenlikler, çözücünün polar veya apolar olmasına bağlıdır. Ardışık özütleme işlemi Tablo 2'de yazılan sıraya göre yapıldığında, kullanılan çözücülerin polaritesi apolardan polara doğru gitmektedir. Otomatik özütleme sisteminde hekzandan başlayarak en önce en apolar bileşenler özütlenmiştir. Daha sonra bitkisel materyal metanol ile özütlenerek elde edilen özüt kendi içinde kısmen apolar olan kloroform ve çok polar olan su ile kısımlandırılmıştır. Bu durumda kullanılan en son çözücü sistemi sudur ve bitkilerden elde edilen verilere bakıldığında her iki bitki türü için en yüksek özüt verimi (%) sağlamıştır. Yüksek polaritesi sebebiyle en polar bileşenler ve organik çözücülerde ayrılamayan türler su özütünde toplanmıştır.

Metanol-su özütlemesi ise herhangi bir apolar çözücü kullanılmadan geleneksel özütleme yöntemi olarak kullanılmıştır. Dolayısıyla verilerin değerlendirilmesinde çalışılan türler için en uygun özütleme sistemi de tartışılabilir.

Tablo 3'deki % özüt verimleri bu yönden değerlendirildiğinde ardışık özütleme sonrasında elde edilen verimler çok daha yüksektir. Hekzan gibi apolar bir çözücü bitkideki apolar bileşenleri ayırırken özütlenen bitkisel materyali de tahrip etmekte ve

bileşenler bir sonraki aşamada daha kolay bir şekilde çözücü ortamına alınabilmektedir. Hekzan, kloroform ve su özütlerinin toplam verimleri aynı kütleli materyalin metanol-su ile özütlenmesinde elde edilen verimlerden çok daha yüksektir. Uçucu yağ verimi % 0.01 civarında olanlar zayıf, % 0.01 ila 1.0 olanlar orta, % 1.0 den büyük olanlar ise zengin olarak sınıflandırılmıştır (Yıldız, 2004). Bu kritere göre *Achillea biserrata*'nın uçucu yağ özütü verim bakımından “orta derecede zengin”, *Hyssopus officinalis*'in uçucu yağ özütü zengin olarak tanımlanabilir. *Achillea* türlerinde uçucu yağ verimi genellikle düşüktür. Oysaki *Hyssopus officinalis*' in tıbbi kullanımı yüksek uçucu yağ oranı ve yağ bileşenlerinin ürettiği özel aromalardan da kaynaklanmaktadır.

- Antioksidan Aktivite Testleri
- DPPH Testi

Her iki bitki türü için de beş farklı özütün antioksidan aktivite testleri Bölüm 2’de anlatıldığı şekilde uygulandı. *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis*'in kloroform, su, metanol-su özütlerinin DPPH yöntemi uygulanarak serbest radikalini temizleme yönünden derişimlere karşı % inhibisyon grafiklerinden yararlanılarak % 50 inhibisyon sağlayan derişimler karşılaştırmalı olarak Şekil 8 ve Şekil 9’da sunulmuştur. BHT’ nin DPPH yönteminde, % 50 inhibisyon sağlayan derişimleri de aynı şekil içinde verilmiştir. Özütlerden en yüksek aktiviteye sahip olanlar en düşük derişimde % 50 inhibisyon sağlayanlardır. Detaylı literatür araştırması göstermektedir ki pek çok *Achillea* türünün farklı yöntemlerle hazırlanan özütlerinde antioksidan aktivite testleri yapılmış ve bazılarında önemli derecede aktivite belirlenmiştir (Giorgi vd., 2009; Bozin vd., 2008; Alexandru vd., 2007; Nickavar vd., 2006; Conforti vd., 2005; Candan vd., 2003). Ancak bu çalışmada kullanılan *A. biserrata* türü için herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *A. millefolium* bu türlerden en fazla araştırılan türdür, Candan vd. tarafından hazırlanan çalışmada *A. millefolium*’un uçucu yağının IC₅₀ değeri 1,56 mg/ml, başka bir çalışmada metanol özütünün IC₅₀ değeri 49,43 µg/mL olarak rapor edildi (Nickavar vd., 2006).

H. officinalis ise tıbbi bir bitki türü olduğundan çok farklı aktivite testlerinde kullanılmıştır (Alexandru vd., 2007; Özer vd., 2006). DPPH yöntemi ile serbest radikal temizleme özelliği daha önce Özer vd. tarafından (2006) rapor edilmiş ancak bu çalışmada doğrudan sokslet yöntemiyle hazırlanan metanol özütleri kullanılmıştır. İlgili çalışmada metanol özütünün IC₅₀ değeri 117 µg/mL olarak rapor edildi. Bu çalışmada su özütünün IC₅₀ değeri 18,8 µg/mL bulunmuş ve literatür verisiyle karşılaştırıldığında su özütünün antioksidan aktivitesi daha yüksektir.

Achillea biserrata ve *Hyssopus officinalis*'in DPPH yöntemi ile serbest radikal süpürücü etkileri değerlendirildiğinde polar su özütleri yüksek aktivite göstermiştir. Farklı *Achillea* türleri ve *Hyssopus officinalis* ile yapılan önceki çalışmalar da bu bulguyu desteklemektedir (Sökmen vd., 2004; Özer vd., 2006). DPPH yöntemi sonucunda her ikisinin kloroform özütleri de radikal süpürücü aktivite göstermiş olsa da, su ve metanol-su fazları kadar güçlü değildir. Hekzan özütlerinde görülmeyen aktivite ile birlikte değerlendirildiğinde polar olmayan özütlerin radikal süpürücü etkilerinin olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Şekil 8 ve Şekil 9'dan elde edilen bulgulardan kloroform ve metanol-su özütlerinde serbest radikal temizleme aktivitesi pozitif kontrol BHT ile karşılaştırıldığında daha düşük iken su özütleri daha yüksektir. Ancak her iki türde de aktivite değerleri kloroform, metanol-su ve su özütleri sırasında artış göstermiştir.

Bir araştırmada, fenolik içeriğin tek başına yeterli olmadığı, radikal süpürücü etkide polar (suda çözünen) fenoliklerin çok daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Tepe vd., 2004). Polar tabiatlı fenolik bileşiklerin serbest radikaller üzerinde güçlü süpürücü etkileri çeşitli makalelerde vurgulanmıştır (Komali vd., 1999; Moller vd., 1999, Vardar-Ünlü, 2002, Sökmen vd., 2004). *Hyssopus officinalis*'in metanol özütünde polifenollerin, rosmarinik asit gibi fenolik asitlerin varlığı bu tip özütlerde güçlü antioksidatif etkinin sorumlusu olduğu rapor edilmiştir (Özer vd., 2006).

Bir başka çalışmada da çeşitli bitkisel fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite potansiyelleri, düşük yoğunlukla lipoproteinlerin oksidasyonunu inhibe etmelerine göre değerlendirildiğinde karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asitin güçlü aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir (Pearson vd., 1997). Bu nedenle aktivitenin polar fenolik bileşenlerden kaynaklandığı söylenebilir.

Achillea biserrata'nın uçucu yağ özütünün % 50 inhibisyon değeri 13,5 mg/mL iken *Hyssopus officinalis*'in uçucu yağ özütünün % 50 inhibisyon değeri 18,6 mg/mL olduğu bölüm 2'de sunulmuştur. 50 µL' nin üzerindeki miktarlarda IC₅₀ değerleri bulunduğundan bitkilerin uçucu yağlarının antioksidan aktiviteleri çok zayıftır. *Hyssopus officinalis* için daha önceden yapılan çalışmada bu bulguyu desteklemektedir (Özer vd., 2006). Özer ve arkadaşları tarafından (2006) rapor edilen bu çalışmada *Hyssopus officinalis*'in metanol özütünün IC₅₀ değeri 117 µg/mL, uçucu yağ özütünün serbest radikal temizleme aktivitesi ise inaktif olarak belirtildi.

- β -Karoten Renk Açılım Testi-Spektrofotometrik Yöntemi

Antioksidan aktivitesinde uygulanan diğer bir test yöntemi de β -karoten renk açılımı-spektrofotometrik yöntemidir. Bu yöntemde β -karoten' in karakteristik sarı renginin korunumu esas alınmıştır.

Achillea biserrata ve *Hyssopus officinalis* için % BAA değerleri sırasıyla Şekil 10 ve Şekil 11'de sunulmuştur. Lipid oksidasyonun önlenme derecesini göstermede önemli bir gösterge olan β -karoten renk açılım testinde *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis*'in apolar hekzan ve kloroform özütleri, polar özütler ve uçucu yağ örneklerine göre daha yüksek aktivite göstermiştir. *Achillea biserrata*'nın ve *Hyssopus officinalis*'in özütlerinde en yüksek aktivite kloroform özütünde, en düşük aktivite ise su özütlerinde tespit edilmiştir. Ancak burada hekzan ve kloroform özütlerinin sarı-yeşil renklerinin test ortamındaki β -karoten' in sarı rengi ile girişim yapma olasılığının da göz ardı edilmemesi gerekir. Konjuge dienlerin oluşumunu inhibe eden türler DPPH serbest radikal temizleyen türlerin tersine apolar bileşenlerdir. Literatürdeki çalışmalardan birinde *Hyssopus officinalis*'in metanol özütünün β -karoten linoleik asit testi sonucunda % 40 inhibisyon orta derecede aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Özer vd., 2006).

Sonuç olarak, antioksidan bileşenlerin seçimli olarak özütlenmesi için yukarıda ayrıntılı olarak tartışılan özütleme yöntemleri genel hatlarıyla iki başlık altında toplanabilir. Serbest radikal temizlemede daha çok polar çözücülerle yapılan özütleme yöntemi uygun görülmektedir. Lipit oksidasyonunun veya oksidasyon ürünlerinin engellenmesinde ise daha çok apolar çözücülerin kullanılması uygundur.

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 *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis*'in su, metanol-su, kloroform özütleri serbest radikal temizlemede gösterdikleri aktivite, 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. 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.

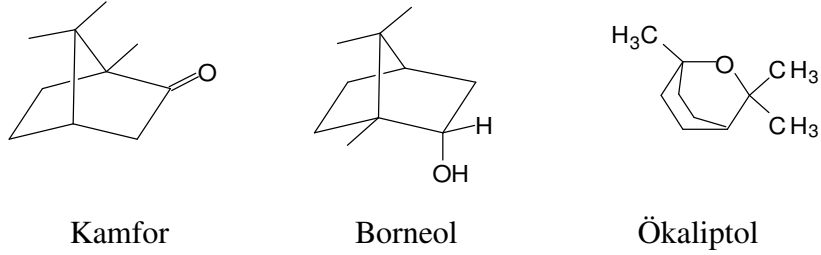
- Uçucu Yağların Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analizleri

Achillea türlerinin uçucu yağlarının çoğu önemli miktarda ökaliptol, kamfor, borneol ve β -terpinol içerir (Ünlü vd., 2002; Senatore vd., 2005; Rustaiyan vd., 1998; Chalchat vd., 1999; Simiv vd., 2000). Bazı türlerin uçucu yağlarında ise ana bileşenler olarak kamfen, piperiton, β -tujon rapor edilmiştir. (Küsmenoğlu vd.,1995; Chalchat vd.,2000). *Achillea* türlerinde ana bileşenler ökaliptol, kamfor, ve β -terpinol bulunmuştur. *Achillea* türlerine ait uçucu yağların GC, GC-MS analizleri monoterpenlerin zenginliğine işaret etmektedir. Genellikle uçucu yağların % 90'ı monoterpenlerden ibarettir. Daha az sıklıkta seskiterpenlere de rastlanır.

Herhangi bir antioksidan aktivite sergilememesine rağmen *Achillea biserrata* uçucu yağının GC-MS analizi ile yağ içeriğinin % 92,9'si belirlenmiştir. % 7,1'lik kısmı çok eser düzeydeki bileşenlere karşılık gelmekte olup (< %0.07) belirlenmesi yapılmamıştır. Yağ içeriğine bakıldığında ana bileşenleri sırasıyla en büyük oranda kamfor (% 19.4), borneol (% 17.1), ökaliptol (% 12.8), bornil asetat (% 7.9), (*E*)- β -farnesen (% 7.6), kamfen (% 4.8), terpinen-4-ol (% 3,7), β -seskifellanderen (% 3), D-germakren (% 1,9), β -terpineol (% 1,8), β -pinen (% 1,3), β -pinen (% 1,2) ve β -terpinen (% 1,1) bulunmuştur. Antioksidan analizlerine dair herhangi bir çalışma olmamasına rağmen *Achillea biserrata*'nın uçucu yağı GC/MS analizleri literatürde mevcuttur. *Achillea biserrata* ile yapılan bir çalışmada, Trabzon- Gümüşhane arasında toplanan örneklerden % 0,07 uçucu yağ verimi elde edilmiş, uçucu yağ içeriğinin ana bileşeninin kamfor (%36,80) olduğu, bunu ökaliptol (% 19,35) ve kamfen (%16,41) izlemiştir. Spathulonol (%3,49), α -pinen (%2,8), borneol (%2,46) ve terpinen-4-ol (%2,18) az miktarda bulunmuştur (Azaz vd., 2009). İçerik bakımından genel anlamda uyum göstermekle beraber, bileşenlerin bağıl miktarlarında farklılıklar göstermektedir. Literatürdeki başka bir çalışmada bir grup *Achillea* türünün uçucu yağlarının (*A. biserrata*, *A. clypeolata*, *A. crithmifolia*, *A. filipendulina*, *A. macrophylla*, *A. pannonica*, *A. pyrenaica*, *A. sibirica*, *A. taygetea* ve *A. Tenuifolia*) GC/MS analizleri rapor edilmiştir. Yağ içeriğinde karvakrol ile birlikte birçok mono ve

seskiterpenlerin bulunduğu, D-germakren ve bisabolen oksit başlıca seskiterpenler iken β -pinen, ökaliptol ve kamforun ise ana monoterpen olduğu belirtilmiştir (Maffei vd., 1993).

Genel anlamda monoterpen hidrokarbonlar ve oksijenli monoterpenler yağın içeriğini oluşturmaktadır. Yağ içinde bulunan önemli bileşenlerin açık formülleri Şekil 30’da gösterilmiştir.



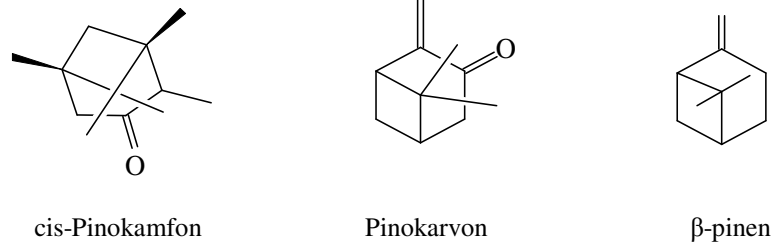
Şekil 30. *Achillea biserrata* uçucu yağında bulunan ana bileşenler

Hyssopus officinalis’in uçucu yağında artan yağ hacmi (veya derişiminde) serbest radikal temizleme etkinliğı gözlenmiş ancak 50 μ L ve üzerinde uçucu yağ gerektiren bu etki çok zayıf olarak değerlendirilmiştir. *Hyssop* türünün uçucu yağının bileşenleri ile ilgili birçok rapor yayınlanmıştır. *Hyssopus officinalis*’in ana bileşenleri pinokamfon, isopinokamhon, β -pinen, ökaliptol, mirtenol, linalool, pinokarvon, metil öjenol ve limonen olarak rapor edilmiştir (Özer vd., 2006). Ayrıca bu çalışmalar farklı örnekleme alanları veya genotiplerden elde edilen bitkilerin yağlarında kimyasal farklılıkların varlığını vurgulamıştır.

Hyssopus officinalis yağ içeriğı bakımından değerlendirildiğinde *cis*-pinokamfon (%28,1), pinokarvon (%20,3) ve β -pinen (%15,1) yağın %63,5’lik kısmını oluşturmaktadır, ökaliptol (%8,5), β -mirsen (%7,3), mirtenol (%1,5), bisiklogermakren (%1,2) yağı oluşturan ana bileşenlerdir. % 5,7’lik kısmı çok eser düzeydeki bileşenlere karşılık gelmekte olup (< %0.07) belirlenmesi yapılmamıştır. Bunların dışında miktarı %1’in altında olan diğer monoterpen ve oksijenli monoterpenler de bulunmaktadır. Gümüşhane’de toplanan *H.officinalis* örneklerinden % 1,13 (v/w) uçucu yağ verimi elde edilmiş ve uçucu yağının ana bileşenleri olarak pinokarvon (%36,3), isopinokamfon (%19,6), β -pinen (%10,6), ökaliptol (%7,2) ve pinokamfon (%5,3) bulunmuştur (Özer vd., 2006).

Literatürde belirtilen verilerle karşılaştırma yapıldığında hemen hemen aynı bölgeden toplanmış olan örneklerle (Özer vd., 2006) içerik bakımından çok büyük farklılıklar gözlenmemiştir. Ancak bileşenlerin oranları arasında çok önemli farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle cis-pinokamfon miktarı % 28 ve pinokarvon içeriği % 20 olarak bulunmuştur. Bu farklılığın örnekleme alanı farkı veya bitkilerin toplanma zamanlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yağ içinde bulunan önemli bileşenlerin açık formülleri Şekil 31’de gösterilmiştir.



Şekil 31. *Hyssopus officinalis* uçucu yağında bulunan ana bileşenler

- Toplam Fenol Miktarı

Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak özütlerin gallik asit eşdeğeri toplam fenolik içerikleri belirlenmiş olup *Achillea biserrata*’nın su özütünde % 3,39, metanol-su özütünde % 3,10, kloroform özütünde ise % 2,78 toplam fenolik madde bulunmuştur. DPPH testinde su özütünün aktivitesi metanol-su ve kloroform özütünden yüksek olduğu görülmektedir. Literatürde *Achillea* türlerinin ait bazı çalışmalarda metanol, etanol ve su özütlerinin toplam fenollerini araştırılmış ve antioksidan aktiviteleri yüksek olan özütlerin toplam fenol miktarlarının da yüksek olduğu bulunmuştur (Giorgi vd., 2009; Alexandru vd., 2007; Conforti vd., 2005). Elde edilen bulgular bu yönüyle literatürdeki çalışmalarla uyum içindedir.

Hyssopus officinalis’in su özütünde toplam fenol miktarı % 4,70 iken metanol-su özütünde % 4,26, kloroform özütünde % 4,19’dur. DPPH testindeki antioksidan aktiviteleri ile kıyasladığımızda toplam fenol miktarı yüksek olan su özütünde antioksidan aktivite de yüksek bulunmuştur. Hekzan ve kloroform ile apolar bileşiklerin ayrılmış olması su özütünde daha fazla polar fenolik bileşenin olacağını dolayısıyla da aktivite yüksek olur. Literatürdeki benzer bir çalışmada *H. officinalis* ve *A. millefolium*’un etanol ve su özütleri çalışılmış ve her iki bitkinin toplam fenollerini ile DPPH aktiviteleri arasında doğrusal bir

orantı bulunduğu rapor edilmiştir (Alexandru vd., 2007). Özer vd. (2006) tarafından *H. officinalis*'in metanol özütünün antioksidan aktivitesi ile toplam fenol miktarı arasında doğrusal bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Özer vd., 2006).

- Flavonoid Miktarı

Kuarsetin eşdeğeri flavonoid içerikleri belirlenmiş olup her iki tür için su ve metanol-su özütlerinin flavonoid miktarları Şekil 18 ve Şekil 19'da verilmiştir. Çalışmada *Achillea biserrata*'nın flavonoid miktarları sırasıyla su özütünde % 1,12 metanol-su özütünde % 1,10 ve kloroform özütünde % 0,93 bulunmuştur. Ardestani vd. (2007) tarafından yapılan *A.santolina*'nın su/alkol özütünün toplam flavonoid içeriği % 4,9, toplam fenol miktarı % 10,5 olarak bulunmuş ve potansiyel aktif bileşen olabileceği düşünülmektedir (Ardestani vd., 2007). Başka bir çalışmada altı *Achillea* türünün etanol özütlerinin toplam flavonoid miktarları ile serbest radikal aktiviteleri karşılaştırılmış fakat aralarında önemli bir ilişki bulunamamıştır (Nickavar vd., 2006). Su özütünün flavonoid miktarının yüksek olması antioksidan aktivitesinin yüksek olmasını desteklemektedir. *Hyssopus officinalis*'in flavonoid miktarları sırasıyla su özütünde % 1,30, metanol-su özütünde % 1,25 ve kloroform özütünde % 1,15 bulundu. Literatürde *Hyssop* türlerinin flavonoid miktarı ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Alexandru ve arkadaşları (2007) etanol ile özütlenmiş *H.officinalis* örneklerinde flavonoid derişimini 31,4 mg kuarsetin/g kuru materyal olarak rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada su ile hazırlanan özütlerde flavonoid içeriği daha düşük bulunmuştur (6,5 mg/g). Tez kapsamında bulunan sonuçlarda *H. officinalis*'in en aktif özütü olan su özütünde flavonoid miktarı özütün % 1,12' sine karşılık gelmektedir (31,25 mg/g kuru ağırlık).

- Proantosiyadin Miktarı

Her iki bitkinin kloroform, su ve metanol-su özütlerinin metanolde çözülerek hazırlanan stok çözeltilerinin proantosiyanidin miktarları 2. bölümün, 2.6.3. kısmında belirtilen yönteme göre hesaplanmıştır. Proantosiyanidin içerikleri ilgili formül sonucuyla doğrudan rapor edildiğinden bu çalışmada da aynı yol izlenmiştir.

Achillea biserrata'nın su özütünde 2733,33 mg/L metanol-su özütünde 7125 mg/L proantosiyanidin bulunurken kloroform özütünde proantosiyanidin belirlenememiştir. *Hyssopus officinalis*' in su özütünde 3758,33 mg/L, metanol-su özütünde 5466,67 mg/L, kloroform özütünde ise 10250 mg/L proantosiyanidin bulundu. Bu türlere ait proantosiyanidin miktarları ilk kez bu çalışmada rapor edilmektedir. Bir genelleme yapmak üzere antioksidan aktivitelerle proantosiyanidin derişimleri karşılaştırılabilir. DPPH

yönteminden *A. biserrata* için su ve metanol-su özütleri yüksek aktivite sergilerken bu özütlerin proantosiyanidin miktarları da yüksek bulunmuştur. Ancak su özütü daha yüksek aktivite göstermesine rağmen proantosiyanidin içeriği metanol-su özütünden daha düşük bulunmuştur. Bu da doğrusal bir ilişki olmadığını göstermektedir.

H. officinalis'in su ve metanol özütleri BHT kadar kuvvetli serbest radikal temizleme özelliği sergilemiş ve proantosiyanidin içerikleri de yüksek bulunmuştur. Ancak daha zayıf serbest radikal temizleme özelliği sergileyen kloroform fazında çok yüksek oranda proantosiyanidin belirlenmesi de yine doğrusal bir ilişki olamayacağını göstermektedir.

- Antosiyanın Miktarı

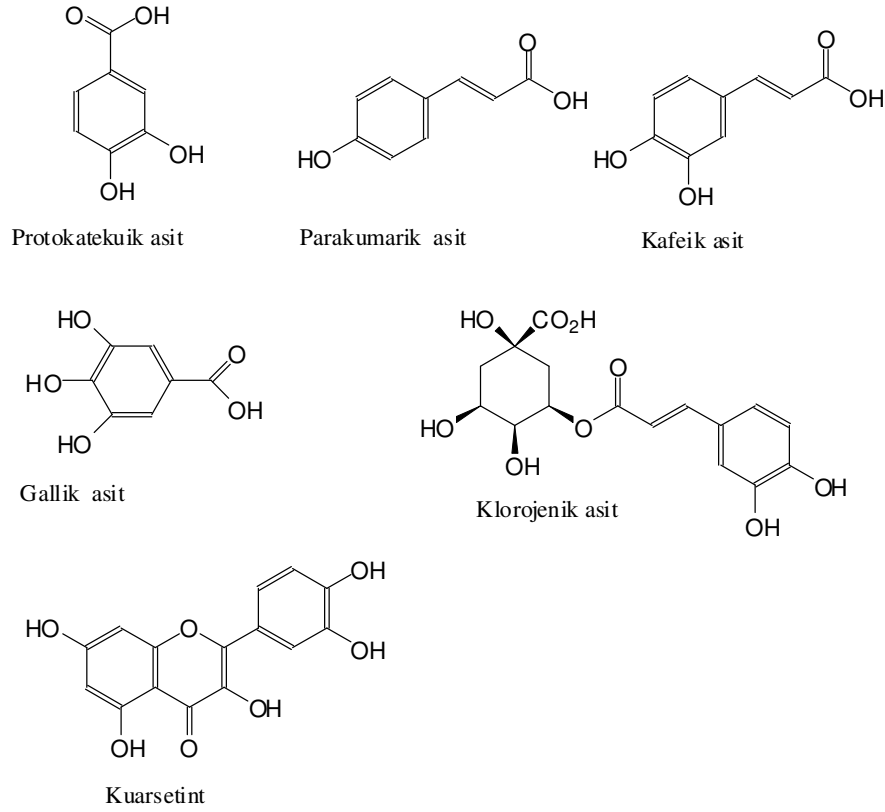
Bitkisel materyallerin, kloroform, su ve metanol-su özütlerinin metanolde çözülerek hazırlanan stok çözeltilerinin antosiyanın miktarları 2. bölümün, 2.6.4. kısmında belirtilen yönteme göre hesaplamalar yapılarak belirlenmiştir.

Achillea biserrata'nın metanol-su özütünde 310 mg/L, kloroform özütünde 879,99 mg/L antosiyanın bulunurken su özütünden antosiyanın elde edilemedi. *Hyssopus officinalis*' in su özütünde 621,19 mg/L, kloroform özütünde 1087,06 mg/L antosiyanın bulundu fakat metanol-su özütünde antosiyanın bulunamadı. Bu türlere ait antosiyanın miktarlarını belirten herhangi bir literatür verisine ulaşılamadı. Antosiyanın açısından bakıldığında her iki türde de kloroform fazında oldukça yüksek oranda antosiyanın bulunduğu görülmektedir. Ardışık özütleme de hekzan sonrasında metanol özütünün kloroform ve su kısımlandırması ile antosiyanınların daha çok kloroform fazında toplandığını göstermektedir. β -Karoten yönteminde aktif bulunan kloroform fazları muhtemelen yüksek oranda antosiyanın içerdiğinden dolayı aktivite sergilemektedir.

- HPLC ile Fenolik Bileşenlerin Analizi

Bölüm 3'de *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis*'in HPLC yöntemiyle belirlenen fenolik bileşen türleri ve nicel miktarları verilmiştir. Tablo 7'deki veriler göz önüne alındığında *A. biserrata*'nın gallik asit (34,78 μ g/g), protokatekuik asit (177,83 μ g/g), klorojenik asit (164,78 μ g/g), kafeik asit (12,32 μ g/g), p-koumarik asit (86,8 μ g/g), kuarsetin (1,90 μ g/g) ve toplam 477,69 μ g/g fenolik bileşen bulundu. Literatürde *Achillea* türlerinin fenolik bileşen içerdiği bulunmuştur. *A.biserrata*'nın fenolik bileşenlerinin analiziyle ilgili herhangi bir literatür mevcut değildir. Ancak diğer *Achillea* türleri ve özellikle *A. millefolium* için detaylı analiz verileri rapor edilmiştir (Benetis vd., 2008). *A .millefolium*'un fenolik bileşen analizi sonucunda klorojenik asit, visenin-2, luteolin-7-O-glukozit, rutin, apigenin-7-O-glukozit, luteolin, luteolin-3'-O-glukozit bulunmuş ve

farklı topluluklardaki civanperçemi çiçeklerinde fenolik bileşenlerin toplam miktarları 13-27,8 mg/g aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Benetis vd., 2008). Polifenoller özellikle fenolik asitler her zaman güçlü antioksidanlar olduğu düşünülmüştür (Zgorka ve Glowński 2001). Belirlenen fenolik bileşenlerin formülleri Şekil 32’de verildi.

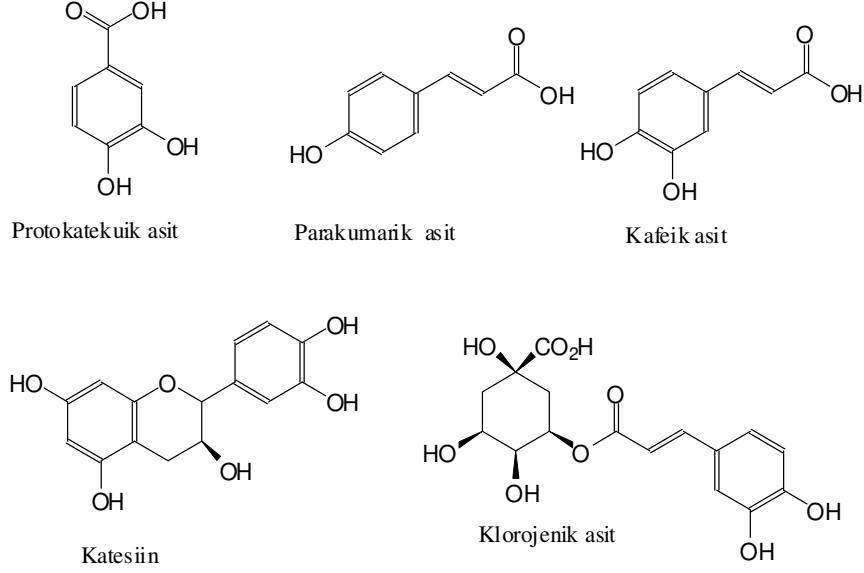


Şekil 32. *A.biserrata* fenolik bileşenlerinin kimyasal formülleri

A.biserrata özütlerinde özellikle protocatekuik ve klorojenik olmak üzere fenolik asit içeriği oldukça yüksek bulunmuştur. Daha düşük derişimli kafeik ve p-koumarik asitler antioksidan türler olarak bilinmektedir.

Literatürde *Hyssopus* türlerinin fenolik bileşen analizi ile ilgili birkaç çalışma mevcuttur. *Hyssopus officinalis*’ in metanol özütünde yüksek miktarlarda protocatekuik, klorojenik, şiringik, ferulik ve rosmarinik asit içerdiği (Zgorka ve Glowński., 2001) ve rosmarinik asitin, aktiviteden sorumlu antioksidan bileşen olduğu belirtilmektedir (Özer vd., 2006). *Hyssopus officinalis*’ in protocatekuik asit (5,67 µg/g), kateşin (2,99 µg/g), klorojenik asit (166,21 µg/g), kafeik asit (110,09 µg/g), p-kumarik asit (6,95 µg/g) ve toplam 292,91 µg/g fenolik bileşen mevcuttur. Tablo 7’ deki veriler klorojenik ve kafeik

asit içeriği oldukça yüksek olup *H. officinalis* polar özütlerinin daha yüksek antioksidan aktivite göstermesini desteklemektedir. Belirlenen fenolik bileşenlerin formülleri Şekil 33'de verildi



Şekil 33. *H.officinalis* fenolik bileşenlerinin kimyasal formülleri

5. SONUÇLAR

• Bitkilerin özüt ve uçucu yağ verimleri;

1. Hekzan özütleri: *Achillea biserrata* için % 3,01; *Hyssopus officinalis* için %2,42.
2. Metanol özüt verimleri;
 - a) Kloroform fazı: *Achillea biserrata* için % 2,90; *Hyssopus officinalis* için % 4,14.
 - b) Su fazı: *Achillea biserrata* için % 12,16; *Hyssopus officinalis* için % 18,33.
3. Metanol-Su özüt verimleri:
Achillea biserrata için % 4,55; *Hyssopus officinalis* için % 5,26.
4. Uçucu yağ: *Achillea biserrata* için % 0,4; *Hyssopus officinalis* için % 1,3.

Antioksidan aktivite sonuçları;

1. DPPH yöntemiyle çalışılan tüm su özütleri yüksek oranda serbest radikal temizleme özelliğine sahiptir. *Achillea biserrata*'nın özütlerinin IC₅₀ değerleri hesaplandığında su özütünde IC₅₀: 19,6 µg/ml, metanol-su özütünde IC₅₀: 37,9 µg/ml, kloroform özütünde IC₅₀: 114 µg/ml sahiptir. *Hyssopus officinalis*'in özütlerinin IC₅₀ değerleri hesaplandığında su özütünde IC₅₀: 18,8 µg/ml, metanol-su özütünde IC₅₀: 28,8 µg/ml, kloroform özütünde IC₅₀: 250 µg/ml dir. Bitkilerin uçucu yağlarında 50 µL' nin üzerindeki miktarlarda IC₅₀ değerleri bulunduğundan antioksidan aktiviteleri çok düşüktür. Bitkilerin kloroform özütlerinde düşük aktivite gözlenirken, hekzan özütlerinde aktivite gözlenmedi.

2. β-Karoten renk açılımı-spektrofotometrik yöntemi ile çalışılan bitki özütlerinde %BAA değerleri hesaplandı ve pozitif standart BHT ile karşılaştırıldı. *Achillea biserrata* ve *Hyssopus officinalis* özütlerinin %BAA değerleri sırasıyla su özütünde % 20,63, % 15,07, metanol-su özütünde % 28,65 % 27,09, uçucu yağda % 36,49, % 26,28, hekzan özütünde de % 67,42, % 77,40, kloroform özütünde % 208,73, % 165, 08 bulundu. İki bitkininde kloroform ve hekzan özütlerinde yüksek aktivite gözlemlendi

Uçucu yağların kimyasal içerik sonuçları;

1. *Achillea biserrata* uçucu yağının kimyasal bileşenleri % 92,9 oranında tanımlandı. Buna göre bu uçucu yağın ana bileşenleri; % 19,4 kamfor, % 17,1 borneol, % 7,9 bornil asetat, % 7,6 (E)-β -farnasen, % 12,8 ökaliptol, % 4,8

kamfen, % 3,7 terpinen-4-ol, % 3 β -seskifellandren, % 1,9 D-germakren, % 1,8 β -terpineol, % 1,3 β -pinen, % 1,2 β -pinen ve % 1,1 β -terpinen dir.

2. *Hyssopus officinalis* uçucu yağının kimyasal bileşenleri % 94,3 oranında tanımlandı. Buna göre uçucu yağın ana bileşenleri; %28,1 *cis*-pinokamfon, %20,3 pinokarvon ve %15,1 β -pinen, %8,5 ökaliptol, %7,3 β -mirsen, %1,5) mirtenol, %1,2 bisiklogermakren dir.

Toplam fenol miktarları;

1. *Achillea biserrata*'nın su özütünde % 3,39, metanol-su özütünde %3,10, kloroform özütünde %2,78' dir.
2. *Hyssopus officinalis*'in su özütünde % 4,70, metanol-su özütünde % 4,26, % kloroform özütünde 4,19'dur.

Flavonoid miktarları;

1. *Achillea biserrata*'nın su özütünde % 1,12, metanol-su özütünde % 1,10, kloroform özütünde % 0,93' dür.
2. *Hyssopus officinalis*'in su özütünde %1,30, metanol-su özütünde %1,25, kloroform özütünde % 1,15.

Proantosiyanidin miktarları;

1. *Achillea biserrata*'nın su özütünde 2733,33 mg/L, metanol-su özütünde 7125 mg/L proantosiyanidin bulunurken kloroform özütünden proantosiyanidin elde edilemedi.
2. *Hyssopus officinalis*' in su özütünde 3758,33 mg/L, metanol-su özütünde 5466,67 mg/L, kloroform özütünde ise 10250 mg/L proantosiyanidin bulundu.

Antosiyanin miktarları;

1. *Achillea biserrata*'nın metanol-su özütünde 310 mg/L, kloroform özütünde 879,99 mg/L antosiyanin bulunurken su özütünden antosiyanin elde edilemedi.
2. *Hyssopus officinalis*'in su özütünde 621,20 mg/L, kloroform özütünde 1087,06 mg/L antosiyanin bulundu fakat metanol-su özütünde antosiyanin bulunamadı.

HPLC ile fenolik bileşenlerin analiz sonuçları;

1. *Achillea biserrata*'da gallik asit 34,78 μ g/g, protokatekuik asit 177,83 μ g/g, klorojenik asit 164,78 μ g/g, kafeik asit 12,32 μ g/g, p-koumarik asit 86,08 μ g/g, kuersetin (1,90 μ g/g) ve toplam 477,69 μ g/g fenolik bileşen bulundu.

2. *Hyssopus officinalis*' in fenolik bileşen analizi sonucunda protokatekuik asit 5,67 µg/g, kateşin 2,99 µg/g, klorojenik asit 166,21 µg/g, kafeik asit 111,09 µg/g, p-kumarik asit 6,95 µg/g ve toplam 292,91 µg/g fenolik bileşen bulundu.

6. ÖNERİLER

Halk arasında çok eski devirlerden beri tedavi amacıyla kullanılan, bugün yapılan çalışmalarla aydınlığa kavuşturulmuş, tat ve koku endüstrisinde, gıda sanayinde, parfümeri ve kozmetik sanayi dallarında ve bunlarla beraber farklı etkilere sahip olduklarından tedavide ve ilaç endüstrisinde de kullanılmaktadırlar.

Antioksidan aktivite testlerinde DPPH yöntemi bitki özütlerinin serbest radikal temizleme etkinliğinin bir ölçüsü iken karoten yöntemi oksidasyonu inhibe etme yeteneğini gösterir. 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. Aynı zamanda bu bitkilerde belirlenen lipit oksidasyonu sonucu oluşan konjuge dienlerin engellenmesi yiyecek endüstrisinde koruyucu olarak kullanımına olanak sağlar. Şunu da unutmamak gerekir ki antioksidanların yetersizliği gibi fazlalığı da organizmada hasara sebebiyet verebilir. Bu nedenle gerekli olan derişimlerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Burada sunulan sonuçlar araştırılan bitki türlerinde *in-vitro* çalışmaların sonuçlarıdır. Biyolojik sistemlerde bu materyallerin davranışları farklılık gösterebilir. Bu nedenle pek çok fizyolojik faktörü de içine alan *in-vivo* testlerin yapılması gerekir.

7. KAYNAKLAR

- Akaike, T., Sato, K., Ijiri, S., Miyamoto, Y., Kohno, M., Ando, M. ve Maeda, H., 1992. Bactericidal Activity of Alkyl Peroxyl Radicals Generated by Heme-Iron-Catalyzed Decomposition of Organic Peroxides, Arch. Biochem. Biophys. 294, 55-63.
- Azar, M., Verette, E. ve Brun, S., 1987. Identification of some phenolic compounds in bilberry juice *Vaccinium myrtillus*, Journal of Food Science, 52, 1255 – 1257.
- Acartürk, R., 1997 Sifalı Bitkiler Flora ve Sağlığımız, Orman Genel Müdürlüğü Mensupları Yardımlasma Vakfı, No:12. Baskı Ankara, 4.
- Alexandru, V., Balan, M., Gaspar, A., Craciunescu, O. ve Moldovan, L., 2007. Studies on the antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Romanian medicinal plants used for wound healing, Romanian Biotechnological Letters, 12, 6, 3467-3472.
- Azaz, D., Arabacı, T. ve Sungun, M.K., 2009. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activities of *Achillea biserrata* M.Bieb. and *Achillea salicifolia* Besser subsp.*salicifolia* Collected in Turkey, Asian Journal of Chemistry, 21, 4, 3193-3198.
- Benetis, R., Radusiene, J. ve Janulis, V., 2008. Variability of phenolic compounds in flowers of Achillea millefolium wild populations in Lithuania, Medicina-lithuania, 44,10, 775-781.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N. ve Bogavac, M., 2008. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica scheele* essential oils, 13, 9, 2058-2068.
- Bown, D., 1995. Encyclopedia of Herbs and Their Uses, The Royal Horticulture Society. Dorling Kindersley, 424, London.
- Beecher, G. R., 2004. Proanthocyanidins: Biological activities associated with human health, Pharmaceutical Biology, 42, 2–20.
- Burits, M., ve Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil, Phytotherapy Research, 14, 323-328.
- Benetis, R., Radusiene, J., Jakstaš, V. ve Janulis, V., 2008. Development of an RP-HPLC method for the analysis of phenolic compounds in *Achillea millefolium* L, Journal of liquid chromatography&Releated teknologies, 31, 4, 596-610.

- Baser, K. H. C., Demirci, B. ve Duman, H., 2001. Composition of the essential oils of two endemic species from Turkey *Achillea lyconica* and *Achillea ketenoglui*, Chemistry of Natural Compounds, 37, 3, 245.
- Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 3.
- Baytop, A., 1972. Farmasötik Botanik, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Baha Matbaası, İstanbul, 305.
- Baytop, T., 1989. “Bitkiler Hakkında Anadolu Halkı Arasındaki Bilgilerin Kaynakları”, XII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Ankara.
- Burits, M., Asres, K. ve Bucar, F., 2001. “The Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*”, Phytother. Res., 15, 103-108.
- Burits, M. ve Bucar, F., 2000. “Antioxidant Activity of *Nigella sativa* Essential Oil”, Phytother. Resear., 14, 323-328.
- Baytop, T., 1986. “Genel Farmakognozi”, İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- Baytop, T., 1997. “Bitki Adları Sözlüğü”, İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- Başer, K.H.C., 2004. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler, 14.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, Eds. K.H.C.Başer ve N.Kırimer Web’de yayın tarihi: Haziran 2004 ISBN 975-94077-2-8.
- Baser, H. C. B., 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey, Pure Appl. Chem., 74, 4, 527.
- Brouillard, R., 1982. Chemical Structure of Anthocyanins. In: Anthocyanins as Food Colors, Markakis, P. (ed). Academic Press, New York, NY.
- Cuendet, M., Hostettmann, K. ve Potterat, O., 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helv. Chim. Acta, 80, 1144-1152.
- Cimpan, G. ve Gocan, S., 2002. Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 25, 2225 - 2292.
- Ceylan, A., 1995. Tıbbi Bitkiler I, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi, Bornova, İzmir, 312.
- Ceylan, A., 1987. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ içerenler), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 1.
- Candan, F., Ünlü, M., Tepe, B., Deferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A. ve Akpulat, H. A., 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), Journal of Etnopharmacology, 87, 215.

- Conforti, F., Loizzo, M.R, Statti, G.A. ve Menichini, F., 2005. Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fractions from *Achillea ligustica* ALL., Biological&Pharmaceutical Bulletin, 28, 9, 1791-1794.
- Çubukçu, B., Meriçli, A. H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütülpınar, N. ve Meriçli, F., (2002). Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 1.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T.A. ve Linssen, J.P.H., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, *Journal of the science of food and agriculture*, 77, 1, 140-146.
- Davis, P.H.,1982. Flora of Turkey and the East Aegean Islands., Edinburgh University Press, 7, 294, Edinburgh
- Dabrowski, K. J. ve Sosulski, F. W., 1984. Quantification of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 32, 123 - 127.
- Davis, P.H., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Supplement 1. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A. ve Linssen, J. P. H., 1998. Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania”, *J. Sci. Food Agric.*, 77, 140-146.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A. ve Boskou, D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. J. Agric. Food. Chem., 50, 5294-5299.
- Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J.-M., Cheynier, V. ve Moutounet, M., 1999. Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 1023 - 1028.
- Fowler, M. W., 1982. Substrate Utilisation by Plant Cell Cultures, J. Chem. Tech. and Biotech., 32, 338-346.
- Frankel N.E., Huang, S., Aeschbach, R. ve Prior, E., 1996. Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. J. Agric. Food Chem., 44, 1, 131-135.
- Gutteridge, J.M.C. ve Halliwell, B., 2000. Free Radikals and Antioxidants in the Year 2000- a Historical Look to the Future, Ann. N. Y. Acad.Sci., 899, 136- 147.
- Green, R. C. ve Mazza, G., 1986. Relationships between anthocyanins, total phenolics, carbohydrates, acidity and colour of saskatoon berries, Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 19, 107 - 113.

- Green, R.C., 2007. Physicochemical Properties and Phenolic Composition Of Selected Saskatchewan Fruits: Buffaloberry, Chokecherry And Sea Buckthorn, Doktora Tezi, Saskatchewan Üniversitesi, Kanada.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Baser, K.H.C., 2001. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, University Press, Edinburg, 320.
- Glasl, S., Kastner, U., Jurenitsch, J. ve Kubelka, W., 1999. Qualitative and quantitative determination of sesquiterpenoids in *Achillea* species by reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry and thin-layer chromatography, Journal of Chromatography B, 729, 361.
- Glasl, S., Gunbilig, D., Narantuya, S., Ingrid, W. ve Jurenitsch, J., 2001. Combination of chromatography and spectroscopic methods for the isolation and characterization of polar guaianolides from *Achillea asiatica*, Journal of Chromatography A, 936, 193.
- Giusti, M. M. ve Wrolstad, R. E., 2001. Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-visible Spectroscopy, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Wrolstad, R. E. (ed). John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1 - 13.
- Giorgi, A., Bombelli, R. ve Luini, A., 2009. Antioxidant and Cytoprotective Properties of Infusions from Leaves and Inflorescences of *Achillea collina* Becker ex Rechb., *Phytotherapy Research*, 23, 4, 540-545.
- Ghani, A., Azizi, M., Hassanzadeh-Khayt, M. ve Pahlavanpour, A.A., 2008. Essential Oil Composition of *Achillea eriophora*, *A. nobilis*, *A. biebersteinii* and *A. wilhelmsii* from Iran, *Journal of essential oil bearing plants*, 11, 5, 460-467.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. ve Riley, T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, Journal of Applied Microbiology, 86, 985-990.
- Huber-Morath A., 1975. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis, P. H., 5, University Press, Edinburg, 1.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. ve Aruoma, O. I., 1987. The Deoxyribose Method: A Simple 'Test Tube' Assay for Determination of Rate Constants for Reaction of Hydroxyl Radicals, Anal. Biochem., 165, 215-219.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd Ed., Clarendon Press, Oxford, 416-494 .
- Halliwell, B. 1990. How to Characterize a Biological Antioxidant, Free Rad. Res. Commun., 9, 13-14
- Harborne, J. B. ve Williams, C. A. , 2000. Advances in flavonoid research since 1992, Phytochemistry, 55, 481 - 504.

- Harborne, J. B., 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, New York, NY.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. ve Katan, M. B., 1992b. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits 286 commonly consumed in the Netherlands, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2379 - 2383.
- Haslam, E., 1965. Galloyl Esters in the Aceraceae, Phytochemistry, 4, 495 - 498.
- Hammer, K. A., Corsan, C. F. ve Riley, T. V., 1999. "Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts", J. Appl. Microbiol., 86, 985.
- Heinrich, G., Pfeifhofer, H. W., Stabentheiner, E. ve Sswidis, T., 2002. Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae), Morfology, histochemistry and composition of Essential Oil, Annals of Botany, 89, 459.
- Jackman, R. L., Yada, R. Y. ve Tung, M. A., 1987. A review: Separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis, Journal of Food Biochemistry, 11, 279 - 308.
- Kırdag, S. ve Bağcı, E., 2000. *Picea abies*(L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) Link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma, Journal of Qafqaz University, 3,1, 183.
- Kırimer, N. ve Mat, A., 1999. Essential Oils in Honour of Prof Dr. K. Hüsni Can Baser on His 50. Birthday, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 127.
- Kirby, A. J. ve Schmidt, R. J., 1997. The Antioxidant Activity of Chinese Herbs for Eczema and of Placebo Herbs –I.", J. Ethnopharmacol., 56, 103-108.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A. Linssen, J. P. H., de Groot, A. ve Evstatieva, L. N., 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods, Phytochem. Anal., 13, 8-17 .
- Könemann, 1999. The Illustrated A-Z of over 10,000 Garden Plants and How to Cultivate them. Botanica, Gordon, 885. Cheers Publication: Hong Kong
- Lis-Balchin, M., 2006. Aromatherapy Science. A Guide for Healthcare professionals, Pharmaceutical pres. London. ISBN 0 85369 578 4. 462 p.
- Liggins, J., Bluck, L. J. C., Coward, A. ve Bingham, S. A., 1998. Extraction and quantification of diadzein and genistein in food, Analytical Biochemistry, 264, 1-7.
- Lietava, J., 1992. Medicinal plants in a Middle Paleolithic Grave Shanidar IV, Journal of Ethnopharmacology, 35, 3, 263.

- Lamaison, J. L., ve Carnat, A., 1991. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poir) DC. En fonction de la période de végétation, Plantes Médicinales et Phytothérapie, 25, 1, 12–16.
- Mantle, D., Anderton, J. G., Falkous, G., Barnes, M., Jones, P. ve Perry, E. K., 1998. 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
- Maffei, M., Mucciarelli, M. ve Scannerini, S., 1994. Essential oils from *Achillea* species of different geographic origin, Biochemical Systematics and Ecology, 22, 7, 679.
- Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. ve Haroutounian, S. A., 2002. Chemical composition and in-vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species, Z.Naturforsch, 57, 287.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. ve Jime' nez, L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability, American Journal of Clinical Nutrition, 79, 727 - 747.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. ve Thomas, M. B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, NY. Merken, H. M. ve Beecher, G. R., 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 577 - 599.
- Maatta, K., Kamal-Eldin, A. ve Torronen, A. R., 2003. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization mass spectrometric (MS) detection: *Ribes* species, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6736 – 6744.
- Mann, J., 1987. Secondary Metabolism, Oxford University Press, Toronto, ON.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. ve Billot, J., 1990. Fruit Phenolics, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mastelic, J. ve Jerkovic, I., 2003. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of free and glycoconjugated aroma compounds of seasonally collected *Satureja montana* L. Food Chemistry, 80, 135-140.
- Mazza, G. ve Miniati, E., 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press, London, UK.
- Namiki, M., 1990. Antioxidants/Antimutagens in Food, Crit. Rev. Food Sci. & Nutr., 29, 273-300.
- Nemeth, E. ve Bernath, J., 2008. Biological Activities of Yarrow Species (*Achillea* spp.) , Current Pharmaceutical, 14, 29, 3151-3167

- Naczki, M. ve Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food, Journal of Chromatography A, 1054, 95 - 111.
- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L. ve Exon, J. H., 2006. A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46, 161 - 183.
- Nickavar, B., Kamalinejad, M., Haj-Yahya, M. ve Shafaghi B., 2006. Comparison of the free radical scavenging activity of six Iranian Achillea species, Pharmaceutical biology, 44, 3, 208-312
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. ve Deemer, E. K., 2002. 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.
- Özer, H., Sökmen, M. ve Güllüce, M., 2006. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. ssp *angustifolius*, Italian Journal of food Science, 18, 1, 73-83.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N. ve Chan, B. G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, Phytochemistry, 25, 1, 223-230.
- Pearson, D. A., Frankel, E. N., Aeschbach, R. ve German, J. B., 1997. Inhibition of Endothelial Cell-Mediated Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Rosemary and Plant Phenolics", J. Agric. Food Chem., 45, 578-582.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. E. ve Komaitis, M., 2005. RPHPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts, Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 1190 - 1195.
- Price, K. R., Bacon, J. R. ve Rhodes, M. J. C., 1997. Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 938-942.
- Philipson, J. D., 1990. Plants as Sources of Valuable Products. In Secondary Products from Plant Tissue Culture, Edt. Charlwood, B. V. and Rhodes, M. J., Oxford, Clarendon Press 1-22.
- Pokorny, J., 1991. Natural Antioxidant for Food Use, Trends in Food Sci. Tech., 9, 223-227.
- Palic, R., Stojanovic, G., Randelovic, V. ve Velickovic, J., 2000. The fatty acids from plants of the genus Achillea, Physics, Chemistry and Technology, 2, 101.
- Ruberto, G. ve Baratta, M. T., 2000. Antioxidant Activity of Selected Essential Oil Components in Two Lipid Model Systems, Food Chem., 69, 167-174.

- Robbins, R. J., 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2866 - 2887.
- Robert, P. A., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- Rasmussen, D. E., Frederiksen, H., Krogholm, K. S. ve Poulsen, L., 2005. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability and protection against cardiovascular disease, Molecular Nutrition and Food Research, 49, 159–174.
- Sökmen, A., Sökmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Unlu, M. ve Akpulat, A., 2004. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae), Phytotherapy research, 18, 6, 451-456.
- Saura-Calixto, F. ve Pérez-Jiménez, J., 2009. In S. Knäsmüller, D. M. DeMarini, & C. Gerhäuser (Eds.), Chemoprevention of cancer and DNA damage by dietary factors, Weinheim: VCH, 499-508.
- Simon, J.E., Chadwick, A.F. ve Cracher, L.E., 1984. Herbs: An annotated Bibliography, 1971-1980, 770.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G. ve Bekat, L., 1995. Leblebici E., Tohumlu Bitkiler Sistematigi, 116 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 296.
- Sakar, M. K. ve Tanker, M., 1991. Fitokimyasal Analizler Tanım, Miktar Tayini ve izolasyon, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 67, 189, Ankara.
- Singleton, V. L. ve Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144 - 158.
- Shahidi, F. ve Naczk, M., 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Salagoity-Auguste, M. H. ve Bertrand, A. J., 1984. Wine phenolics. Analysis of low molecular weight components by high performance liquid chromatography, Journal of the Science of Food and Agriculture, 35, 1241 -1247.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Edt. Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S. Bölüm 7, Sekonder Metabolit Üretimi, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 211-261.

- Tanker, M., Tanker, N., Şarer, E., Atasü, E., Şener, B., Kurucu, S. ve Meriçli, F., 1990. Result of Certain Investigation on the Volatile Oil Containing Plants of Turkey, Essential Oils for Perfumery and Flavours, Preceedings of an International Conference, 26-30 May 1990, Antalya, 16, 29.
- Taiz, L. ve Zeiger, E., 2002. Plant Physiology., Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland ,Massachusetts, 690.
- Tasioula-Maragari, M. ve Okogeri, O., 2001. Isolation and characterization of virgin olive oil phenolic compounds by HPLC/UV and GC-MS, Journal of Food Science, 66, 530 - 533.
- Teixeira, R. O., Camparoto, M. L., Mantovani, M. S. ve Vicentini, V. E. P., 2003. Assessment of medicinal plants, Psidium guajava L. and Achillea millefolium L., in vitro and in vivo assays, Genetics and Molecular Biologi, 26, 4, 551.
- Toker, Z., Özen, H. C., Clery, R. A. ve Owen, N. E., 2003. Essential oils of two Achillea species from Turkey”, Journal of Essential Oil Research, 11, 700-702.
- Takhtajan, A., 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants, Columbia University Pres, New York, 418.
- Trifunovic, S., Vajs, V., Tesevic, V., Djokovic, D. ve Milosavljevic, S., 2003. Lignans from the plant spesies Achillea lingulata, J.serb.Chem.Soc., 68, 277.
- Tyler V.E., 1993. The Honest Herbal, 3rd ed.p.357. Pharmaceutical Products, Haworth Press, Binghampton, NY. USDA (2004a). Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture, Beltsville Human Nutrition Research Center. Nutrient Data Laboratory. Beltsville, MD.
- URL-1 http://www.gaiagarden.com/articles/healthnotes/hn_yarrow.php.30k, 01.05.2010.
- URL-2. <http://www.sifalibitkiler.us/archives/869>, 01.05.2010.
- Ünlü, M., Deferera, D., Dönmez, E., Polissiou, M., Tepe, B. ve Sökmen, A., 2002. “Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compasitae)”, Journal of Etnopharmacology, 83, 117.
- Vieira, L. M., Kijjoa, A., Pereira, J. A., Getris, T. E., Herz, W., Skocibusic, M., Bezic, N., Dunkic, V. ve Radonic, A., 2004. Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oil against Respiratory tract pathogens, Fitoterapia, 75, 7-8, 733.
- Wrolstad, R. E., 2005. Bioactive Food Components. In: Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components. Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. and Sporns, P. (eds). John Wiley and Sons, Incorporated. Hoboken, NJ, 459.

- Williams, C. A. ve Grayer, R. J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. Natural Products Reports, 21, 539 - 573.
- Yesilada, E., 2002. Hekim, Alternatif Tedavi ve Modern Tıp, Sted, 11, 6, 223.
- Yıldız B., Tümen G., Demirkus, N., Adıgüzel, N., Akyalçın, H. ve Bahçecioglu, Z., 2004. Türkiye’de yetişen *Thymus* L. (Lamiaceae) Türlerinin Revizyonu ve Türler Üzerinde Palinolojik ve Kimyasal Araştırmalar, TBAG-1715 (198T003), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Arastırma Kurumu (TÜBİTAK), 20.
- Zeybek, U., Zeybek, N., 2002. Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri, 3 (Degistirilmis 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir , 378.
- Zeybek, N., Farmasötik Botanik, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:1, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, (1985) 340.
- Zgorka, G. ve Glowniak, K., 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. J. Pharmaceut. Biomed, 26, 79..

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Trabzon'da doğdu. İlk okulu Fatih ilk okulunda, Orta okulu Cumhuriyet orta okulunda ve lise öğrenimini Trabzon Fatih (Yabancı Dil Ağırlık) Lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliğinden mezun oldu. 2003-2009 yılları arasında özel bir eğitim kurumunda kimya öğretmeni olarak görev yaptı ve yabancı dili İngilizcedir.