

**FLAŞ KROMATOĞRAFİSİ İLE ADAÇAYI (*Salvia officinalis*)
BİTKİSİNDEN ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ROSMARİNİK ASİT
ELDESİ**

ELİF SİNE DÜVENCİ

**DOKTORA TEZİ
DOĞAL, BİTKİSEL VE KOZMETİK ÜRÜNLER ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. HALİL İBRAHİM UĞRAŞ**

DÜZCE, 2023

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

FLAŞ KROMATOĞRAFİSİ İLE ADAÇAYI (*Salvia officinalis*)
BİTKİSİNDEN ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ROSMARİNİK ASİT
ELDESİ

Elif Sine DÜVENÇİ tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Gedik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Gedik Üniversitesi

Prof. Dr. Ertuğrul KAYA

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Turgut KILIÇ

Balıkesir Üniversitesi

Doç. Dr. Sibel BAYIL OĞUZKAN

Gaziantep Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 19/06/2023

BEYAN

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

19 Haziran 2023

Elif Sine DÜVENCİ

TEŐEKKÖR

Doktora öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Halil İbrahim UğRAŞ'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili annem Ayşe AKSOY ve değerli babam Feridun AKSOY'a, birçok zorluğu beraber göğüslediğimiz çalışma arkadaşlarım Arő. Gör. Pınar KARAGÖL ve Öğr. Gör. Dr. Bora KARAGÖL'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak her daim yanımda olan sevgili eşim Ünal DÜVENCİ'ye ve hayatıma renk ve neőe katarak beni motive eden canım kızım Melis DÜVENCİ'ye sonsuz minnetlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2021.05.03.1240 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

19 Haziran 2023

Elif Sine DÜVENCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
SİMGELER	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
EXTENDED ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. DOĞAL ÜRÜNLERİN TARİHSEL GELİŞİMİ	1
1.2. FİTOKİMYA NEDİR?.....	3
1.3. DOĞAL ÜRÜNLERDEN ETKEN MADDE ELDESİNDE KULLANILAN EKSTRAKSİYON METOTLARI	4
1.4. DOĞAL ÜRÜNLERDE KALİTE KRİTERLERİ.....	6
1.5. DOĞAL ÜRÜNLERDEN İLAÇ KEŞFİ.....	8
1.6. DOĞAL ÜRÜNLERDEN ELDE EDİLEN ETKEN MADDELERİN TAYİN YÖNTEMLERİ	9
2. ADAÇAYI	11
2.1. ADAÇAYININ FARMAKOLOJİDE KULLANIMI.....	12
2.2. ADAÇAYININ KİMYASAL BİLEŞENLERİ	13
3. ROSMARİNİK ASİT	16
3.1. ROSMARİNİK ASİT HAKKINDA GENEL BİLGİ.....	16
3.2. ROSMARİNİK ASİDİN FARMAKOLOJİK ETKİLERİ.....	18
3.3. ROSMARİNİK ASİT KİMYASAL YAPISI	19
3.4. ROSMARİNİK ASİT EKSTRAKSİYONU İÇİN LİTERATÜR TARAMASI	20
3.5. <i>SALVIA OFFICINALIS</i> TÜRÜNDEN ROSMARİNİK ASİT EKSTRAKSİYONU LİTERATÜR TARAMASI.....	24
4. MATERYAL VE YÖNTEM	26
4.1. ADAÇAYI BİTKİSİNİN HASAT EDİLMESİ.....	26
4.2. UÇUCU YAĞ DÜZENEGİNİN KURULMASI.....	27
4.3. FARKLI EKSTRAKSİYON METOTLARININ DENENMESİ VE HPLC ..	28
4.4. FLAŞ KROMATOĞRAFİSİ UYGULAMASI.....	31
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
5.1. ADAÇAYI YAĞININ GC MS ANALİZİ	32
5.2. ROSMARİNİK ASİDİN KALİBRASYON GRAFİĞİ.....	35
5.3. FARKLI EKSTRAKSİYON DENEMELERİ VE HPLC ANALİZLERİ	36
5.4. EKSTRAKSİYON METOTLARINDA AKTİF KARBON UYGULAMASI	44

5.5. ADAÇAYI POSALARINA UYGULANAN EKSTRAKSİYONLAR.....	52
5.6. FLAŞ KROMATOĞRAFİSİ UYGULAMALARI	53
5.7. FLAŞ KROMATOĞRAFİ İLE TOPLANAN FRAKSİYONA AİT LC-MS ANALİZİ	60
5.8. SİTOTOKSİTİTE ÇALIŞMALARI.....	61
6. SONUÇ	63
7. KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	76



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Rosmarinik asit kimyasal yapısı.	20
Şekil 4.1. <i>Salvia officinalis</i> bitkisi a) Bitkinin hasadı b) Bitkinin görüntüsü c) Gölgede kurutulması için muhafaza edilmesi.	26
Şekil 4.2. <i>Salvia officinalis</i> bitkisinin a) gölgede kurutulması b) öğütülmesi.	27
Şekil 4.3. Ekstraksiyon işlemleri a) Klasik ekstraksiyon b) Ultrasonik destekli.	29
Şekil 5.1. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrotıla GC MS karşılaştırmalı kromatogramı.	33
Şekil 5.2. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrolatı GC MS karşılaştırmalı kromatogramı 7-12. dk arası.	33
Şekil 5.3. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrolatı GC MS karşılaştırmalı kromatogramı 12-15. dk arası.	34
Şekil 5.4. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrolatı GC MS karşılaştırmalı kromatogramı 15-21. dk arası.	34
Şekil 5.5. $R^2 = 0.9996334$ olarak hesaplanan rosmarinik asit kalibrasyon doğrusu.	35
Şekil 5.6. PDA dedektörde taranan dalga boyları.	35
Şekil 5.7. PDA dedektörde taranan dalga boyları.	36
Şekil 5.8. Rosmarinik asit ve 1 nolu numune kromatogramı.	37
Şekil 5.9. Rosmarinik asit ve 2 nolu numune kromatogramı.	37
Şekil 5.10. Rosmarinik asit ve 3 nolu numune kromatogramı.	38
Şekil 5.11. Rosmarinik asit ve 4 nolu numune kromatogramı.	39
Şekil 5.12. Rosmarinik asit ve 5 nolu numune kromatogramı.	39
Şekil 5.13. Rosmarinik asit ve 6 nolu numune kromatogramı.	40
Şekil 5.14. Rosmarinik asit ve 10 nolu numune kromatogramı.	41
Şekil 5.15. Rosmarinik asit ve 11 nolu numune kromatogramı.	41
Şekil 5.16. Rosmarinik asit ve 12 nolu numune kromatogramı.	42
Şekil 5.17. Rosmarinik asit ve 13 nolu numune kromatogramı.	43
Şekil 5.18. Rosmarinik asit ve 14 nolu numune kromatogramı.	43
Şekil 5.19. Rosmarinik asit ve 1 AS nolu numune kromatogramı.	44
Şekil 5.20. Rosmarinik asit ve 2 AS nolu numune kromatogramı.	45
Şekil 5.21. Rosmarinik asit ve 3 AS nolu numune kromatogramı.	45
Şekil 5.22. Rosmarinik asit ve 4 AS nolu numune kromatogramı.	46
Şekil 5.23. Rosmarinik asit ve 5 AS nolu numune kromatogramı.	47
Şekil 5.24. Rosmarinik asit ve 10 AS nolu numune kromatogramı.	47
Şekil 5.25. Rosmarinik asit ve 11 AS nolu numune kromatogramı.	48
Şekil 5.26. Rosmarinik asit ve 12 AS nolu numune kromatogramı.	49
Şekil 5.27. Rosmarinik asit ve 13 AS nolu numune kromatogramı.	49
Şekil 5.28. Rosmarinik asit ve 14 AS nolu numune kromatogramı.	50
Şekil 5.29. Posaya denenen numuneye ait kromatogram.	52
Şekil 5.30. Ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogram ve standartlar kıyaslaması .	53
Şekil 5.31. Adaçayı posasına uygulanan tekrarlı ultrasonik banyo.	53
Şekil 5.32. Flaş kromatografisi metot geliştirme basamaklarına ait kromatogram.	54
Şekil 5.33. Flaş kromatografisine ait kromatogram.	54
Şekil 5.34. Flaş kromatografisi ile gözlenen piklere ait UV dalga boyu görüntüsü.	55
Şekil 5.35. Flaş kromatografisi uygulaması metot denemeleri.	56
Şekil 5.36. Flaş kromatografisi kromatogramı.	56
Şekil 5.37. Flaş kromatografisi ilk pike ait UV dalga boyu taraması.	57
Şekil 5.38. Ultrasonikasyon yardımıyla elde edilen ekstreye ait flaş kromatografisi	

kromatogramı.	57
Şekil 5.39. Flaş kromatografi kromatogramı.	58
Şekil 5.40. Flaş kromatografisi ile elde edilen fraksiyonun HPLC analizi.....	58
Şekil 5.41. Flaş uygulaması sonrası toplanan fraksiyonlara ait kromatogram.	59
Şekil 5.42. Flaş uygulaması sonrası toplanan fraksiyonlara ait kromatogram tüm fraksiyonlar.....	59
Şekil 5.43. Flaş uygulaması sonrasına ait zenginleştirilmiş rosmarinik asite ait kromatogram.	59
Şekil 5.44. Ultrasonik banyo sonrası flaş kromatografi uygulaması.	60
Şekil 5.45. Ultrasonik banyo uygulaması sonrası elde edilen zenginleştirilmiş rosmarinik asit.	60
Şekil 5.46. Elde edilen fraksiyona ait LC-MS analizi kromatogramı.....	61
Şekil 5.47. Rosmarinik asit standardına ait LC-MS kromatogramı.....	61



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. GC-MS Çalışmaları sonucu elde edilen bazı veriler.	15
Çizelge 3.1. Rosmarinik asit içeren bitkiler.....	17
Çizelge 4.1. Farklı ekstraksiyon denemeleri.....	29
Çizelge 4.2. Rosmarinik asit tayininde geliştirilen metot.	31
Çizelge 5.1. Deney numunelerine ait sayısal veriler.	50
Çizelge 5.2. Test numunesine (UE) ait canlılık verileri.	62
Çizelge 5.3. Standart numunesine (RA) ait canlılık verileri.....	62



KISALTMALAR

ELSD	Evaporatif ışık saçılma dedektörü
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	gram
GC-MS	Gaz Kromatografi-kütle spektrometresi
GHz	Giga hertz
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
M.Ö.	Milattan önce
M.S.	Milattan sonra
mg	miligram
MHz	Mega hertz
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
ODS	Oktadesilsiloksan
PDA	Foto diot dizi
ppm	Milyonda bir birim
RA	Rosmarinik asit
rpm	Dakikada dönüş sayısı
TİTCK	Türkiye ilaç ve tıbbi cihaz kurumu
TÜİK	Türkiye istatistik kurumu
UE	Ultrasonik ekstraksiyon
UV-Vis	Ultraviyole görünür bölge
vb	Ve benzeri
WHO	Dünya sağlık örgütü

SİMGELER

α	Alfa
AU	Angström birimi
β	Beta
CO ₂	Karbondioksit
μ l	Mikrolitre
mV	Milivolt
pH	Potansiyel hidrojen
R ²	Regresyon katsayısı
°C	Santigrat derece
H ₂ SO ₄	Sülfirik asit
%	Yüzde



ÖZET

FLAŞ KROMATOĞRAFİSİ İLE ADAÇAYI (*Salvia officinalis*) BİTKİSİNDEN ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ROSMARİNİK ASİT ELDESİ

Elif Sine DÜVENCİ

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Haziran 2023, 75 sayfa

Salvia officinalis, Lamiaceae ailesine ait bir bitkidir ve genellikle soğuk havalarda soğuk algınlığı, boğaz ağrısı gibi rahatsızlıklarda çay olarak tüketilmektedir. Bunun yanı sıra adaçayı, yapraklarından uçucu yağ elde edilerek ithalatı ve ihracatı yapılmakta olan bir bitkidir. Bununla birlikte birçok alanda kullanılmaktadır. *Salvia* Latince'de "iyileştirici" anlamına gelirken, *officinalis* "tıbbi" anlamına gelmektedir. *Salvia officinalis*'in iyileştirici etkisi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Genel anlamda bitki, fenolik bileşiklerce ve biyolojik aktivitesi kanıtlanmış uçucu yağlar açısından zengindir. Bunun yanı sıra adaçayı yapraklarından uçucu yağ elde edildikten sonra kalan kısım atık olarak kalmaktadır. Oysaki kalan sulu kısımda ve kalan bitki materyalinde de oldukça değerli etken maddeler bulunmaktadır. Bunlardan miktarca en fazla bulunanı; biyolojik aktivitesi ve farmakolojik etkileri üzerine araştırmaların devam ettiği rosmarinik asittir. Bu çalışma kapsamında Düzce yöresinden toplanan adaçayları gölgede kurutulmuştur. Uçucu yağ eldesinden sonra atık olarak kalan adaçayı bitki materyali üzerinde farklı ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon denemeleri; uçucu yağ çıkarma düzeneği kurulduktan sonra kalan posanın değerlendirilmesi üzerine yapılmıştır. Fakat kıyaslama adına ve en uygun metodun seçilebilmesi için direkt bitki materyaline manyetik karıştırıcı yardımıyla 2, 16, 24 saat ekstraksiyon süresi sürecek şekilde ekstraksiyon süreçleri de düzenlenmiştir. Çözücü olarak etanol, aseton ve saf su kullanılmıştır. Etken madde varlığı HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) cihazıyla ölçülmüştür. Klevenger düzeneği sonrası kalan posanın değerlendirildiği durumda etken madde miktarı oldukça yüksek çıkmıştır. Klevengere en yakın rosmarinik asit miktarı ise etanol ile ultrasonikasyonun kullanıldığı ekstraksiyon metodudur. Elde edilen ekstraktlerdeki rosmarinik asit miktarları kromatografik cihazlarla tayin edilmiştir. Hem bitki materyalinden kalan atıktan elde edilen ekstraktlar hem de uçucu yağ eldesindeki distilasyon sonrası balonda kalan sulu fazdan elde edilen ekstraktta rosmarinik asit miktarı oldukça yüksek çıkmıştır. Elde edilen bu ekstraktları bitki materyalinden gelen diğer safsızlıklardan ayırabilmek için flaş kromatografisi kullanılmıştır. Burada elde edilen zenginleştirilmiş rosmarinik asit önce HPLC ile tayin edilmiştir. Sonrasında LC/MS (sıvı kromatografisi/ kütle spektrometresi) cihazıyla kütle taramasıyla molekülün doğruluğu kanıtlanarak saflığı yüksek zenginleştirilmiş rosmarinik asit elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Adaçayı, Ekstraksiyon, Kromatografi, Rosmarinik asit.

ABSTRACT

RECOVERY OF ROSMARINIC ACID ENRICHED FROM SAGE (*Salvia officinalis*) BY FLASH CHROMATOGRAPHY

Elif Sine DÜVENÇİ

Düzce University

Graduate School, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

June 2023, 75 pages

Salvia officinalis is a plant belonging to the Lamiaceae family and is usually consumed as a tea in cold weather conditions such as colds and sore throats. In addition, essential oil is obtained from sage leaves and imported and exported. However, it is used in many fields. *Salvia* means "healing" in Latin, while *officinalis* means "medicinal". Various studies have been conducted on the curative effect of *Salvia officinalis*. In general, the plant is rich in phenolic compounds and essential oils with proven biological activity. In addition, after the essential oil is obtained from sage leaves, the remaining part is waste. However, there are very valuable active substances in the remaining watery part and the remaining plant material. The most abundant of these is rosmarinic acid, whose biological activity and pharmacological effects continue to be researched. Within the scope of this study, sage collected from Düzce region were dried in the shade. Different extraction experiments were carried out on the sage plant material that remained as waste after the essential oil was obtained. Extraction trials were carried out on the evaluation of the remaining pulp after the essential oil extraction apparatus was set up. However, for the sake of comparison and in order to choose the most suitable method, it was arranged to last 2, 16, 24 hours with the help of magnetic stirrer. Ethanol, acetone and purified water were used as solvents. The presence of active substance was measured by HPLC (high pressure liquid chromatography) device. In the case of the evaluation of the remaining pulp after the Clevenger mechanism, the amount of active substance was found to be quite high. The closest amount of rosmarinic acid to clevenger is the extraction method using ethanol and ultrasonication. The amounts of rosmarinic acid in the obtained extracts were determined by chromatographic devices. The amount of rosmarinic acid was found to be quite high in both the extracts obtained from the waste remaining from the plant material and the extract obtained from the aqueous phase remaining in the balloon after the water vapor distillation of the essential oil. Flash chromatography was used to separate these extracts from other impurities from plant material. The enriched rosmarinic acid obtained here was first determined by HPLC. Afterwards, enriched rosmarinic acid with high purity was obtained by proving the accuracy of the molecule by mass scanning with LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) device.

Keywords: Chromatography, Extraction, Rosmarinic acid, Sage.

EXTENDED ABSTRACT

RECOVERY OF ROSMARINIC ACID ENRICHED FROM SAGE (*Salvia officinalis*) BY FLASH CHROMATOGRAPHY

Elif Sine DÜVENÇİ

Duzce University

Graduate School, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

June 2023, 75 pages

1. INTRODUCTION

The significance of natural nutrition has grown in recent years. In recent years, people have prioritized topics like natural diet, exercise, and living an active lifestyle. The main objective is frequently to stop the illness before it spreads. However, in addition to pharmacologically efficient medications, natural and herbal remedies are being investigated when any acute or chronic sickness strikes us. Consuming uncertified goods that are outside the realm of scientific understanding without consulting a doctor and without inspection frequently has a negative net effect. Since these goods are often regarded as having a natural origin, there is no need for any content investigation to determine their safety. In addition to using the plant directly, there are products made from plant extracts, vegetable oils, etc.

The creation of rosmarinic acid from the medicinal sage plant, whose name is a combination of the terms *salvia*, which means "healing," and *officinalis*, which means "medically," was investigated as part of this study. During the winter, sage tea is the most popular way to use the herb. Sage oil is also crucial for export and import. The pulp that is left behind after making sage oil includes a significant quantity of rosmarinic acid, an active ingredient that has significant medicinal properties. In certain nations, this active element is taken as a dietary supplement and is regarded as being very useful for cognitive skills. In addition to all of these, the Turkish Pharmacopoeia, which is our nation's approved adaptation of the European Pharmacopoeia, also includes the *Salvia officinalis* species. An indicator that a plant species is scientifically accepted to include information on the qualities of the active ingredients in a product produced from natural and herbal goods is the existence of that plant species in pharmacopoeias.

Sage species *Salvia officinalis* is grown as a cultivar. Türkiye does not exhibit a significant natural proliferation of it. Additionally, generating it is not difficult. The pulp from this factory is discarded as waste and is mostly utilized in the manufacturing of oil. In certain circumstances, these wastes are utilized to prevent plants from developing under the plants or to be dried and supplied to herbalists. In other words, it's crucial to transform this waste material into a useful product.

The ester of 3,4-dihydroxyphenyllactic acid with caffeic acid is rosmarinic acid. It is a secondary metabolite generated in varying concentrations in the majority of Lamiaceae family plants. According to research, rosmarinic acid is a polyphenol with antioxidant characteristics that is present in high concentrations in several regularly used plants, including thyme, mint, lemon balm, rosemary, and mint. In order to adjust to environmental factors including nutritional deprivation, water, humidity, and temperature, secondary metabolites are created.

There are several studies in the literature on extraction techniques and the identification of the active ingredient for enriching rosmarinic acid from the Lamiaceae family. The quantity and purity of rosmarinic acid achieved here are crucial. The sage plant was selected for this study because it is widely available, grows well in the Düzce region, has fewer studies in the literature than other active substances and other plant species, and can be evaluated for the pulp that remains after sage essential oil is extracted.

2. MATERIAL AND METHODS

In June, sage (*Salvia officinalis*) was collected in the Düzce region's Hacıyakup hamlet and dried in the shade. The dried herbs were crushed and utilized in extraction procedures before being placed in glass bottles with caps and kept in the fridge.

Plans for various extraction technologies were developed to be used with the plant material from the ground. The approaches that will be compared in this system were chosen. The amount of active material in the pulp that is still present after the Clevenger device, the amount of active substance acquired following traditional extraction, and the amount of active substance recovered after ultrasonication were all compared using various methods. Additionally, several solvents were examined. Based on the literature, the three solvents chosen were ethanol, acetone, and filtered water. In addition to this, 2, 16 and 24 hours were established by traditional extraction experiments, and the timings were compared. In addition to all of these things, our main objective was to assess the

pulp that was left after extracting the essential oils, so it was investigated whether it was possible to obtain the rosmarinic acid that was still in the aqueous phase by adjusting the pH to that of the aqueous phase and then using liquid: liquid extraction (water: ethylacetate) to enrich the rosmarinic acid.

By setting up the Clevenger apparatus, extraction was carried out for around 8 hours at a ratio of 1:10 (sage: water). The leftover pulp was evaporated, vialled, and subjected to an HPLC examination. Additionally, the pH was lowered to pH 2 and precipitate was made by modifying the acidity of the aqueous phase produced under the same circumstances. The aqueous phase was produced by evaporation for HPLC analysis after the filtrate and precipitate were separated from one another.

Except for the pulp left over after the essential oil has been extracted, the extraction procedures applied directly to the plant material included maceration with the aid of a magnetic stirrer, reflux extraction, and ultrasonic-aided extraction. All extraction conditions were used again while adding activated carbon for dye removal. Following the extraction procedures, the liquid extracts were dried by rotary evaporation. With HPLC-grade solvents, residues were dissolved, filtered and vialized. The obtained extracts underwent HPLC analysis in order to perform both qualitative and quantitative analyses. The most efficient procedure was used to conduct the enrichment research. Afterwards, flash chromatography was used to improve the concentration and peak purity of rosmarinic acid. We had an edge in flash chromatography due to the high liquid extract loading, detection of compounds flowing through the column, and ability to view peaks on the screen. Each identified peak was captured individually using the flash chromatography apparatus, giving us access to enhanced extract fractions. By using LC/MS-MS, the resultant fractions were examined. This allowed for the observation of the mass of rosmarinic acid.

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

The fact that the secondary metabolites extracted from sage leaves were harvested in May-June, and October-November is one of the details we found in the literature. We harvested the sage for this study in June. According to all analyses, rosmarinic acid was produced from sage leaves with enhanced, high-purity rosmarinic acid. In light of the preliminary research, it was found that ethanol produced more rosmarinic acid throughout all experiments when compared to acetone and ethanol solvents. It was

established that the investigations that lasted for 24 hours in both solvents were excessive after taking the extraction times into account. When traditional solvent extraction and ultrasonic bath aided extraction were compared, the extract produced by the ultrasonic bath in both solvents had the greatest concentration of rosmarinic acid.

When compared with the analysis, it was discovered that the ethanol experiment outperformed the ultrasonic bath-aided extraction. Additionally, it was found that the quantity of rosmarinic acid extracted from the plant material still in the Clevenger apparatus setup was comparable to the amount extracted using ultrasound. The organic active ingredient, rosmarinic acid, was demonstrated to be absorbed by activated carbon in the research that followed its application. The peak purity of rosmarinic acid was shown to be higher in all experiments when compared to trials without activated carbon, according to HPLC data. As a result that our peak purity rose but the quantity of rosmarinic acid reduced. In order to analyze the residual pulp, which is one of our primary goals, HPLC analysis was done on the liquid extract produced from the aqueous phase that was left behind as trash. The transfer of rosmarinic acid to the organic phase, ethylacetate, was accomplished by using liquid-liquid extraction with the aid of ethylacetate after this aqueous phase underwent sequential purification once again by carrying out a separate test. Methanol was used to dissolve the solid product that was left behind after the ethyl acetate phase evaporated. Flash chromatography and fractionation by filtering were used to produce enriched rosmarinic acid.

4. CONCLUSION AND OUTLOOK

It was discovered via interviews with the actual sage oil producers that the pulp and aqueous phases left over after oil production were appraised or discarded in various locations. For instance, one business claimed that the leftover pulp is used beneath the plants to stop weeds from sprouting in the fields. Another manufacturer claimed that this pulp was adulterated by being dried and mixed with recently collected goods. A producer once again remarked that the wet area was used for irrigation following the interviews. The plant is utilized as animal feed once the oil is extracted, which is another discovery made as a consequence of the interviews. After conducting all of these interviews, we believe that the true manufacturer's responses have confirmed the existence of a product that can be used in regions where it is more effective. Since both the favorable climatic conditions in our country for its production and the fact that the active component of rosmarinic acid in the sage plant is an important phytochemical

were confirmed by the pharmacognosy approach in the literature, it has been seen that a product with a high added value can be obtained from the sage plant. In the context of this work, enhanced rosmarinic acid was produced by experimenting with several sage plant extraction methods, followed by flash chromatography. By conducting a cytotoxicity test in cell culture medium, the generated active substance was compared to the commercially purchased active substance. Commercial rosmarinic acid was found in in-vitro tests to not have cytotoxic effects up to 5 ppm, while the extract we obtained was found to not have cytotoxic properties up to 10 ppm. Rosmarinic acid has been the subject of in vitro and in vivo investigations in the literature. Such research ought to be used to support this extract.



1. GİRİŞ

Adaçayı bitkisi günümüzde dünya çapında genellikle uçucu yağının kullanımı üzerine yaygındır. Özellikle *Salvia officinalis* türü tıbbi bitki tanımlamasında dünya genelinde kabul görmüştür. Bu tür, ülkemizde de kolay şartlarda yetiştirilmektedir. Uçucu yağ eldesinde kullanıldıktan sonra posa kısmı ve distillenmeden kalan sıvı kısmı biyo atık olarak kalmaktadır. Oysaki yapılan literatür taramasında adaçayı etken maddelerinin gıda takviyeleri gibi çeşitli yerlerde kullanımı henüz çok yaygın olmamakla birlikte bu posada ve destillenmeden kalan sıvı fazında oldukça kıymetli ve biyoaktivite ve farmakolojik çalışmaları son yıllarda daha da önem kazanmış sekonder metabolitler içermektedir. Bu metabolitler de çalışılmaya değer fitokimyasallardır. Doğal ürünlere olan ilgi son yıllarda oldukça artmış durumdadır. Bu tarz fitokimyasalların aydınlatılması ve kullanım alanlarının bilim yoluyla kanıtlanması insan sağlığı açısından oldukça önemlidir.

1.1. DOĞAL ÜRÜNLERİN TARİHSEL GELİŞİMİ

Doğal ürünler; bitkiler, hayvanlar veya mikroorganizma gibi çeşitli biyolojik kaynaklardan elde edilerek sağlık alanı başta olmak üzere birçok alanda kullanımı gerçekleştirilebilir [1]. Tarihsel kayıtlara bakıldığında Mezopotamya bölgesinde bulunan çivi yazılarında doğal ürünlerle tedavi şekillerinin tasvir edildiği gözlenmiştir. Günümüzde hala öksürük, soğuk algınlığında kullanılan *Cupressus sempervirens* (Cypress) ve *Commiphora species* (myrrh) yağları bu tabletlerde yer almaktadır. Mısırdaki bulunan Ebers Papirüsünde (Milattan Önce (M.Ö.) 1550) hastalık tedavi yöntemleri anlatılmakla birlikte 700 farklı bitki temelli yapılacak ilaçlarında ne şekilde hazırlanması gerektiğinden bahsedilmektedir [2]. Hitit medeniyetinden kaldığı kanıtlanan tabletlerde ise 30'dan fazla bitkiden bahsedildiği görülmüştür. Bu medeniyette hastalıkların kirlilik sebebiyle tanrının hastalıkları ceza olarak gönderdiğine inanılmaktadır. Bulunan reçeteler hastanın ne şekilde iyi olacağını tanımlamakla birlikte eğer iyi olmazsa ne denemesi gerektiğini de içermektedir [3]. The Chinese Materia Medica'da M.Ö. 1100 yılında 52 farklı reçete olduğu kayıtlara geçmiştir. Farmakognazinin babası olarak ismini tarihe yazdıran fizikçi, farmakolog ve botanikçi

olan Antik Yunan'dan Pedanius Dioscorides 'İlaçlar Bilgisi Üzerine' anlamına gelen "De Materia Medica" kitabını yazmıştır. Beş ciltten oluşan bu eserde bitkilerin basit sınıflandırılmasından başlayıp aromatik bitkiler, merhemler, yağlardan bahsetmiştir. Bunların yanı sıra bitkilerin hangi kısımlarının nerelerde kullanılması gerektiğinden, hangi bitkilerin zehirli olduğundan ve bunlar gibi birçok önemli konudan bahsetmiştir [4].

Bunlar doğal ürünlerin tarihsel gelişiminde dayandığı en eski yazılı kayıtlar olarak değerlendirilebilir. Yazılı kanıt niteliği taşıyan deliller olmasa dahi bilinen tarihin en eski zamanlarına gidecek olursak o zamanlarda da doğal ürünlerin tedavi etmek amacıyla kullanılmış olabileceğini düşünmek çok zor değildir.

Antik dönemde Knidos ve Kos tıp tarihinin merkezleri olarak bilinirdi. Knidos'ta Euryphon ve Kos'ta Hipokrat modern tıbbın gelişiminin ilk adımlarını atmaya başlamışlardı [5]. Hipokrat hastalarının iyileşmesinde hiçbir detayı atlamadan dikkatli ve titizlikle çalışmıştır. 'Besinin ilaç ilacın besin olsun' sözüyle besinin önemini vurgulamıştır. O dönemde hekimler tarafından kullanılan bitkiler arasında papatya anason, pelin otu, kişniş, kekik, yaban mersini gibi bitkiler bulunmaktadır. Fakat eski çağlardan başlayan modern tıbbın gelişimi sebebiyle o dönemlerde tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin neler olduğunun tam olarak bilinen sayısı azdır [6].

Yunan tıbbının önde gelen uygulayıcılarından biriside Galen'dir. Bergamada dünyaya gelmiştir. Tıp eğitimi için İzmir'den İskendireye'ye kadar dönemin ünlü hekimlerinden dersler almıştır. 400'den fazla eser yazdığı düşünülmektedir; günümüze ancak 140 tanesi ulaşmıştır. Sonraki dönemlerde 'galenik ilaçlar' olarak adlandıracağımız tedavi edici özelliği olduğunu düşündüğü 25'e varan bitki karışımlarından oluşan reçeteler yazmıştır [3].

Milattan sonraki yıllarda da bitkisel tedaviler revaçtaydı. Milattan sonra (M.S.) 828'de Müslüman Alim el Dinaveri'nin Botanik bilimine önemli katkıları olmuştur. Eserinin adı 'Kitab'ün Nebat'tır. Kitapta botanik terimler yer almaktadır. Bitki morfolojisi ile bitkilerin tıp alanındaki öneminden bahsetmiştir [7].

İslam tıbbının en önemli isimlerinden biri olarak kabul edilen Ebubekir Er-Razi kimyayı tıp ile birleştiren ilk hekimlerdendir. Kitaplarında formik asitten, sülfürik asitten bahsetmesinin yanı sıra sinameki ve demirhindi bitkilerinin droglarının hazırlanması ve distilasyon işlemlerini tarif etmiştir [8].

El-Biruni ise “Kitab-ül Al Saydala Fi’t-Tıbb” kitabıyla 300’e yakın bitkinin faydalarını ve nasıl kullanılacaklarını yazmıştır. İslam dünyasında ise eczacılığın babası unvanı Biruniye verilmiştir [9].

İslam dünyasında “Şeyhü’r Reis”, batıda ise “Avicenna” olarak bilinen İbn-i Sina’nın yüzlerce eseri bulunmaktadır. Bunlardan birinde 800’e yakın bitki ve hayvansal ürünlerin basit ilaçlar olarak kullanımından bahsetmiştir [3].

Osmanlı dönemini incelediğimizde de çok çeşitli bitkinin ilaç yapımında kullanıldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. İlaç karışımları hazırlanırken bitkilerin kök, tohum, yaprak, çiçek kullanılmıştır. Bunların yanı sıra reçine ve yağları da kullanılmıştır [10].

Doğal ürünler tedavi edici alanlarda kullanılırken çeşitli şekillerde isimlendirilmiştir. O dönemlerin tedavi kitapları, yazıtları, tarihi kalıntıları bunlar; geleneksel ilaç, iksir, yağ olarak genel tanımlarla belirtilmiştir. O dönemlerden günümüze efektif şekilde aktarılamayan kimliği belirsiz onlarca tedavi edici bitki olduğu düşünülmektedir [11].

Doğal ürünlere bu yönelim tarih boyunca ilerleme şekli aslında çoğu zaman deneme yanılma ile olmuştur.

‘Al, bu kökü ye. O kök kötü. Gel bu duayı oku. O dua batıl al bu iksiri iç. O iksir yanlış. Al bu hapi yut. O hap etkisiz. Gel bu antidepresanı al. O antidepresan işe yaramaz. Al, bu kökü ye.’(anonim). Şeklinde devam eden bir süreç haline gelmiştir.

Burada önemli olan gerçek bilimsel bilgiye ulaşmadaki istek ve çabadır. Bunun için doğal ürünlerden ilaç veya etken madde eldesi konuları üzerine detaylı çalışmalar yapmak için bütün bilgi birikimlerini bu alana harcayabilmek için oluşturulan bilim dallarına gereksinim duyulmuştur.

Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) yayınladığı verilere göre; ‘insanların % 80’ine yakınının hala günümüzde öncelikle bitki bazlı geleneksel tedavi edici yöntemlere yöneldiği’ not edilmiştir [12]. Bu yönelim potansiyeli olan bitkilerden etken maddeyi izole ederek direkt ve biyosentez yoluyla ilaç üretimi yolunu açmıştır.

1.2. FİTOKİMYA NEDİR?

Bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal ürünler içerdikleri sekonder metabolitler (fenolik asitler, flavonoidler vb.) sayesinde potansiyel tedavi ediciler olarak kullanılmışlardır. Sekonder metabolitler genellikle organizmanın çevre şartlarına uyum

sağlaması durumlarında üretilirler. Bitkiyi hayatta tutmak üzerine çalışmaktadırlar. Yani savunma mekanizmaları yardımıyla organizmanın hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır [13][14].

Bu sekonder metabolitler bitkiyi korumanın yanı sıra insan sağlığı üzerine olumlu etkiler bırakabilecek kimyasal maddeler salgılamaktadırlar. Bu tarz biyoaktif maddelere fitokimyasal maddeler denir [15]. Terpenler, alkaloidler ve fenolik asitler olacak şekilde ana başlıkları mevcuttur [16]. Etkisi kanıtlanan bu biyoaktif maddeler içerisinde fenolik asitler, saponinler, kumarinler, terpenler, tokoferoller, terpenler, izotiyosiyanatlar, karotenoidler, terpenoidler, alkaloidler ve indoller gibi alt grupları bulunmaktadır [17].

Fitokimyasallar üzerine genel bir literatür taraması yapıldığında bu maddelerin ortak olarak antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antikanser, anti-inflamatuar özellik gösterdiği görülmüştür [16].

1.3. DOĞAL ÜRÜNLERDEN ETKEN MADDE ELDESİNDE KULLANILAN EKSTRAKSİYON METOTLARI

Ekstraksiyon, organik bir maddenin çözücü yardımıyla ayrılması işlemidir. Bu işlem doğal ürünlerde ayırmak istediğimiz maddeye uygulanacak ilk ana işlemlerden birisidir. Ekstraksiyon işlemleri deneyde kullanılan materyal ve çözücüye göre farklı sınıflandırmalarda bir arada toplanabilir. Örneğin katı maddemize solvent uygulamasıyla çeşitli teknikler kullanılarak yapılan ekstraksiyona katı: sıvı ekstraksiyonu adı verilir. Burada önemli olan nokta katı materyalin sıvı çözeltiye geçişindeki difüzyon işlemi yavaş gerçekleşeceğinden katı partiküllerin boyutları küçültülmelidir [18]. Bunun gibi birbiri ile karışmayan iki sıvı yardımıyla, hem polar hem apolar özellik gösteren bir maddeyi bir fazdan diğer faza çekme şeklinde hazırladığımız bir deney prensibimiz mevcutsa sıvı: sıvı ekstraksiyonu kullanabiliriz. Burada dikkat edilmesi gereken nokta iki sıvı arasındaki yoğunluk farkının olmasıdır. En temel kuralları arasında katı maddelerin partikül boyutu, çözücü: katı oranı, ekstraksiyon süresince optimum sıcaklık denemeleri, farklı ekstraksiyon tekniklerinin denenmesidir. Bunların hepsi ekstraksiyon verimini etkileyen faktörler arasındadır [19].

Çözücü seçimi yaparken ekstrakte etmek istediğimiz maddenin kimyasal özelliklerini iyi bilip ona göre çözücüler seçilmelidir. Benzer benzeri çözer ilkesiyle seçilmesi gereken çözücüde seçicilik, çözünürlük, maliyet, güvenlik parametreleri de göz önünde

bulundurulmalıdır. Fitokimyasal analizlerde en çok tercih edilen çözücüler etanol ve metanoldür.

Partikül boyutu aşırı absorpsiyona sebep olmayacak kadar küçültülmelidir. Aşırı küçük olduğu durumlarda sonrasında filtrasyon uygulanabilir. Sıcaklık ayarlaması yapılırken ilk dikkat edilmesi gereken izole etmek istediğimiz etken maddenin sıcaklık ile bozunmayacağından emin olmamızdır. Yüksek sıcaklıklarda çözünürlük ve difüzyon artacaktır fakat bu sefer istenmeyen başka safsızlıklar da ekstraksiyon çözücüsüne geçebilmektedir. Yüksek sıcaklıklarda çözünürlük ve difüzyon artacaktır fakat bu sefer istenmeyen başka safsızlıklarında ekstraksiyon çözücüsüne geçmesi kolaylaşacaktır. Bu çok istenmeyen bir durumdur. Bu sebeple sıcaklık ekstraksiyon metodu için önemli bir parametredir. Bir başka önemli parametrede ekstraksiyon süresidir. Süre ayarlanırken belirli bir zaman içerisinde çözücü dengelenir ve bu süreden sonra devam eden süreler ekstraksiyon veriminde anlamlı artış yapmamaktadır [20].

Ekstraksiyon metotlarından bazılarını inceleyecek olursak geleneksel metotların yanı sıra gelişen teknoloji ve yeşil kimya uygulamalarına olan ilginin de artmasıyla bazı yenilikçi metotlar da mevcuttur. Maserasyon ve sokslet ekstraksiyonu geleneksel metotlar arasında geçmektedir. Maserasyon ekstraksiyon yöntemleri içinde en geniş kullanım alanına sahiptir. Çözücü seçimi polariteye göre değişkenlik gösterebilir. Süre genellikle uzundur. Sıcaklık uygulaması yapılabilir. Kullanılan çözücü miktarı genellikle fazladır. Sokslet ekstraksiyon düzeneği ile organik çözücüler kullanılabilir. Kullanılacak çözücü maserasyonda olduğu gibi izole etmek istediğimiz numunenin polaritesine göre belirlenebilir. Genellikle sabit yağları izole etmek için hekzan gibi apolar çözücülerin kullanıldığı bir yöntemdir. Kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığına kadar çıkılabilir [21].

Geri soğutucu yardımıyla reflaks sistemlerinin kurulduğu distilasyon tekniğine dayalı ekstraksiyon çeşitleride mevcuttur. Burada genellikle deiyonize su kullanılır. Örneğin uçucu yağ elde etme yöntemlerinden biri olan klevenger apartı düzeneği kurularak bitkilerden hidrolat ve uçucu yağlar elde edilebilir [22].

Yenilikçi yöntemlere bakacak olursak ortak özellikleri en temel anlamda daha az çözücü ile daha kısa sürede gerçekleştirebildiğimiz yöntemlerdir. Bu yöntemlerin başlıcaları ve son dönemlerde en çok kullanılanlardan bazıları; süperkritik akışkan sıvı, ultrasonik destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, enzim destekli

ekstraksiyondur.

Süperkritik akışkan ekstraksiyon süper akışkan sıvı kullanılmaktadır. Her maddeye özgü kritik sıcaklık değeri ve kritik basınç değerleri mevcuttur. Bu değerler üzerindeki koşullar sağlandığında süperkritik akışkan fazına geçebilmektedir.

Süperkritik akışkanlar yüksek difüzyon katsayısına sahiptir, kimyasal kalıntı bırakmazlar, ekstraksiyonlarda karbondioksit gibi defalarca kullanılabilen gaz kullanılabilir [23].

Ultrasonik destekli ekstraksiyonda deiyonize su ve organik çözücüler kullanılabilir. Çözücü seçimi ekstre edilmek istenen maddeye göre yapılır. Doğal ürünlerden etken madde izolasyonunda çok tercih edilen metotlardan bir tanesidir. Ultrasonik kavitasyon prensibi ile çalışır. Ultrason uygulamasıyla bitki hücre duvarlarında yırtılma oluşur. Bu sayede etken maddeye efektif şekilde ulaşım sağlanmış olur. Bu metodun avantajı süreden kazanç sağlaması az çözücü ile etkili sonuçlara ulaşılabilmesidir [24].

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda mikrodalgalar dediğimiz 300MHz ile 300GHz arasında olan dalgalar yardımıyla sıcaklık ve basınç kontrolünde kaplı kap içerisinde gerçekleşen ekstraksiyon metodudur. Bu yöntemde çok az miktarda çözücü kullanılır ve süresi çok kısadır. Verim olarak da azımsanamayacak oranda ekstraksiyon verimi elde edilmektedir [25].

Enzim destekli ekstraksiyon incelendiğinde; bitki hücre sitoplazmasında bulunan etken maddenin daha kolay salınmasını sağlamaktadır. Bu mekanizmanın işleyişi; hidrojen bağları ile birbirlerine bağlı olan veya herhangi bir sebepten çözücü ile etkileşemeyen etken maddelerin enzimatik ön muamele ile bağlı bileşiklerin serbest bırakılması esasına dayanmaktadır. Örneğin selüloz vb. spesifik enzimler yardımıyla ekstraksiyonun daha etkili gerçekleşmesi için hücre duvarının parçalanmasını sağlayıp etken maddenin salınımını kolaylaştırmaktadır [26].

1.4. DOĞAL ÜRÜNLERDE KALİTE KRİTERLERİ

Sağlık alanında tüketilecek olan ‘doğal ürün’ etiketli ürünler tüketicide tamamen güvenli algısı oluşturuyor. Fakat güvenilirliğinden emin olmadan bilinçsizce tüketilen bu ürünler kimi zaman tedavi etmek yerine istenmeyen etkilere yol açabiliyor. Doğal ürünlerdeki bilinmeyen içerikler bilinmeyen etken madde miktarları bu olumsuzluklara

sebepe olabiliyor. Hatta aktif olarak günlük kullanılan ilaç var ise o ilaçla etkileşime girerek hayatı tehdit eden sorunlar açabiliyor [27].

Doğal rnler ve ilaç etkileşimleri ilaç-ilaç etkileşimlerindeki farmokokinetik farmokodinamik ilkelerine benzemektedir. Farmakokinetik etkilşimler emilim, dağılım, metabolizma ve atılımındaki değişikliklerdir. Farmakodinamik etkileşimler ise bitkisel ürünler-ilacı arasında sinerjik etki oluşabilir bu oluşum ilacın etkisini artırır ya da antagonistik etki ile etkinin istenmeyen düzeyde azalmasına ve akabinde tedavinin tam olarak gerçekleşmemesine sebepe olabilir [28].

Bunun yanı sıra literatüre baktığımızda sarı kantaron, ginkgo, ginseng, zencefil, sarımsak, efedra, ekinezya ve kedi otu gibi bazı bitkilerin ilaçlarla etkileşime girdiği yer almaktadır [28].

Tıbbi bitkilere ait gerekli bilgiler detaylı şekilde Türkiye İlacı ve Tıbbi Cihaz Kurumunun (TİTCK) sitesinde yayınlanmıştır [29].

Doğal rnler denildiği zaman en çok bilinen ve kullanılan nihai ürünler yağlar, ekstraktlar, macunlardır. Doğal rnlerin kullanımı binlerce yıllık insan deneyimine dayanan bir olgudur. Son yıllarda bu ürünlerin kullanımının artmasıyla kalite kontrol ve değerlendirme yöntemlerinin önem kazandığı bilinmektedir. Fakat kalite kontrol mekanizması içeriğinde kimyasal ilaçlara uygulanan ekstraksiyon, tanımlama, saflık, kalite ve farmakolojik etkiler için bilimsel yöntem ve gereklilikleri doğal olarak elde edilen ürünlere uygulamamız tam olarak mümkün olmasa da kalitenin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir [30].

Doğal bitkisel ürünlerin güvenilir bir şekilde fitoterapik olarak kullanılmasında en önemli basamaklar sırasıyla; açıkça aktif bileşen veya bileşenlerin tanımlanması, her adımda uygun kontrollerin uygulanması ve ürünlerin stabilitesinin sağlanmasıdır. Bu rnlerin kontrolleri yapılmadan tüketildiğinde olumsuz sonuçlara yol açabilir. Çünkü ham bitki materyali dahi çevresel etkenlere bağlı olarak içerdiği etken madde miktarını artırıp azaltabilmektedir. Bu değişiklik bitki içerisindeki etken madde oranını etkileyebilir [31].

Tüm bunlar baz alındığında doğal kaynaklı bir ürünün kullanılabilir olduğunun kararına varabilmek için fiziksel özelliklerinin belirlenmesi rengi, kokusu gibi spesifik özelliklerin tanımlanması gerekebilir. Elde edilen nihai üründe herhangi bir kontaminasyon olup olmadığının analiz edilmesi ve saklama koşulları ve raf ömrünün

doğru bir şekilde belirlenmesi gerekir. Özellikle etken maddenin kalitatif ve kantitatif parametrelerini açıkça bildirecek bazı analizlerin yapılması ve uygun etiketlemelerin yapılması gerekmektedir [27].

1.5. DOĞAL ÜRÜNLERDEN İLAÇ KEŞFİ

Doğal ürünlerin sağlık alanında kullanımı neredeyse insanlık tarihi kadar eski diyebiliriz. Yazılı kaynaklara baktığımızda bitkilerin tedavi edici olarak kullanıldığını kanıt niteliğinde görmüştük fakat daha da eskilere gittiğimizde insanoğlunun hayatta kalma içgüdüleriyle hastalıkları karşısında birçok şeye başvurduğu bunlardan birinin de bitkiler olabileceğini düşünmek zor değildir. Bunlar o günlerden bugüne geleneksel tamamlayıcı tedaviler olarak gelmiştir diyebiliriz.

Modern tıpta ise durum bundan farklıdır. Modern tıbbın temeli ise tamamıyla bilimsel bilgi kaynaklarını baz almaktadır. Modern tıpta kullanılan ilaçlardan bitkisel kaynaklı ilaçlar da mevcuttur. Bunlar doğal ürünlerden farklı olarak güvenilirliği test edilip onaylanmış ilaçlardır. Tarihsel gelişime bakılacak olursa ilaç olarak üretilen ilk bitki destekli ilacın üretiminden yıllar önce de insanlar tarafından bitkisel olarak tedavi edici özellikleriyle kullanıldığı saptanmıştır. Buna en güzel örnek 19. Yüzyılda sentetik olarak üretilen aspirindir. Aspirinin etken maddesi olan salisilik asit sayesinde antik Mısır da dahi ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak kullanıldığı literatüre yansımıştır. Bu durum bize gösteriyor ki modern ilaçların keşfinde tarihe dayanan bitkisel ürün kullanımının değerlendirilmesi yatıyor [32].

Doğal kaynaklardan elde edilen ilk ticari ilaç morfindir. Afyon çiçeği bitkisinden elde edilmiş olup içerisindeki alkaloidler sayesinde kuvvetli ağrı kesici özellik göstermektedir. İlk üretildiğinde kontrolsüz bir şekilde ağrı kesici olarak piyasaya sürülen bu ilacın bağımlılık yaptığı farkedilip kullanımı özel durumlara bağlanmıştır [33].

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre bitkisel ilaçların kullanımının arttığı bildirilmiştir. Bu durumda doğal bitkisel ürünlere olan yönelim de artırmıştır. Fakat bu durum üretilen bu ürünlerin güvenirliliğinin de sağlanması gerektiğini göstermektedir.

1.6. DOĞAL ÜRÜNLERDEN ELDE EDİLEN ETKEN MADDELERİN TAYİN YÖNTEMLERİ

Doğal bitkisel ürünlerden elde edilen ürünlerin analizlerinin yapılması için kromatografik yöntemler veya spektroskopik yöntemler fazlasıyla kullanılmaktadır. Kromatografi; ekstrakttaki etken maddelerin ayrıştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Temeli hareketli faz ve durgun faz arasındaki polariteye bağlı etkileşimlerle bazı moleküllerin alıkonması bazılarının durgun faz olan kolonu daha erken dedektöre ulaşmasıyla ekrana yansıyan piklerin değerlendirilmesi işlemidir. Bu değerlendirme var-yok analizi ve miktar tayini hesaplamasını içermektedir. Genellikle öncelikle elde etmek istediğimiz etken maddenin standardı literatürdeki metotlara göre veyahut metot geliştirilerek okunur. Sonrasında ekstre aynı metotla okunarak standartla karşılaştırılması yapıp nitel ve nicel analizler hakkında bilgi verir [34].

Spektroskopi ise elektromanyetik ışınların madde ile etkileşimini inceleyen bilim dalıdır. Genel anlamda gönderilen ışının absorpsiyonu ve geçirgenliğine bağlı verileri ekranda görmemizi sağlar. Bu etkileşim sonucu ekranda gözlemlediğimiz spektrum sayesinde tanılama ve madde miktarı ölçümü gerçekleştirilebilir [35].

Güvenilir bu ürünün elde edilmesi sırasında izlenecek yolların başında kullanılacak bitkinin tanımlanmasının doğru yapılması gelmektedir. Sonrasında belirlenen optimize ekstraksiyon yöntemi uygulanarak derişik şekilde etken madde eldesi ve elde edilen bu maddenin analitik cihazlarla doğrulanması gerekmektedir. Doğal ürünlerden elde edilen ekstrelerin optimizasyonu sağlandıktan sonra bu optimize ekstraksiyon metodunun güvenilirliğini kanıtlamak için bir takım analitik cihazlardan yararlanmamız gerekmektedir. Burada elde edilen ürüne göre farklı cihazlarda ürünün kalitatif ve kantitatif analizleri yapılabilir.

Birçok analitik cihaz kullanılabilir. En çok kullanılabilecek cihazlar arasında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Sıvı kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS), Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS), UV-Vis Spektrofotometresi-Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi, FT-IR Fourier Dönüşü Kızılötesi Spektroskopi en efektif sonuçları verebilecek analitik cihazlardır. Bu cihazlar sayesinde elde etme, tanılama, miktar tayini vb. analizler gerçekleştirilebilir.

HPLC tekniği ile bileşenlerdeki maddeleri ayırmak ve tayin etmek için kullanılır. Temel prensip hareketli faz ile bitkilerden elde edilen ekstrelerdeki etken maddelerin durgun

faz üzerinde ilerleyerek detektöre ulaşıp verdiği sinyallerin incelenerek nitel analizlerini veya nitel analizlerini yaptığımız, istenilen maddenin olup olmadığının tayini ve varsa miktarının ne olduğu hesaplamada kullanılır [36].

LC-MS Sıvı kromatografisi- kütle spektroskopisi tekniklerinin bir arada kullanılmasıyla veri sağlayan analiz yöntemidir. Sıvı kromatografisi kışında HPLC benzeri olarak bileşenleri ayırmak için mobil faz ve sabit faz yardımıyla yapılan ayırma tekniğidir. Sonrasında ise Kütle spektroskopisi ile bileşiğin kütle-yük oranına dayanarak molekül tanımlaması yapılarak molekül ağırlığı belirlenebilir. Bitkisel ekstrelerde bu analiz yöntemleri ile ekstredeki etken bileşenin diğer bileşenlerden ayrılması veya zenginleştirilmiş olarak elde edilen ekstrelerde etken maddenin saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek için kullanılabilir. Bitkisel bir ilaç geliştirmede, kalite kontrol için kullanılabilecek önemli tekniklerden biridir [37].

GC-MS uçucu faza geçebilen organik moleküllerin tayininde kullanılır. Bu cihaz ile genellikle bitkilerden elde edilen yağların içerikleri belirlenir. GC-MS'te GC kısmında ayırım gerçekleşir ve MS kısmında ise bileşenlerin molekül kısımları belirlenir. Ve dedektörden elde edilen sinyallara göre elde edilen uçucu bileşenlerin yüzdesel oranları verilmektedir. Uçucu yağlardaki bileşenlerin kalitatif tayini ile karakterizasyon ve kalite kontrol basamaklarında bu analize başvurulabilir. Sabit yağlarda ise yağ asitlerinin kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılabilir [34].

UV-Vis spektrokopisi bir bileşiğin görünür bölgedeki absorpsiyon özelliklerini ölçerek çözelti içerisindeki madde konsantrasyonunun belirlenmesini ölçer. UV-Vis spektrometresinde ışık kaynağından gelen ışınlar örnek çözeltiden geçerken bir kısmı soğurulur ve detektöre gelerek ışığın şiddetini ölçerek spektrumu kaydeder. Bu spekturum yapılan analize göre absorpsiyon grafiği veya çözeltinin konsantrasyonu hakkında bilgi verebilir. Bitkisel ekstreler için en çok yapılan analiz toplam fenolik, flavonoid miktarlarının belirlenmesi veya antioksidan aktivitesinin belirlenmesini sağlayabilir [38].

FT-IR Fourier Dönüşü Kızılötesi Spektroskopi kızılötesi ışınları moleküller arasındaki bağların titreşim frekanslarını etkileyerek moleküllerdeki bağları ve fonksiyonel grupları hakkında bilgi verebilir. Ölçümü yapılan maddenin aldehit, alkol, amin veya karboksilik asit gruplarının varlığından bahsedilebilir. Bitkisel ekstrelerde kullanımı ile ekstrelerde standartlaştırma analizlerinde ve saflık tayinlerinde kullanılabilir [39].

2. ADAÇAYI

Lamiaceae yani Ballıbabagiller familyasına ait aromatik ve tıbbi bitki olarak bilinen adaçayı (*Salvia officinalis* L.) çok yıllık bir bitkidir. Kökeni Akdeniz bölgesine dayanmaktadır [40]. Lamiaceae familyasına ait bitkilerin çoğunda uçucu ve aromatik yağlar bulunmaktadır. Genellikle hoş kokuludurlar ve içerdikleri etken maddeler benzerdir [41].

Dünya genelinde yaklaşık 900 tür bulunmaktadır. Türkiye bulunan tür sayısı ise 97'dir. Ticari olarak yetiştirilenler *Salvia fruticosa*, *S. cryptantha*, *S. multicaulis*, *S. sclarea* ve *S. tomentosa* türleridir [41].

Salvia officinalis ise ülkemizde doğal olarak bulunmasa da kültürü yapılarak kolayca yetiştirilebilen bir bitkidir. Düzce ili TÜİK verilerine göre üretim miktarı 5 ton elde edilen verim 111 kg/da olarak 2019 yılında kayıt edilmiştir [42]. Dış Ticarete bakıldığında hem bitkisel çay olarak hem de adaçayı yağı olarak pazara açıldığı görülmektedir. Türkiye adaçayı üretimine bakıldığında son beş yıl yapılan veri incelemesinde yaklaşık yıllık 15 bin ton üretim yapıldığı kaydedilmiştir.

Salvia officinalis bahçe süsleme, kozmetik, boya, gıda ve doğal koruyucu gibi alanlarda da yoğunlukla kullanılmaktadır. Adaçayı çay olarak kullanılmakla birlikte eski yıllarda halk hekimliğinin olduğu zamanlarda da en çok kullanılan bitkilerin arasındadır. Terapötik açıdanda yapılan bilimsel çalışmalarla da değerli bir bitki olduğu kanıtlanmıştır. Tıbbi amaçlı kullanımda en çok rastlanan durum boğaz ağrıları, influenza, bronşit, öksürük gibi rahatsızlıklarda oldukça etkili olduğu kanıtlanmış ve yıllardır tıbbi aromatik bitki olarak bu amaçlarla kullanılmışlardır [43].

TİTCK'nin internet sitesinde yer alan tıbbi aromatik bitki listesinden adaçayı incelendiğinde kullanılan kısmının yapraklar olduğu familyasının Lamiaceae olduğu İngilizce'de sage olarak Türkçede adaçayı olarak bilindiğinden bahsedilmiştir. İlaç etkileşim bilgisi olarakda antidiyabetikler, antikonvülsanlar ve sedatifler olduğuna değinilmiştir. Bununla birlikte uçucu yağında bulunan ve nörotoksik olduğu bilinen bu maddeye karşı dikkatli olunması gerektiği vurgulanmıştır [44].

2.1. ADAÇAYININ FARMAKOLOJİDE KULLANIMI

Lamiaceae familyası üyesi olan *Salvia* bu familyanın en büyük ailesinden biridir. Yüzlerce tür bulunduran bu türde bizim tezimiz kapsamında incelemesini yaptığımız tür *Salvi officinalis*dir. Kendine has kokusu ve tadı olan bu bitki dünya çapında gıda sektöründe baharat olarak ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Halk arasında tedavi edici olarak da kullanılan bu bitkinin ülser, nöbet, romatizma, iltihaplanma, felç gibi farklı rahatsızlıklara karşı kullanıldığı not edilmiştir. Bunların yanı sıra en yaygın kullanımı ise hazımsızlık, şişkinlik, boğaz iltihaplanması, öksürük gibi rahatsızlıklarda kullanımıdır [40].

Son yıllarda yapılan bu geleneksel kullanımların anlamlı olup olmadığını kanıtlamak için çok sayıda çalışma yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar, antikanser, , anti-nosiseptif, antioksidan, antimikrobiyal, antimutajenik, anti-enflamatuar, antidepresan, hipoglisemik ve hipolipidemik etkiler dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklar üzerine adaçayının farmakolojik aktivitelerinin ortaya çıkarmak için yapılmıştır. Bu çalışmalar ışığında olumlu not edilen durumlarda hangi etken maddenin bu olumlu durumu meydana getirdiğine dair çalışmalarda yapılmıştır [40].

*Salvia officinalis*te bulunan etken maddelerin elde edilmeleri çoğunlukla hidrodistilasyonla uçucu yağının eldesi, alkolik ekstresinin hazırlanması veya sulu ekstraktının hazırlanması olarak literatüre geçmiştir. Uçucu yağlarında bulunan ana bileşenler borneol, kafur, karyofil, sineol, humulen, pinen ve tujondur. Alkolik veya suyu ekstraktında bulunan ve tespiti yapılan etken maddeler ise; flavonoidler, özellikle rosmarinik asit ve luteolin-7-glukozit ve kafeik asit ve 3-Kafeoilkinik asit gibi fenolik asitler bulunur. Rosmarinik asit en bol bulunan flavonoiddir [45].

Salvia officinalis için yapılan bazı klinik çalışmalar mevcuttur. Örneğin rapor edilen bir çalışmada Hafıza ve bilişsel işlev üzerindeki etkiler araştırılmıştır. Rastgele seçilmiş kontrol grubuna karşı Alzehmeir hastalarına 16 hafta boyunca 60 damla alkolik ekstrakt verilmiş ve bilişsel fonksiyonlarda iyileşme gözlenmiştir. Başka bir çalışmada rastgele seçilmiş kontrol grubuna karşı sağlıklı genç katılımcılar 300-600 mg enkapsüle edilmiş kurutulmuş yapraklar verilmiştir ve tek dozdan sonra bile sonra ruh hallerinde ve bilişsel işlevlerinde iyileşme gözlenmiştir. Bunun gibi birçok örnek bilişsel fonksiyonların geliştirilmesi adına denenmiştir [46].

Boğaz ağrısı üzerine etkisinin incelenmesi üzerine yapılan çalışmalarda faranjit ağrısı

eken bir gruba doz başına 140 µl bitki özü içeren sprey uygulaması yapılmış ve boğaz ağrısının hafiflediğı not edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada glikoz ve lipidler üzerinedir. Primer hiperlipidemisi olan hastalara 500 mg enkapsule edilmiş hidroalkolik ekstrakt 2 ay boyunca 8 saatte bir uygulanmıştır. Toplam kolesterol, trigliserit, kan seviyelerinin düşürülmesi; HDL seviyesinin arttığı gözlenmiştir.

Hiperlipidemik tip 2 diyabet hastaları 500 mg enkapsule edilmiş hidroalkolik ekstrakt 2 ay boyunca 8 saatte bir uygulanmıştır. Kan glikoz, toplam kolesterol, trigliserit ve LDL düzeylerinin düştüğü; HDL seviyesinin arttığı gözlenmiştir.

Tip 2 diyabet hastaları 3 ay boyunca günde 3 kez 150 mg adaçayı ekstresi kullanılmış ve toplam kolesterolü azalttığı, açlık glukozu, trigliserit, LDL ve HDL üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür.

İncelenen başka bir klinik çalışmada ameliyat sonrası ağrı, bulantı ve kusma gibi yan etkilerin aromaterapi ile azaltılıp azaltılamayacağına bakılmıştır. Çalışma düzenlenirken rastgele 3 grup oluşturulmuştur. Bu gruplardan biri lavanta aromaterapi biri adaçayı yağı ile aromaterapi ve kontrol grubu oluşturulup ameliyat sonrasında 3 ve 6 saat sonra inhalasyon yoluyla uygulaması yapıldı. Adaçayı uygulamasında ağrının önemli derecede azaldığı, mide bulantısının dş eğıliminde olduğı, lavanta inhalasyonunda ise adaayına göre düşük değerler not edilmiştir [47].

Bu klinik çalışmaların yanı sıra biyoaktif özelliğinin belirlenmesi adına çalışmalar da yapılmıştır. Bu alışmalar kapsamında yapılan ana çalışmalar antikanser etkisi, antioksidan aktivitesi, anti-inflamatuvar etkisi, antiseptik etkisi, bilişsel ve hafıza güçlendirme üzerine etkileri, metabolik etkileri, toksikolojik etkileri, antikolinesteraz aktivite, nöroprotektif aktivite üzerine onlarca çalışma mevcuttur.

2.2. ADAÇAYININ KİMYASAL BİLEşENLERİ

Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) tıbbi ve aromatik bitkiler içerisinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle adaçayı yağı dünya genelinde ticari alanlarda kullanılmaktadır. Adaçayının içeriğindeki bileşenler incelendiğinde aromatik bileşen içeren uçucu yağı ait bileşenler mevcuttur. Uçucu olmayan sıvı ekstrelerine geçebilen polifenoller de mevcuttur. Uçucu bileşenleri tayin edidiğinde ana bileşenler olarak 1,8-sineol, kafur, α-

tujon, β -tujoe, α -humulen yüksek oranlarda saptanmıştır. Polifenollerine bakıldığında ise özellikle rosmarinik asit, kafeik asit, kuersetin gibi etken maddeler tanımlanmıştır [48].

Adaçayı türlerine bakıldığında en yüksek oranda verimin genellikle *Salvia officinalis* L.'den alındığı literatürde belirtilmiştir. Yaprakların kuru ağırlıkları bazında elde edilen yağ verimi 0,5-1,5% aralığında değişmektedir. Bu değişim adaçayının o dönemdeki çevre koşullarına bağlı olabileceği yine yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Uçucu yağ verimini etkileyen kriterlerden başlıcaları ortalama sıcaklık, nem, yağıştır [49].

Adaçayı uçucu yağlarında farmakolojik etki gösteren bileşenler tujon, kafur ve 1,8-sineoldür [50].

Yapılan bir çalışmada farklı ülkelerden toplanan adaçaylarının uçucu yağları elde edilerek GC-MS yardımıyla uçucu bileşenleri belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen ana piklerden elde edilen veriler Çizelge 2.1'de gösterilmiştir [51].

Salvia officinalis'in dünya çapında genellikle uçucu yağı kullanılmaktadır. Fakat bunun yanı sıra önemli bir fenolik ve flavonoid kaynağıdır. Sekonder metabolitler sınıfına giren bu kimyasal yapılar bitkinin sekonder metabolit üretmeye ihtiyaç duyduğu anlarda artabilmektedir. Buna sebep olan birçok faktör mevcuttur. Bunlardan başlıcaları sıcaklık, nem, yağış hatta bitkinin hasat edildiği dönem ve saat aralığı dahi bitkinin ihtiva ettiği sekonder metabolit oranını etkileyebilmektedir. Bu etkenlerin en önemli ve ilk keşfedilen özellikleri arasına sayabileceğimiz özellikleri çok güçlü antioksidan etkiye sahip olmaları antibakteriyal özellik göstermeleri, radikal süpürücü etkilerinin olmasıdır.

Yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde çoğunluğu fenolik ve flavonoid bileşen olacak şekilde neredeyse yaklaşık 160 adet polifenol bileşen içerdiği görülmüştür. Yapraklarında yapılan ekstraksiyonlar tayin edildiğinde gözlenen etken maddelerinden bazıları şunlardır; rosmarinik asit, kafeik asit ve türevleri, salvianolik asit, kumarin, yunnaneik asit. Önemli olan flavonoidleri arasında da hispudilin, luteolin 7-O-glukozit, apigenin, kamferol ve kuersetin bulunmaktadır [52].

Detaylı literatür tarandığında 4-Hidroksibenzoik asit, kafeik asit, salvianolik asit, metil salvionalat I, sagekumarin, sagerinik asit, cis-p-kumarik asit 4-(2-apiosil)glukozit, trans-p-kumarik asit 4-(2-apiosyl)glukozit, 6-ferulil-a-glukoz, 1-(2,3,4-trihidroksi-3-metil)butil-6-ferulolglukozit, 6-kafeoil-1-fruktosil-a-glukozit, 1-p-hidroksibenzoil-6-

apiosylglukozit, 4-hidroksiasetofenon 4-glukozit bileşenleri *Salvia officinalis* L.'de tanımlanan ilk kimyasallar arasındadırlar [52].

Salvia da elde edilen maddelerin çoğu kafeik asidin türevleridir. Kafeik asit Lamiaceae familyasında bitkinin biyokimyasında rol oynamaktadır. Oluşan bileşenlerin çoğu kafeik asitin bir türevi bir esteri şeklinde oluşmaktadır. Örneğin rosmarinik asit kafeik asidin bir esteridir.

Çizelge 2.1 GC-MS Çalışmaları sonucu elde edilen bazı veriler.

Uçucu Bileşenler	Fransa	Macaristan	Rusya	Yunanistan	Ukrayna	İskoçya	İtalya	Türkiye Isparta
a-pinen	3,5	5,8	4,4	5,1	3,7	0,2	-	2,80
Kampen	5,3	5,1	7,1	5,9	3,6	0,2	5,8	3,52
1,8-sineol	11,9	14,6	17	45,3	13,7	9,1	11,8	17,93
a-Tujon	21	18,6	16,2	3	22,4	6,8	23,0	20,66
b-Tujon	10,1	6,6	7,1	1,5	11,6	1,6	3,8	9,11
Kafurr	23,9	13,7	28,5	11,3	12,9	29,8	26,8	19,93
Borneol	2,6	5	2,8	1,6	3	11,8	-	4,56
Bornil asetat	2,6	1,2	1,9	0,1	1,9	7,8	-	1,28
(E)-b-Karyofilen	3,4	2,9	0,9	4,9	2,7	1,6	-	4,41
a-Humulen	3,3	2,6	2	0,4	2,1	1,8	-	1,78
Viridiflorol	5,6	8,3	4,5	1,1	7,9	4,5	-	2,21

3. ROSMARİNİK ASİT

3.1. ROSMARİNİK ASİT HAKKINDA GENEL BİLGİ

Labiatae familyasına ait bitkilerin birçoğu halk arasında uzun yıllardır bitki olarak veyahut yağı çıkarılıp, çayı demlenip tüketilmek suretiyle yardımcı tedavi olarak kullanılmaktadır. Bilimsel bilginin gelişmesiyle yapılan çalışmalara bakıldığında bitkilerin tedavi etme mekanizmalarının çözülmesi amacıyla, gerçekten bu bitkilerin iyi gelip gelmediği veya içerdikleri etken maddelerin neler olduğunun tanımlanması yapılmıştır. Bu etkili bileşiklerin çoğunun sekonder metabolitler olduğu *in vivo*, *in vitro* çalışmalarca incelenmiştir. Birçok hastalık üzerine etkili olup olmadığı bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu familyaya ait bitkilere sahip etken maddelerin halsizlik, depresyon, bilişsel gelişim, hafıza, dolaşımın desteklenmesi, hazımsızlık, üst solunum yolu hastalıkları gibi başlıca rahatsızlıklarda etkisi olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda genel anlamda antioksidan, antimikrobiyal, antibakteriyal etkinlikler gibi birçok biyoaktif özelliklere sahip olduğu da yazılan yayınlarda bildirilmiştir. Bunun yanı sıra anti-alerjik, anti-inflamatuvar, antidepresyon gibi hastalıklar üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Rosmarinik asit; kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asitin esteridir. Rosmarinik asitin ilk olarak tanımlanması ise İtalyan kimyagerler Scarpati ve Oriente tarafından 1958’de yapılmıştır. *Rosmarinus officinalis* bitkisinden izole edilmiştir. Bu yüzden tespit edilen etken maddenin adını rosmarinik asit olarak tanımlamışlardır [52].

Rosmarinik asit ise Lamiaceae familyasında bulunan birçok bitkideki bir sekonder metabolittir. Yapılan çalışmalarda rosmarinik asit melisa, biberiye, nane, adaçayı, kekik gibi yaygın kullanılan bitkilerde yüksek oranda bulunan antioksidan özellikli bir polifenol olarak tanımlanmıştır [53].

Son yıllarda doğal ürünler üzerine yapılan çalışmaların sayısı insanların doğal ürünlere yönelmesiyle artış göstermiştir. Rosmarinik asit için de tanımlandığı zamandan itibaren birçok çalışmaya konu olmuştur. Rosmarinik asit ilk olarak Lamiaceae familyasında tanımlandığı için bu familyaya ait yapılan ekstraksiyon çalışmalarında da yüksek miktarlarda rosmarinik asit olduğu literatürde bildirilmiştir. Ayrıca yapılan literatür

taramasında Çizelge 3.1’ de görüldüğü gibi rosmarinik asitin Lamiaceae familyasındaki çoğu bitkide varlık göstermesinin yanı sıra Blechnaceae, Cannaceae, Celastraceae, Apiaceae, Chloranthaceae, Araceae, Boraginaceae, Asteraceae, Oleaceae, Rubiaceae, Araliaceae, Sterculiaceae, Convolvulaceae, Polypodiaceae, Cucurbitaceae, Liliaceae, Fagaceae, Scrophulariaceae familyalarında da rosmarinik asitin varlığı ve etkileri üzerine çalışmalar yapılmıştır [54].

Yapılan detaylı literatür çalışmasında onlarca farklı bitkide rosmarinik asit varlığı ve bu fenolik asitin etkisi üzerine bilimsel çalışmaya rastlanmıştır. Sonrasında bu çalışmaya konu olan bitkilerden hangilerinin Türkiye’de doğal yayılım gösterdiğine dair Tarım ve Orman Bakanlığına ait ulusal dijital herbaryum veri tabanından ve Türkiye Bitkileri ve Veri Servisine ait siteden bilgiler toplanarak aşağıdaki tablo oluşturulmuştur. Bu tablo Türkiye’de doğal olarak yetişebilen ve içerisinde rosmarinik asidin varlığı uluslararası yayınlarla kanıtlanmış bitkilerin listesini göstermektedir.

Çizelge 3.1. Rosmarinik asit içeren bitkiler.

Bitki	Bulunduğu Aile	Çalışılan Kısım
<i>Anchusa azurea</i> Miller var. <i>azurea</i>	Boraginaceae	Kök
<i>Anchusa italica</i> Retz.	Boraginaceae	-
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Hedera helix</i> L.	Araliaceae	-
<i>Lallemantia iberica</i> (Bieb.) Fisch & C.A. Mey	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Lycopus europaeus</i>	Lamiaceae	-
<i>Marrubium vulgare</i> L.	Lamiaceae	-
<i>Melissa officinalis</i> L	Lamiaceae	Yapraklar
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson subsp. <i>Longifolia</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Mentha piperita</i> L.	Lamiaceae	Yapraklar
<i>Mentha dumetorum</i>	Lamiaceae	-
<i>Micromeria myrtifolia</i> Boiss. & Hohen	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>Hirtum</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar

Çizelge.3.1 (devam) Rosmarinik asit içeren bitkiler.

Bitki	Bulunduğu Aile	Çalışılan Kısım
<i>Origanum majorana L.</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Origanum rotundifolium Boiss.</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Prunella vulgaris L.</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	Lamiaceae	Yapraklar
<i>Salvia absconditiflora Greuter & Burdet</i>	Lamiaceae	Çeşitli parçalar
<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Yapraklar
<i>Salvia trichoclada Benth</i>	Lamiaceae	-
<i>Salvia viridis L. cvar. Blue Jeans</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Salvia hypoleuca</i>	Lamiaceae	Yapraklar
<i>Salvia virgata</i>	Lamiaceae	Yapraklar
<i>Sideritis albiflora</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Sideritis leptoclada</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Thymus praecox</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Thymus serpyllum</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Thymus sipyleus</i>	Lamiaceae	Tüm bitki
<i>Thymus vulgaris L.</i>	Lamiaceae	Yapraklar
<i>Ziziphora clinopodioides Lam.</i>	Lamiaceae	Çeşitli Parçalar
<i>Zostera marina</i>	Potamogetonaceae	Yapraklar

3.2. ROSMARİNİK ASİDİN FARMAKOLOJİK ETKİLERİ

Çeşitli bitkilerden elde edilen rosmarinik asit için birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmıştır. Biyolojik aktivenin çalışıldığı konuların başlıcaları anti-inflamasyon, anti-virüs, anti-tümör, anti-oksidaysondur. Rosmarinik asitin en çok çalışılan konularından biri anti-inflamatuvar etkisidir. Konvertaz enzimine etki ederek inhibisyonu azalttığı çalışmalarca gözlenmiştir. Anti tümör etkisi üzerine çalışan birçok bilim insanı yaptıkları *in vitro* veya hayvan deneyi çalışmalarında rosmarinik asit içeren bitki ekstresinin tümör doku gelişimini azalttığı not edilmiştir. Antioksidan özelliklerin çalışıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Son derece etkili radikal süpürme etkisine sahip olan rosmarinik asidin antioksidan özellik gösterdiği literatürde yoğun şekilde yer almaktadır. İnsanlarda etkili patojen virüsler üzerinde de savunma mekanizmalarında rol

aldığı üzerine çalışmalar mevcuttur. Anti diyabetik etkinin var olup olmadığına dair yapılan çalışmalarda rosmarinik asit amilaz inhibitör aktivitesi göstererek karbonhidrat parçalanmasını yavaşlatarak tip 2 diyabetüs mellitus üzerindeki etkisi kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada da rosmarinik asidin bilişsel performansı olumlu anlamda etkilediği, Alzheimer hastalığının gelişmesinin önlenmesine dair veriler kaydedilmiştir [55].

Anti-kanser etkinliğin araştırılmasında farklı kanser türlerine ait çalışmalar yapılmıştır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada rosmarinik asit tüketimi olan farelerin kolon karsinogenezinin önleniği gözlenmiştir. Rosmarinik asidin nöroprotektif etkisi de birçok bilim insanı tarafından çalışılmış ve hayvan deneyi modelleri incelendiğinde çıkan sonuç diyabetik sıçanların beyinlerinin birçok bölgelerinde lipid peroksidasyon seviyesinin önemli ölçüde düştüğü şeklindedir. Rosmarinik asitin metil esterleri deri pigmentinde depigmentasyon yaparak pigmentasyon kontrolünde etkili olduğu da çalışılmıştır [56].

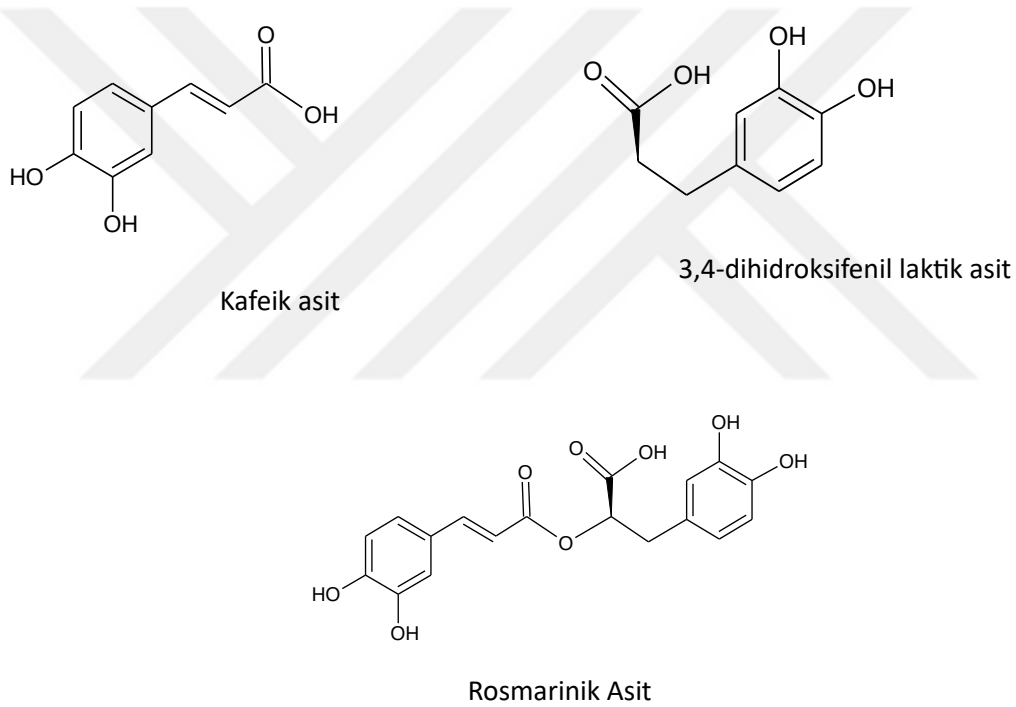
Yapılan klinik bir çalışmada atipik dermatit üzerine rosmarinik asit etkisi çalışılmıştır. Çalışmada 14 kadın 7 erkek deneye 8 hafta boyunca rosmarinik asit içerikli kremden kullanmışlardır. Bu çalışmada rosmarinik asitli kremin olumsuz bir reaksiyon meydana getirmediği ve insan derisi için herhangi bir sakınca bulunmadığı not edilmiştir. Atopik dermatit için de hafifletici bir ajan olduğu çalışmada kanıtlanmıştır [57].

Anti inflamatuvar özellik gösterdiği kanıtlanan rosmarinik asit klinik çalışmalara da konu olmuştur. Alerjik reaksiyon gösteren bir gruba 200 mg ve 500 mg rosmarinik asit takviyesi yapılmıştır. Bu takviye sonrası alerjik reaksiyonları olan deneklerin günlük semptomları kağıtlara işlenirken bir yandan da kan değerlerine bakılmaktadır. Plasebo verilen deneklerle rosmarinik asit uygulanan denekler arasında önemli farklar kaydedilmiştir. Örneğin rosmarinik asit uygulaması alan deneklerde burun akıntısında azalma, nötrofil ve eozinofil sayısında düşüş gözlenmiştir [56].

3.3. ROSMARİNİK ASİT KİMYASAL YAPISI

Rosmarinik asit, biberiye ve adaçayı özütlerinin uçucu olmayan fraksiyonunda önde gelen ikincil metabolitlerden biridir. Rosmarinik asit birçok bitki ailesinde bulunan hem biyolojik hem farmakolojik açıdan önemli bir fenolik asittir. Bu fenolik asitler bitkiler tarafından bulundukları yaşam alanlarında meydana gelen değişikliklere karşı çevreye

uyum açısından üretilen sekonder metabolit ailesinde yer almaktadır. Stres faktörleri incelendiğinde besin eksikliği, ışık eksikliği, su yetersizliği, nem ve sıcaklık gibi koşullar mevcuttur. Yapılan çalışmalar genel anlamda her eksikliğin farklı birer sekonder metabolitin oluşmasını daha da artırdığını kanıtlamıştır. Örneğin besin elementleri toprakta yetersiz olduğunda bitkinin toprak elementlerini bünyesine alması azalır. Bu yüzden bitki srese girerek oluşan karbonhidratı fazla alarak bünyesinde depo eder. Bu sayede bünyede bulunan karbonhidrat fazlası, azot içermeyen yani karboksilik asitler ve terpenler gibi karbon temeli olan sekonder metabolitlerin üretilmesini sağlamaktadır [58]. Bitki su stresine girdiğinde ise yine karbon depolama ihtiyacına girerek yoğunlukla karbon içeren sekonder metabolitlerin konsantrasyonu artmaktadır [59].



Şekil 3.1. Rosmarinik asit kimyasal yapısı.

3.4. ROSMARİNİK ASİT EKSTRAKSİYONU İÇİN LİTERATÜR TARAMASI

Doğal ürünlerden etken madde ekstraksiyonunda kullanılabilecek ekstraksiyon yöntemleri yukarıdaki bölümlerde anlatılmıştır. Genellikle fitokimyasal içeriği olan bitkilerin ekstraksiyonu yapılırken geleneksel yöntemler tercih edilmektedir. Temeli çözücünün bitki hücrelerine difüzyonu ve çözünebilen fitokimyasalları bitki matriksinden ayırıp fitokimyasalca zengin solvent elde etmeye dayanır. Bunlara sıvı bitki ekstresi denir [58]. Son zamanlarda çalışılan konularda yenilikçi teknikler de tercih edilmeye

başlanmıştır. Bunlar daha az çözücü ve daha az zamanda daha etkili sonuçları vaad etmektedir. Temel anlamda bu tekniklerde de amaç etken maddelerin etkin bir şekilde çözücüye geçmesidir. Daha sonrasında bu esetreler bir takım analizler uygulanarak ekstrenin etken madde içeriği belirlenir [60].

Literatür çalışmaları incelendiğinde rosmarinik asidin birçok bitkiden izolasyonunun yapıldığı gözlenmiştir. Blechnaceae, Cannceae, Celastraceae, Apiaceae, Chloranthaceae, Araceae, Boraginaceae, Asteraceae, Oleaceae, Rubiaceae, Araliaceae, Sterculiaceae, Convolvulaceae, Polypodiaceae, Cucurbitaceae, Liliaceae, Fagaceae, Scrophulariaceae familyalarına ait bazı bitkilerde rosmarinik asit ekstraksiyon çalışmaları mevcuttur. Fakat en fazla çalışılan ve en yüksek miktarda rosmarinik asit elde edilen familya Lamiaceae'dir. Bu familyaya ait çoğu bitkide rosmarinik asit ihtiva etmektedir [61].

Bitki toplanıp gölgede kurutulup öğütüldükten sonra ekstraksiyon işlemine geçilir bu ekstraksiyon işlemi ile bitkideki çözünebilen fitokimyasal metabolit ile çözünemeyen bitki materyali birbirlerinden ayrılmış olur. Böylelikle ekstraksiyon süreci başlamış olur.

Genel literatür çalışmalarına bakılırsa rosmarinik asit ekstraksiyonu için birçok bilim insanı denemelerde bulunmuştur. Örneğin bir çalışmada Baranauskaite ve arkadaşları 2016 yılında *Origanum vulgare* bitkisinden maserasyon ile rosmarinik asit ekstre etmişlerdir. Bu deneme 10ml: g (çözücü: katı) oranı ayarlanarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü % 90'lık etanol olurken ekstraksiyon süresi 24 saat olarak ayarlanmıştır. Sonrasında rosmarinik asit miktarı hesaplandığında 4,40 mg/g olarak bulunmuştur [56].

Oliveira ve arkadaşları *rosmarinus officinalis* bitkisinden rosmarinik asit eldesi üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada 1:5 katı materyal: çözücü oranı olacak şekilde % 70'lik etanol oda sıcaklığında 55 dakika boyunca maserasyon uygulanmıştır. Rosmarinik asit 39,2 mg/g olarak hesaplanmıştır [61] .

Baranauskaite ve arkadaşları oluşturdukları başka bir ekstraksiyon metodunda yine *Origanum vulgare* bitkisinden % 90'lık etanol çözeltisini 1:100 olacak şekilde ayarlayıp manyetik karıştırıcı yardımıyla 24 saat maserasyon işlemini gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak 7,23 mg/g Rosmarinik asit elde etmişlerdir. Çalışmanın devamında aynı bitkiye reflaks sistemi uygulamışlardır. 1:100 oranı ayarlanarak 95 °C sıcaklıkta 6 saat süren

ekstraksiyon süresi ile reflaks ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak %90 etanol kullanılmıştır. Sonuç olarak 9,38 mg/g rosmarinik asit elde edilmiştir [61].

Hernandez ve arkadaşları 2009 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada *Rosmarinus Officinalis*'ten 1:10 oranında ayarlayıp etanol çözeltisiyle manyetik karıştırıcı ile maserayona bırakmışlardır. Ekstraksiyon süresi 10 saat olacak şekilde ayarlamışlardır. Sonuç olarak 39,5 mg/g rosmarinik asit tayin etmişlerdir. Yine aynı ekip (*Origanum vulgare*) bitkisinden tüm şartlar aynı kalacak şekilde deney düzeneğini ayarlamışlardır. Fark olarak ekstraksiyonu hem kuru yapraklara hem de taze yapraklara uygulamışlardır. Elde ettikleri sonuçlar sırasıyla 45,10 mg/g ve 19,5 mg/g rosmarinik asittir [62].

Hernandez ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada *Rosmarinus officinalis*in ekstraksiyonunu reflaks sistem kurarak gerçekleştirmişlerdir. Çözücü olarak kloroform seçen ekip 1:4 oranında katı materyal: çözücü oranını ayarlamıştır. Kaynama sıcaklığında 2 saat süren bu ekstraksiyon 1,35 mg/g rosmarinik asit tayini ile gerçekleştirilmiştir. Aynı ekip o (*Origanum vulgar* bitkisinde de reflaks sistemini denemişlerdir. Bu denemede *Rosmarinus officinalis*'te denedikleri gibi kloroform ile kaynama sıcaklığında 2 saat boyunca bitki materyalinde denemeler yapmışlardır. Buradaki farklı bitki materyali 1:4 oranında taze yapraklar: çözücü olacak şekilde ve 1:17 oranında kuru yapraklar: çözücü olacak şekilde ayarlanmıştır. Çıkan sonuç sırasıyla 0,0518mg/g ve 1,17 mg/g'dır [62].

Lau ve arkadaşları *Orthosiphon stamineu* bitkisinden rosmarinik asit elde etmişlerdir. Bu ekstraksiyon çalışmasını yaparken katı materyal: çözücü oranını 1:9 olarak belirlemişlerdir. 3 saat devam eden ekstraksiyon reflaks düzeneğinde 53 °C de yapılmıştır. Çözücü olarak % 70'lik etanol kullanılmıştır. Sonuç olarak 41,15 mg/g rosmarinik asit elde edilmiştir [63].

Jacotet-Navarro ve arkadaşları da *Rosmarinus officinalis* bitkisinden rosmarinik asit eldesinde reflaks sistemi üzerine denemeler yapmışlardır. Çözücü olarak etanol tercih eden ekip çözücü oranını % 90; katı materyal: çözücü oranını ise 1: 20 olarak belirlemişlerdir. İki farklı süre ile ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu sürelerden biri 30 dakika biri 5 saattir. Bu sürelerin sonunda elde edilen rosmarinik asit miktarları sırasıyla 1,4 mg/g ve 2,1 mg/g'dır [64].

(*Cuminum cyminum* L.) Bitkisinden Bettaieb ve arkadaşları 1: 10 katı materyal: çözücü oranını ayarlayarak oda sıcaklığında 30 dakika boyunca öğütülmüş bitki materyalini

manyetik karıştırıcı yardımıyla maserasyona bırakmıştır. Çözücü olarak ise % 80'lik aseton kullanılmıştır. Burada bitki materyali üç farklı şekilde kullanılmıştır. Normal tohumlara, yarım olgunlaşmış ve tam olgunlaşmış bitki tohumlarına uygulanmıştır. Sırasıyla 169 mg/g; 132,4 mg/g; 99,9 mg/g olacak şekilde rosmarinik asit elde edilmiştir. Aynı ekip aynı bitkiye sokslet ekstraksiyon metodu da denemiştir. 1:10 oranında katı materyal: çözücü oranı belirlenmiş ve 6 saat ekstraksiyon süresi 85 °C de gerçekleşmiştir. Çözücü olarak % 80 aseton ayarlanmıştır. Sonuç olarak 150,2 mg/g rosmarinik asit miktarı saptanmıştır [65].

Liu ve arkadaşları hidrodistilasyon düzeneği kurarak *Rosmarinus officinalis* bitkisinden 1:10 oranı ayarlanarak farklı çözücü denemeleriyle ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. Denenen çözücüler su, % 85'lik etanoldür. Su ve etanol uygulaması 4 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak sırasıyla 2,18 mg/g ve 3,86 mg/g elde edilmiştir. [66].

Che Mansor ve arkadaşları *Orthosiphon stamineus* bitkisini kullanarak rosmarinik asit elde etmişlerdir. Bu ekstraksiyon için sokslet ekstraksiyonunu tercih etmişlerdir. 5 g bitki % 50'lik etanol kullanarak kaynama sıcaklığında 6 saat ekstraksiyon süresi devam edecek şekilde gerçekleştirmişlerdir. Rosmarinik asit miktarını 262,1 mg/g olarak kaydetmişlerdir [67].

Chatterjee ve arkadaşları *Rosmarinus officinalis*ten rosmarinik asit eldesi için ultrasonik destekli ekstraksiyonu kullanmışlardır. Kurdukları deney metotlarında belirledikleri çalışma saati 1 saattir. 1: 20 oranında katı: çözücü oranı belirlenmiş olup reaksiyon sıcaklığında 80 °C de tutmuşlardır. Çözücü sistemi olarak iki sistem belirlemişlerdir. % 70'lik metanol ve % 70 lik etanolle uygulanan ekstraksiyon işleminden elde edilen sonuçlar sırasıyla 0,048 mg/g ve 0,032 mg/g'dır. Chatterjee ve arkadaşları *Rosmarinus officinalis* bitkisinden mikrodalga destekli ekstraksiyon ile rosmarinik asit elde etmişlerdir. 1:20 katı: çözücü oranı ayarlanarak 900 W'a ayarlanmış mikrodalga ile 3 dakika deneme yapmışlardır. İki farklı çözücü sistemi denemiştir. Biri % 70 etanol diğeri % 70 metanoldür. Elde edilen sonuçlar ultrasonik destekli ekstraksiyona benzer olduğunu not etmişlerdir [68].

Baranauskaite ve arkadaşları *Origanum vulgare*'den rosmarinik asit eldesinde bir de ultrasonik banyo destekli ekstraksiyon sistemini denemiştir. Bu denemede % 60'lik etanol ile ultrasonikasyon işlemi 10 dakika uygulanmıştır. Katı: Çözücü 1:250 olacak

şekilde ayarlanmıştır ve sonuç tayin edildiğinde 6,43 mg/g rosmarinik asit tespit edilmiştir [69].

Peev ve arkadaşları melisa officinalis bitkisine 110 dakika boyunca süperkritik akışkan uygulamasıyla %80'lik etanol yardımıyla ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve rosmarinik asit miktarı 280 mg/g olarak kaydedilmiştir [70].

3.5. *Salvia officinalis* TÜRÜNDEN ROSMARİNİK ASİT EKSTRAKSİYONU LİTERATÜR TARAMASI

Yapılan bir çalışmada farklı Labiatae familyasına ait türlerin rosmarinik asit ekstraksiyonu sonrası elde edilen rosmarinik asit miktarları karşılaştırılmıştır. Kıyaslanan türler arasında 6 adet salvia türü, bir adet melisa türü, bir adet origanum, bir adet lavandula türü, bir adet rosmarinus türü, dört adet thymus türü, altı adet mentha türü ve farklı birkaç tür daha etklenerek rosmarinik asit kıyaslaması yapılmıştır. Bu çalışmada 2008 yılı yazında İran bölgesinde toplanmıştır. Toplanan bitkiler kurutularak toz haline getirilmiştir. Örnekler 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda 200 mg olacak şekilde tartılmıştır. Çözücü sistemi olarak su: metanol: 2-propanol (80:10:10) kullanılmıştır. 30 dakika boyunca ultrasonik banyo uygulaması yapılmış ve 4500 rpm/dk olacak şekilde ayarlanarak santrifüj edilmiştir. Supernatant alınmış ve kalan kalıntı 2 kez daha aynı işlemlerden geçirilerek supernatantlar birleştirilmiştir. Elde edilen çözelti HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizinde gradient program kullanılmıştır. Program su: metanol:2-propanol (o-fosforik asit 0,085%) olacak şekilde başlangıç yüzdeleri 80:10:10 olarak başlatılıp 60:20:20 olacak şekilde 20 dakikalık program yazılmıştır. Hem numuneler hem de rosmarinik asit farklı derişimlerdeki standartları 20 µl olacak şekilde ayarlanıp enjekte edilmiştir. Diode array dedektör ile 200-900 nm arası UV spektrum taraması yapılmıştır. 330 nm'deki kromatogram incelenmiştir. Kolon olarak da C18 250 × 4,6 mm kolon kullanılmıştır. Akış hızı 1,0ml /dk ve kolon sıcaklığı 30 °C olacak şekilde ayarlanıp analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar incelenmiş ve en yüksek miktarda rosmarinik asit içeren bitkiler belirlenmiştir. *Melisa officinalis* 35,5 mg/g, *Salvia officinalis* 39,3 mg/g, *Mentha spicata* 58,5 mg/g, *Thymus citriodorus* 31,5 mg/g, *Thymus vulgaris* 23,5 mg/g olacak şekilde 29 farklı bitkiden en yüksek miktarlar bu şekildedir. Bu çalışmada görüldüğü gibi *Salvia officinalis* rosmarinik asit üretiminde ilk sıralarda gelmektedir [61].

Yapılan başka bir çalışmada süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu kullanılmıştır. Kurutulmuş adaçayı yapraklarını kurutarak öğütmüşlerdir. Ekstraksiyon koşullarını belirlerken 80 °C sıcaklık ayarlamışlardır. 13,6 g CO₂/ dk akış oranı ile süperkritik akışkan geçirilmiştir. Elde edilen ekstreleri 3 ml dimetil sülfoksit: metanol çözücü sistemi ile viallemişlerdir. Bu vialler 50 °C’de ultrasonik banyoda 15 dakika tutulmuşlardır ve 24 saat oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Sonrasında 0,45 mikronluk filtreden geçirilmişlerdir. HPLC Analizine hazır hale getirilmiştir. HPLC analizlerini ODS-3 C-18 kolonla gerçekleştirmişlerdir. Dalgaboyu olarak 280 nm’de çalışmışlardır. Sonuç olarak elde edilen adaçayı ekstraktı 28,4 mg/g olarak bulmuşlardır [71].

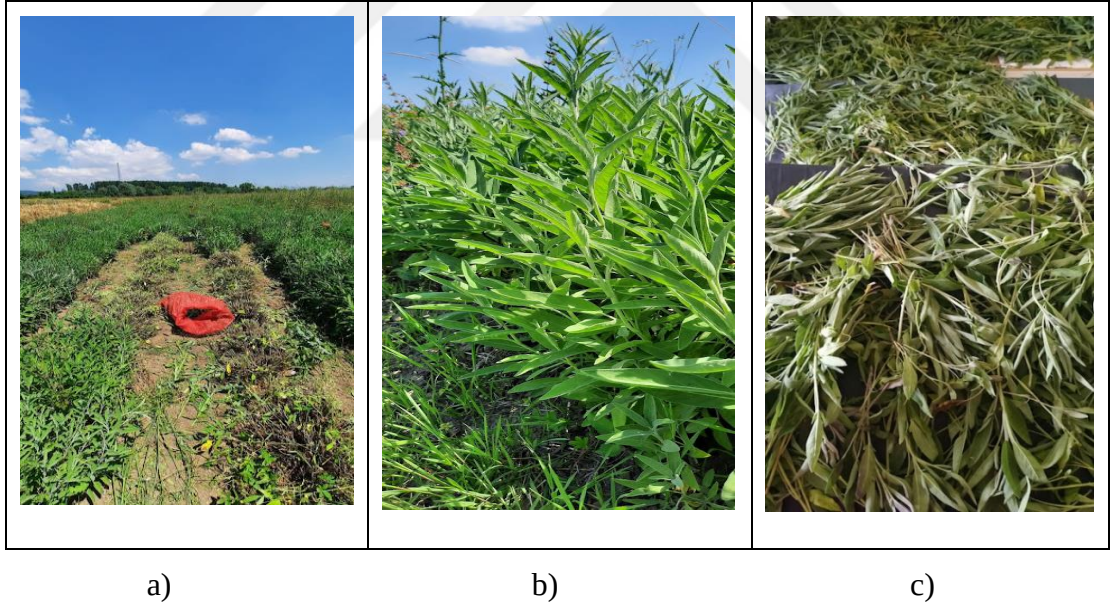
*Salvia officinalis*ten elde edilen etken maddelerin araştırılması hakkında çalışan bir grup rosmarinik asit eldesi için karşılaştırmalı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Öncelikle *Salvia officinalis* yapraklarını öğütmüşlerdir. Ve % 70 etanol, % 100 etanol ve % 100 metanol kullanmışlardır. Katı: çözücü oranı 1:6 olarak ayarlamışlardır. Ekstraksiyon süresi olarak 3, 6, 8 ve 10 saat denemelerde 45 °C ye ayarlanmış su banyosunda ekstraksiyon gerçekleştirmişlerdir. Bunlara ek % 100 etanolde sokslet ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada rosmarinik asit miktarı ölçümü için HPLC’de C18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril:su (% 1 formik asit) kullanmışlardır. Okumalarını 280 nm’de gerçekleştirmişlerdir. Ekstraksiyon verimi sırasıyla metanol, % 70 etanol ve % 100 etanol olarak bulunmuştur. Sokslet ekstraksiyonundaki kıyaslamaya baktıklarında 4, 8 ve 10 saatlerinde 2 saatlik ekstraksiyona göre daha verimli sonuç elde ettiklerini ve 4, 8 ve 10 saat arasında anlamlı bir ekstrakt farkı olmadığını ortaya koymuşlardır. Elde edilen rosmarinik asit miktarlarını kıyasladıklarında ise en verimli sonucun % 70 etanolde olduğunu belirtmişlerdir [72].

Karina ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada aldıkları adaçayı yapraklarını (10 g) hidroalkolik ekstre oluşturacak şekilde 80 °C’de 300 ml suda ekstraksiyonu başlatmışlardır. Soğuduktan sonra pH: 2-2,5 arası olacak şekilde ayarlanarak 25 % HCl ile ayarlamışlardır. Süpernatant kısmı almışlardır. 5 kez tekrarlanmış ve çözücüler toplanmıştır, evapore edilmiştir. Silika jel kullanılarak kolon kromatografisi uygulanmıştır. Elüent olarak etil asetat: hekzan: asetik asit (30:60:10) uygulanmıştır ve fraksiyonlar toplanmıştır. Rosmarinik asit içeren fraksiyonları evapore edip tayinini yapmışlardır. Elde ettikleri ürünü spektroskopik bazı yöntemlerle tayin etmişlerdir ve HPLC ile kromatografik analizi yapmışlardır. Elde ettikleri rosmarinik asit miktarını 45 mg/g olarak hesaplamışlardır. [73].

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. ADAÇAYI BİTKİSİNİN HASAT EDİLMESİ

Adaçayı bitkisi Düzce'nin Gölyaka ilçesinden hasat edildi. Hasat edilme zamanı literatürde yer alan bilgilere göre yapıldı. Literatürde bildirilen etken maddece en zengin olduğu ayların mayıs-haziran ve ekim-kasım ayları olduğu tespit edildi. Bu tez kapsamında kullandığımız bitkilerin hasadı haziran ayında yapılmıştır. Hasat edilen bitki gölgede kurumaya bırakıldı. Doğal ortamda gölgede kuruyan bitkinin dal ve yaprakları birbirinden ayrılarak yapraklar öğütölme işlemine tabi tutuldu. Elde edilen öğütölmüş yapraklar cam kavonozlara alınarak buzdolabında deneysel aşamaya geçene kadar muhafaza edildi. Şekil 4.1'de ve Şekil 4.2'te adaçayı bitksinin hasadı, gölgede kurutulması ve öğütöldükten sonra elde edilen toz halleri gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *Salvia officinalis* bitkisi a) Bitkinin hasadı b) Bitkinin görüntüsü c) Gölgede kurutulması için muhafaza edilmesi.



a)

b)

Şekil 4.2. *Salvia officinalis* bitkisinin a) gölgede kurutulması b) öğütülmesi.

4.2. UÇUCU YAĞ DÜZENEĞİNİN KURULMASI

Deney süreçlerimizi planlarken asıl amacımız adaçayı uçucu yağ eldesi sonrası kalan posadan katma değeri yüksek olabilecek henüz değeri yeni yeni anlaşılmaya başlanan rosmarinik asit etken maddesinin yüksek saflıkta elde edilmesiydi. Bunun için öncelikle uçucu yağ elde etme yöntemlerinden biri olan klevenger düzeneğini kurarak uçucu yağ elde etme sistemi oluşturuldu. Bu yöntemde 1:10 (adaçayı: su) oranı sağlanarak yaklaşık 8 saat süreyle klevenger düzeneğinde adaçayı yağ ve adaçayı hidrolatı elde edildi. Elde edilen bu hidrolatta ve uçucu yağda GC-MS analizleri gerçekleştirildi. Kalan posaya farklı ekstraksiyon metotları denendi ve kalan sulu kısmın da rosmarinik asit içerip içermediğine bakıldı. Buradaki amacımız atık olarak kalan posada rosmarinik asit miktarının tayin edilmesiydi.

Bu denemede kullanılan cihaz olan GC-MS Agilent 7890A GC Sistem Agilent 5975C inert MSD gaz kromatografisi kütle spektroskopisi cihazıdır. GC kolonu olarak Agilent HP5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kolonu kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak yüksek saflıkta helyum kullanılmıştır ve GC kolonu fırın sıcaklık programı toplam süresi 31.875 dk olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon portu sıcaklığı 200 °C olarak ayarlanmış ve splitless model inlet kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 1.0 µL olarak belirlenmiştir. Kütüphane olarak Wiley ve NIST kullanılmıştır.

Bu deneme için kullanılan çözücüler ise şu şekildedir:

- Klevenger düzeneğinde kullanılan çözücü deiyonize su
- GC MS analizleri için: Hekzan (GC- Grade) Merck

4.3. FARKLI EKSTRAKSİYON METOTLARININ DENENMESİ VE HPLC

Asıl amacımız posanın değerlendirilmesidir. Bunun avantajlı olup olmadığının kanıtlanması için direk öğütülmüş adaçayı yapraklarına uygulanan farklı ekstraksiyon metotlarında çıkan sonuçların değerlendirilmesi sağlandı. Ekstraksiyon işlemine geçilmeden önce adaçayı yapraklarına hekzan ile ön yıkama muamelesi uygulandı. Bu yöntemde bitki materyali aynı şekilde öğütülmüş adaçayı yapraklarıdır. Denemesi yapılan ekstraksiyon metotları Şekil 4.3'teki gibidir:

- Ultrasonik destekli ekstraksiyon
- Manyetik karıştırıcı yardımıyla maserasyon
- Reflaks sistemiyle ekstraksiyon

Bu metotlar uygulandı. Sonrasında gözlenen çözücüye renk geçmesi sebebiyle tüm bu ekstraksiyonlar tekrar denenerek aktif karbon uygulaması yapıldı.

Tüm bu ekstraksiyonlar için literatür de desteklenecek şekilde aseton, etanol ve su çözücülerini ekstraksiyon çözücüsü olarak seçildi.

Ultrasonik destekli ekstraksiyon metodunda ekstraksiyon süresi 45 °C ve 45 dakika olacak şekilde belirlendi.

Manyetik karıştırıcı yardımıyla maserasyon süreleri 2, 16 ve 24 saat olacak şekilde belirlendi ve uygulandı.

Reflaks sisteminde ise su ile kaynama sıcaklığında 4 saat ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Reflaks sisteminden alınan süzüntüye ek olarak H₂SO₄ ile pH: 2 'ye getirildi. Çamurumsu sayılabilecek çökelti süzülerek uzaklaştırıldı. Bu sulu çözeltiye sıvı: sıvı ekstraksiyon uygulanarak ardışık saflaştırma denendi. Sulu süzüntü 1:1 oranı sağlanarak etil asetatla muamele edildi. Şekil 4.3'te yapılan ekstraksiyon çalışmalarına ait düzenekler verilmiştir.



a)

b)

c)

d)

Şekil 4.3. Ekstraksiyon işlemleri a) Klasik ekstraksiyon b) Ultrasonik destekli c) Klevenger düzeneği d) Reflaks sistemi.

Çizelge 4.1’te yapılan ekstraksiyon denemeleri, kullanılan çözücüler, çözücü oranları, deney sıcaklıkları, deney süreleri detaylı bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı ekstraksiyon denemeleri.

Numune Kodu	Çözücü	Oran	Ön Yıkama	Ekstraksiyon Yöntemi	Deney Sıcaklığı	Deney Süresi
1	Aseton	1:20	-	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon	oda sıcaklığı	16 saat
2	Aseton	1:20	-	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon	oda sıcaklığı	24 saat
3	Aseton	1:20	-	Ultrasonikasyon	40 °C	45 dakika
4	Aseton	1:20	-	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon	oda sıcaklığı	2 saat
5	Aseton	1:20	30 dakika	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon	oda sıcaklığı	2 saat

Çizelge.4.1 (devam) Farklı ekstraksiyon denemeleri.

Numune Kodu	Çözücü	Oran	Ön Yıkama	Ekstraksiyon Yöntemi	Deney Sıcaklığı	Deney Süresi
6-7	Su	1:10	-	klevenger aparatı ile uçucu yağ elde sırasında balonda kalan sıvı	Kaynama sıcaklığı	8 saat
10	Etanol	1:20	30 dakika	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon	oda sıcaklığı	2 saat
11	Etanol	1:20	-	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon		24 saat
12	Etanol	1:20	-	Ultrasonikasyon	40 °C	45 dakika
13	Etanol	1:20	-	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon	oda sıcaklığı	16 saat
14	Etanol	1:20	-	Manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyon	oda sıcaklığı	2 saat

Tüm bunlar yapıldıktan sonra her ekstraksiyon denemesinden elde edilen süzüntüler evapore edildi ve metanoller viallenerek HPLC okuması yapıldı.

Burada yapılan HPLC analizleri Shimadzu marka enstrümantel cihazda gerçekleştirildi. HPLC analiz metodu literatür kaynak alınarak şu şekilde belirlendi.

- Mobil faz: Asetonitril: Su (1% formik asit)
- Sabit faz: C 18 Kolon
- Akış hızı: 0,9 ml/ dk
- Kolon sıcaklığı: 30 C
- Analiz süresi: 33 dk

HPLC’de geliştirilen metot Çizelge 4.2’te gösterildiği gibi A: Asetonitril B: Su olacak şekilde geliştirmiştir.

Çizelge 4.2. Rosmarinik asit tayininde geliştirilen metot.

Süre	Oran	
3.00	A:B	15:85
13.00	A:B	25:75
25.00	A:B	30:70
28.00	A:B	5:95
33.00	Metot Sonu	

4.4. FLAŞ KROMATOĞRAFİSİ UYGULAMASI

En çok verimin elde edildiği ekstraksiyon metodu seçildi. Ardışık çalışma yapılarak ekstre zenginleştirilerek çoğaltıldı. Elde edilen ekstrelelere flaş kromatografi uygulaması yapıldı. Flaş kromatografi safhasına geçilerek daha saf ayrılma elde edebilmek için optimizasyon çalışmalarına başlandı. Flash kromatografisinde (Marka: Buchii) yürütücü faz olarak etil asetat: hekzan metanol:su asetonitril:su mobil fazları denendi. Farklı gradient metotlar denendi. 254-400 nm arasında tarama yapıldı. FP ECOFLEX C18 kolon kullanıldı. Birçok deneme yapıldıktan sonra en uygun metodun metanol: su mobil fazı kullanılarak yapılan deneme olduğuna karar verildi.

Flaş kromatografi cihazından toplanan fraksiyonlara HPLC analizi yapıldı elde edilen madde miktarı ve deriştirme işlemi hesaplandı. Bu fraksiyonlar LC-MS’e gönderilerek yapı tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre toplanan fraksiyonda rosmarinik asitte görülen kütle spektrumu gözlendi.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Mayıs-Haziran ayı arasında hasatı yapılan adaçayı bitkisi gölgede kurutulduktan sonra öğütülerek ekstraksiyon işlemlerine başlandı. Farklı ekstraksiyon yöntemleri denendi. Çözücünden ayrılan katı materyal sonrası kalan çözücü evapore edilerek yoğunlaştırıldı ve katı ekstre elde edildi. Yapılan farklı ekstraksiyon çalışmaları sonrasında elde edilen ekstraksiyon verimlerinin farklı olduğu gözlemlendi. Bazı ekstraksiyon süreçlerinde ekstraksiyona başlamadan önce hekzan, diklorometan ve soğuk su ile yıkamalar yapıldı. Ayrı ayrı ekstraksiyonlarda uygulanan bu yıkama işlemlerinde bir takım boyar maddelerin giderimi sağlanmış oldu. Hedeflenen ilk amaç adaçayı yapraklarından rosmarinik asidin yüksek miktarlarda alınabilmesi için en uygun çözücünün belirlenmesi bununla birlikte en uygun ekstraksiyon yönteminin belirlenmesidir. Buradaki handikap rosmarinik asidin yüksek miktarda eldesinin yanı sıra saf bir şekilde alınmasıdır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla yapılan ekstraksiyonlarda yüksek miktarda elde edilebilirken rosmarinik asit saf bir şekilde elde edilememektedir. Ultrasonik banyo yardımıyla yapılan ekstraksiyonlarda ise rosmarinik asit çevresi temiz olarak alınabilmektedir. Fakat bizim diğer bir amacımız rosmarinik asidin elde edilmesini uçucu yağ eldesinden sonra kalan posada uygulanmasının düşünülmesidir. Distilasyon yöntemiyle ya da halk arasındaki tabirle imbibik sistemler kullanılarak elde edilen uçucu yağ sonrası kalan sulu kısımdaki rosmarinik asit miktarı da değerlendirmelerimizin arasındadır.

5.1. ADAÇAYI YAĞININ GC MS ANALİZİ

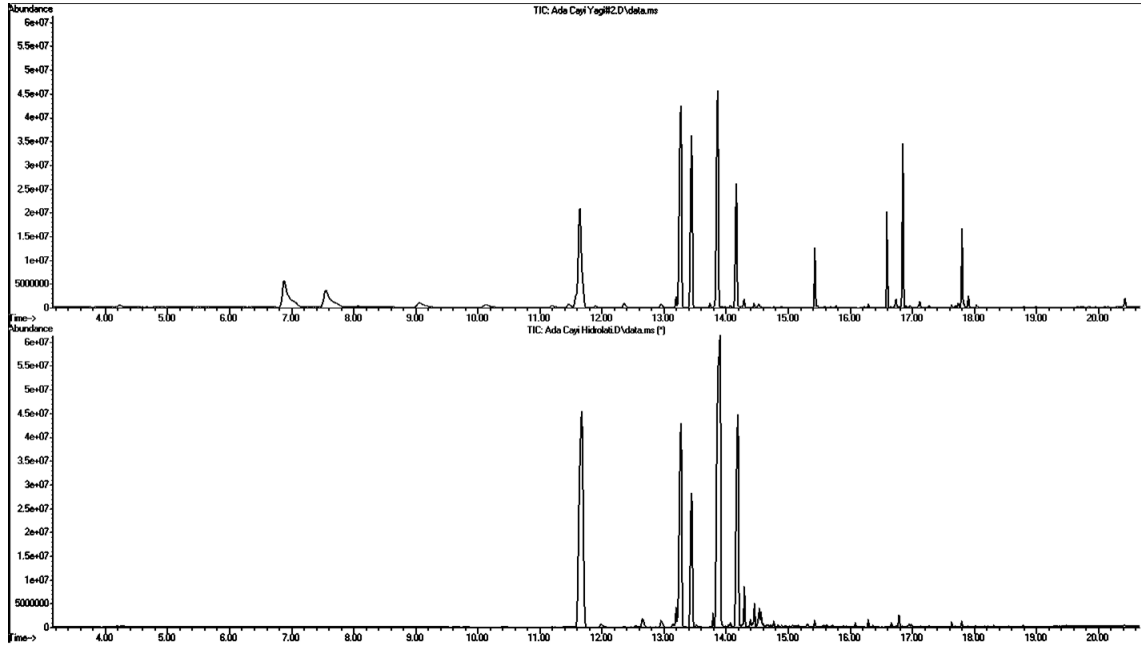
GC MS Analizi için uçucu yağ hekzan ile seyreltilerek direk cihaza verilirken hidrolat kısmı 1:1 oranda hidrolat: hekzan olacak şekilde sıvı sıvı ekstraksiyon yapıldı. Hidrolata taşınma yoluyla geçen yağlar hekzan fazına çekilmiş oldu.

Elde edilen sonuçlara göre; Adaçayı yağında %6 alfa pinen, %2 beta pinen, %4 kamfen, %15 kamfur, % 30 tujon %7 borneol, %10 karofilen, %3 viridflorol, %8 1-8 cineol

Adaçayı hidrolatında ise %24 1-8 sineol, %20 tujon, %31 kamfur, %14 borneol, %1 terpineol uçucu bileşenleri tayin edildi. Yüzde dağılım olarak sonuç hesaplandığından

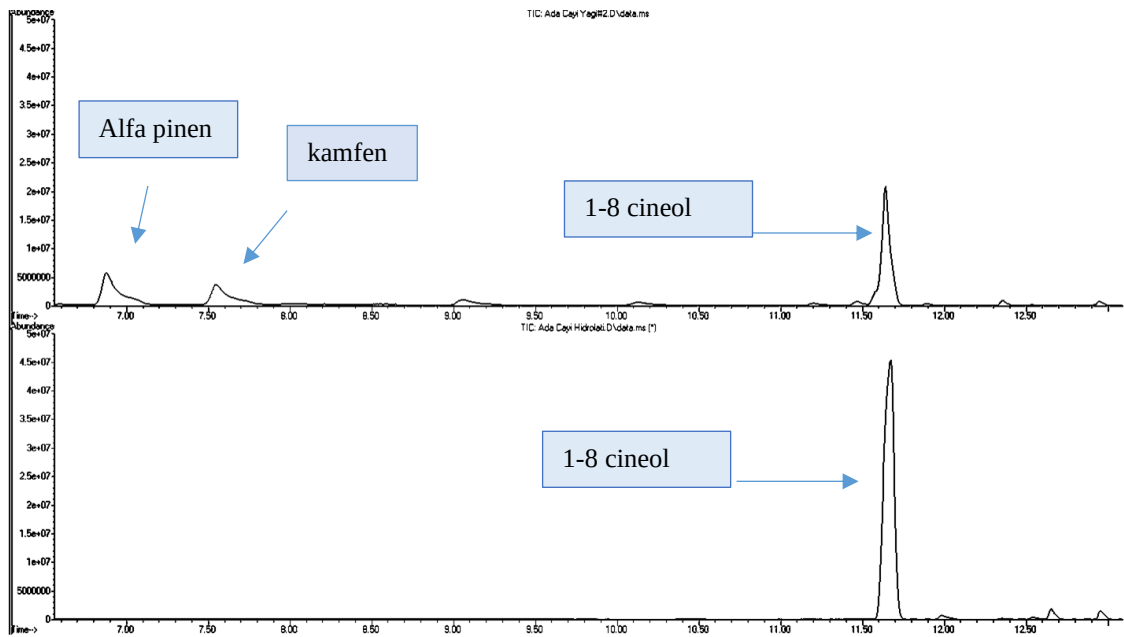
adaçayı yağında daha fazla uçucu yağ tespit edildiğinden yüzde olarak adaçayı hidrolatına göre daha düşük görünmektedir. Fakat bu durum içerisindeki miktarsal dağılım olarak algılanmamalıdır.

Şekil 5.1’de adaçayı yağı ve hidrolatına ait GC-MS kromatogramları gösterilmiştir.

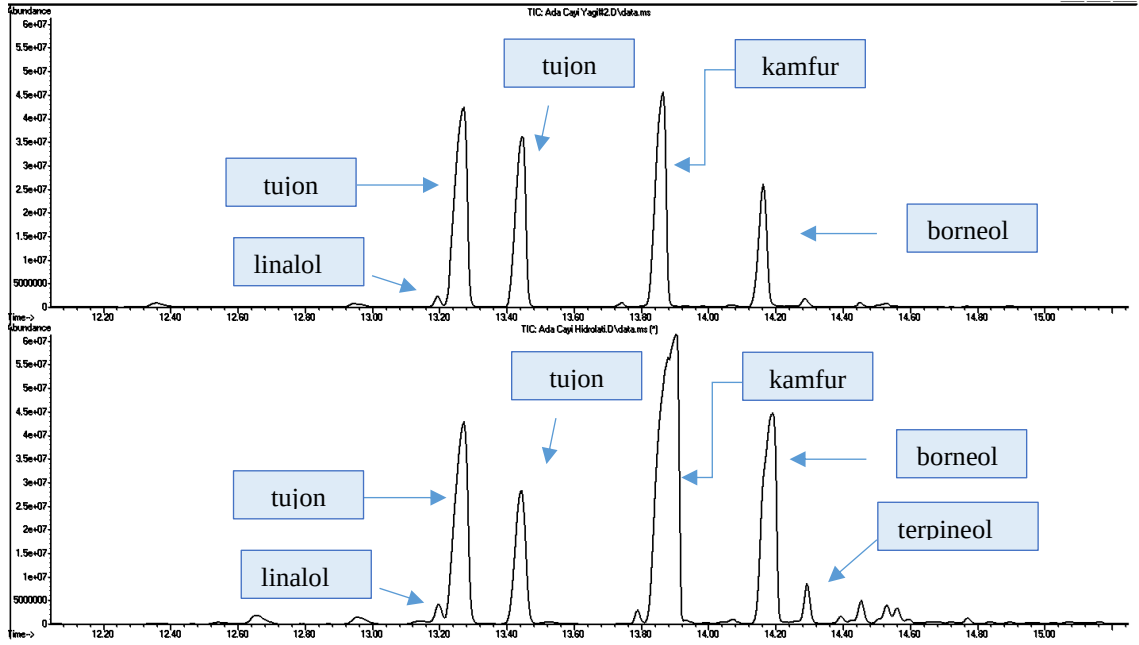


Şekil 5.1. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrolatı GC MS karşılaştırmalı kromatogramı.

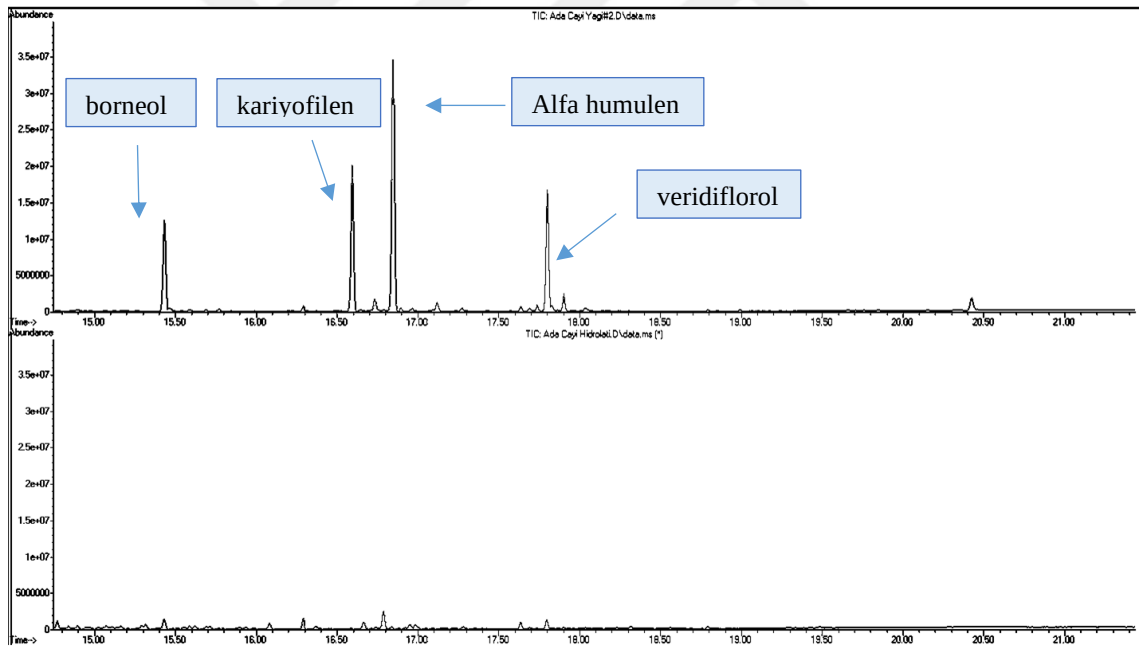
Şekil 5.2’de GC-MS kromatogramının 7 ve 12. Dakikaları arası belirlenerek gösterilmiştir.



Şekil 5.2. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrolatı GC MS karşılaştırmalı kromatogramı 7-12. dk arası.



Şekil 5.3. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrolatı GC MS karşılaştırmalı kromatogramı 12-15. dk arası..

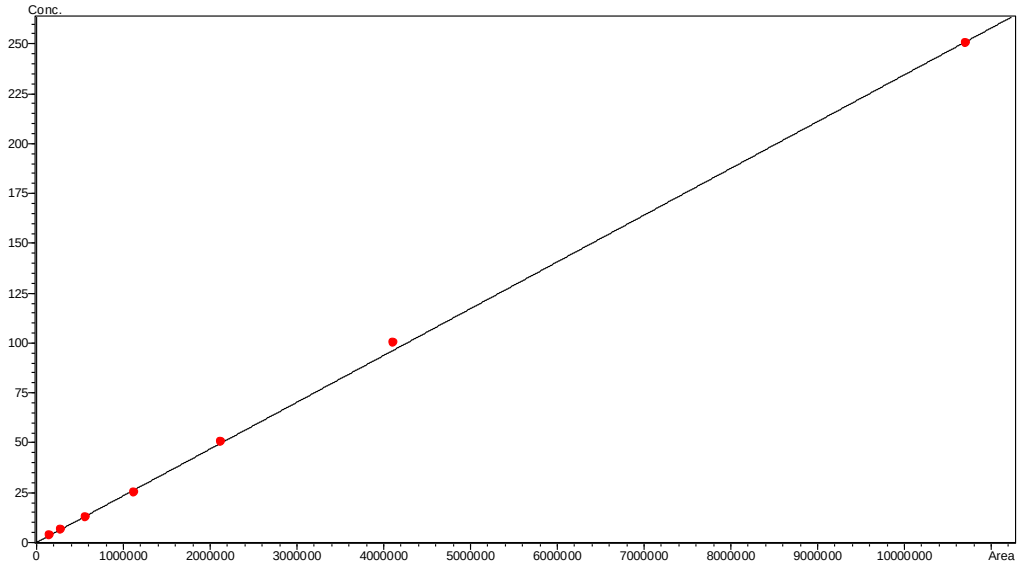


Şekil 5.4. Adaçayı yağı ve adaçayı hidrolatı GC MS karşılaştırmalı kromatogramı 15-21. dk arası.

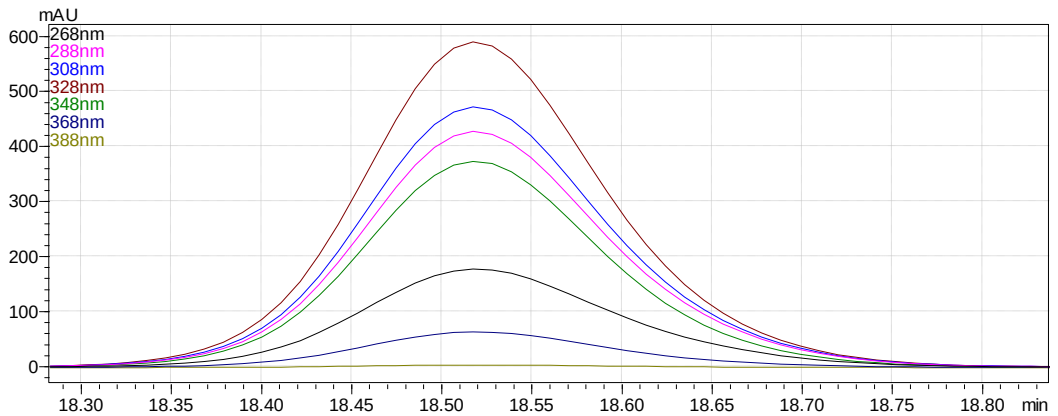
Adaçayı uçucu yağlarında farmakolojik etki gösteren bileşenlerinin özellikle tujon, kafur ve 1,8-sineol olduğu Bölüm 2.2’de anlatılmıştı. Düzce yöresinden hasat edilen bitkinin bazı ülkelerde yapılan çalışmalarının sonuçları incelendiğinde kalite olarak diğer literatürdeki bitkilerden farkının olmadığı görülmüştür.

5.2. ROSMARİNİK ASİDİN KALİBRASYON GRAFİĞİ

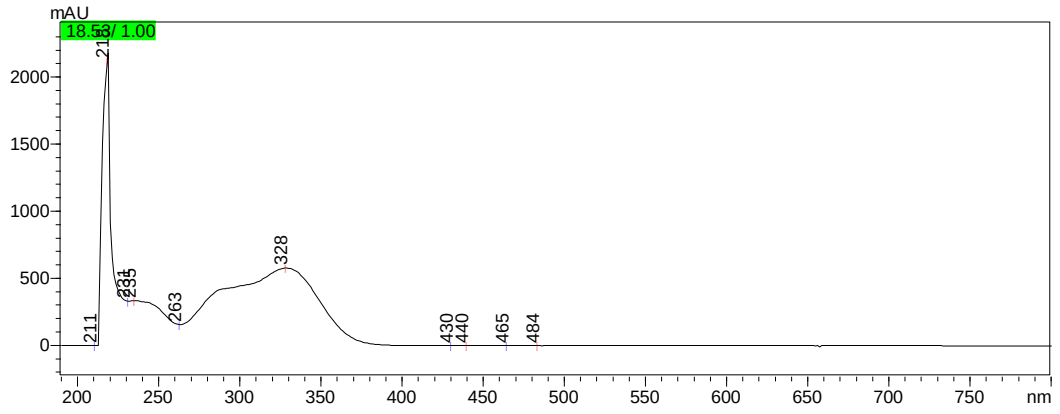
Ekstrelerdeki rosmarinik asitin nitel ve nicel analizlerinin gerçekleştirilmesi açısından Dr Ehrenstorfer - LGC Standards marka % 97 saflıkta ticari olarak alınan Rosmarinik asit standardı kullanıldı ve geliştirilen metod ile uygun şartlar ayarlanarak HPLC cihazıyla okutuldu. Rosmarinik asit standardından 1000 ppm ana stok çözelti hazırlanarak seri seyreltme ile 250; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 ppm rosmarinik asit HPLC Grade metanolde çözdürülerek hazırlandı. Şekil 5.5’da kalibrasyon grafiği konsantrasyon-alan olarak çizimi gösterildi. Bu konsantrasyonlar ile kalibrasyon grafiği çizildi. Şekil 5.6’da rosmarinik aside ait Foto Diot Dizi dedektör ile (PDA) dalga boyu taraması gösterilmiştir.Şekil 5.7’de ise 200-800 nm arası yapılan taramaya ait veriler gösterilmiştir.



Şekil 5.5. $R^2 = 0.9996334$ olarak hesaplanan rosmarinik asit kalibrasyon doğrusu.



Şekil 5.6. PDA dedektörde taranan dalgaboyları.



Şekil 5.7. PDA dedektörde taranan dalga boyları.

5.3. FARKLI EKSTRAKSİYON DENEMELERİ VE HPLC ANALİZLERİ

İlk ekstraksiyon denemelerinde çözücü olarak aseton ve etanol kıyaslanmıştır. Bunların yanı sıra klevenger düzeneği kurularak atık olarak kalan suyun içerisinde rosmarinik asit ihtivasi olup olmadığına bakıldı.

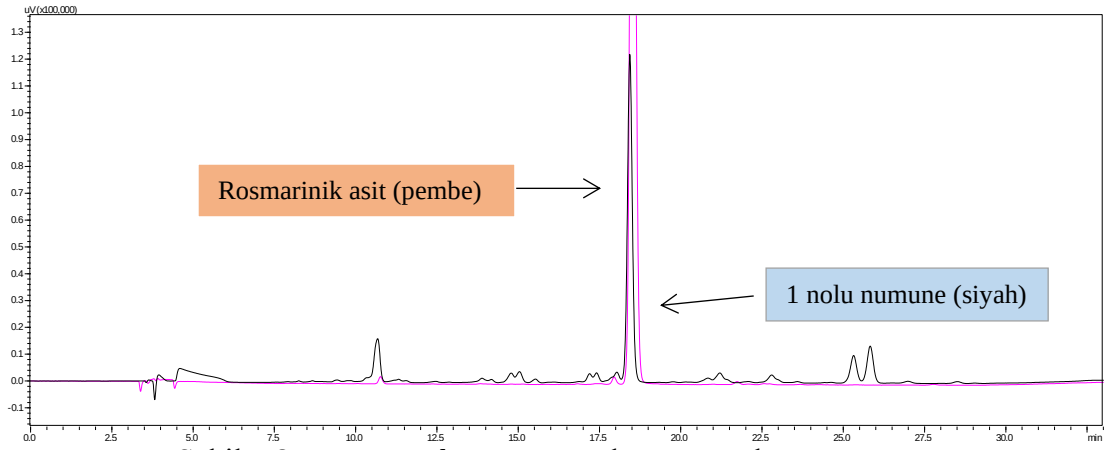
Etanol Aseton kıyaslamasında etanolün çok daha etkin şekilde RA'yı izole edebildiği saptandı.

Farklı ekstraksiyon yöntemleri denendi fakat en başarılı sonuç ultrasonik ekstraksiyonda gözlemlendi. Ultrasonik ekstraksiyon diğer yöntemlere göre çok daha kısa sürede tamamlanması açısından avantajlı bir durum da sağlamaktadır.

Elde edilen sonuçlar aşağıda detaylı şekilde verilmiştir.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki maddelere göre 328 nm'de 39,1865 % olarak ölçülmüştür.

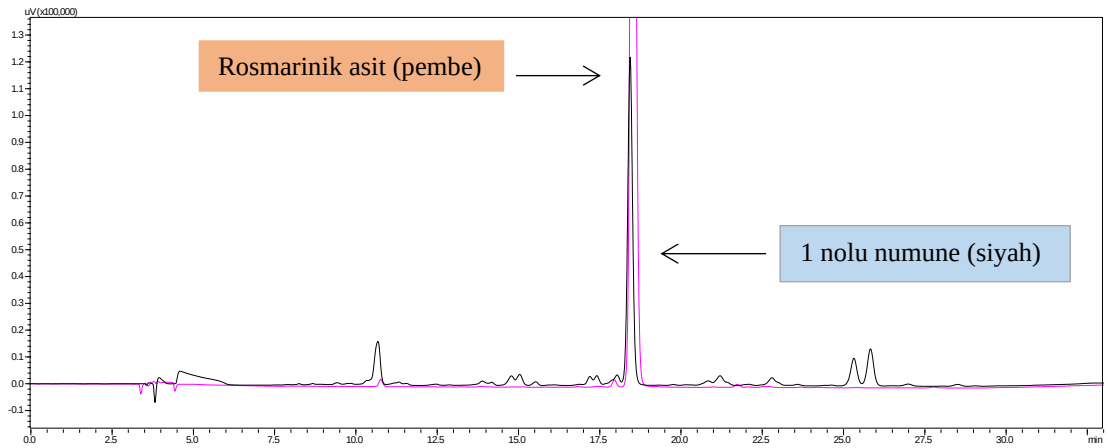
Şekil 5.8'de kromatogramı gösterilen 1 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı ekstraksiyon işlemi oda sıcaklığında 16 saat boyunca gerçekleştirildikten sonra süzüntü alınarak evaporare edilmiştir. Kalıntı filtreden geçirilerek aseton ile viallenip HPLC analizi yapılmıştır. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 22,201 ppm dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,459 g'dır. Ekstraksiyon verimi 4,59 % dir. Rosmarinik asit ihtivasi ise 44,402 mg/g örnektir.



Şekil 5.8. Rosmarinik asit ve 1 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki maddelere göre 328 nm’de 36,4424 % olarak ölçülmüştür.

2 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı manyetik karıştırıcı yardımıyla aseton çözücüsü kullanılarak 24 saat boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.9’da numuneye ait HPLC kromatogramı verilmiştir. Elde edilen süzüntü kalıntıdan ayrılarak dönerli buharlaştırıcıda evapore edilmiştir. Kalıntı HPLC Grade Aseton ile viallenerek kalitatif ve kantitatif analizi yapılmıştır. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 31,572 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,617 g’dır. Ekstraksiyon verimi 6,17% dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 63,144 mg/g’dır.



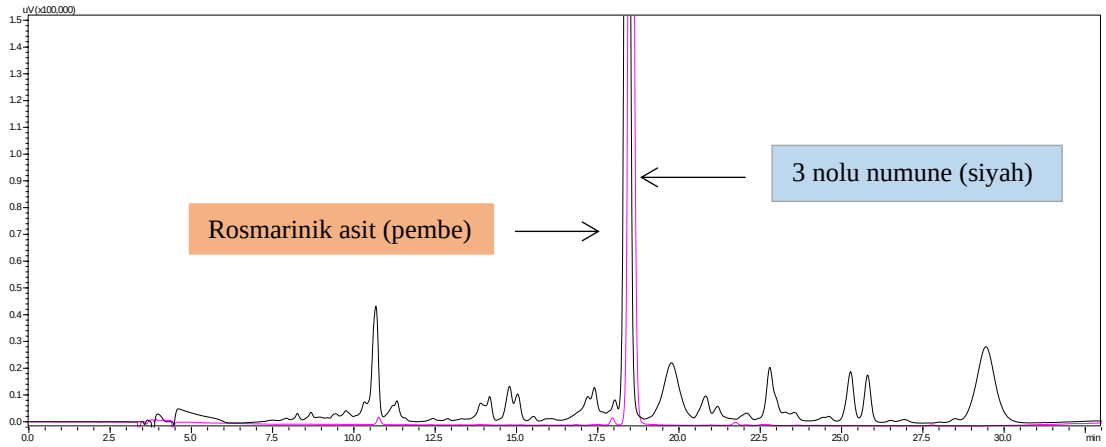
Şekil 5.9. Rosmarinik asit ve 2 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki maddelere göre 328 nm’de 44,6535% olarak ölçülmüştür.

3 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayına 1:20 oranında

aseton ayarlanarak ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlem 45 dakika boyunca 40 C sıcaklığında devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda erlendeki süzöntü süzme yardımıyla alınarak evapore edilmiştir. Kalan kalıntı HPLC Grade aseton ile çözündürülüp 45 mikron filtreden geçirilerek analize hazır duruma getirilmiştir. Şekil 5.10'da kromatogram gösterilmiştir.

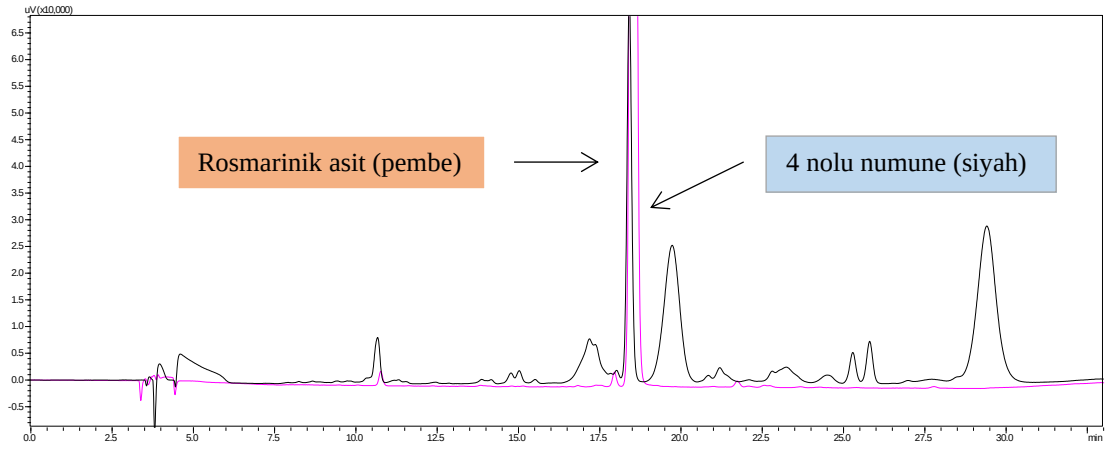
HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 99,772 ppm dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,855 g'dır. Ekstraksiyon verimi 8,55 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 199,544 mg/g'dır.



Şekil 5.10. Rosmarinik asit ve 3 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki maddelere göre 328 nm'de 14,8423 % olarak ölçülmüştür.

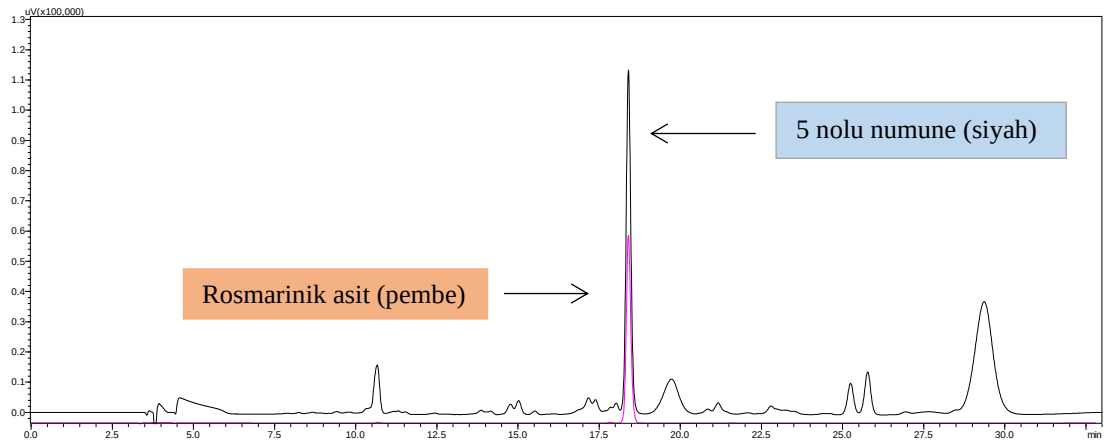
Şekil 5.11'de 4 nolu denemeye ait kromatogram verilmiştir. 4 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 1:20 oranı ayarlanarak aseton ile manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon süresi bitiminde süzöntü tekrar süzülerek dönerli buharlaştırıcı ile süzöntü evapore edilerek HPLC Grade aseton ile viallenmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 12,819 ppm olarak bulunmuştur. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,46 mg'dır. Ekstraksiyon verimi 4,6 %'dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 12,819 mg/g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.11. Rosmarinik asit ve 4 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki maddelere göre 328 nm’de 21,8406% olarak ölçülmüştür.

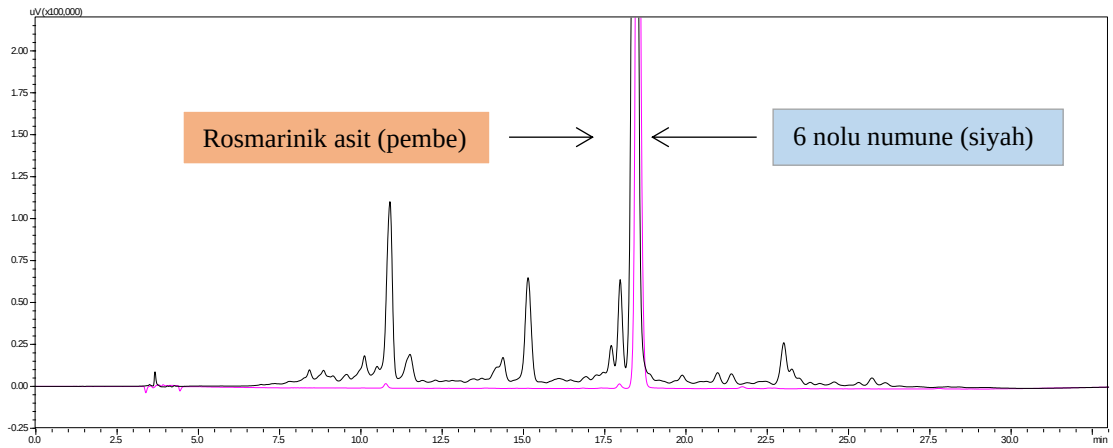
5 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 30 dakika boyunca yağimsı maddelerin giderimi için hekzan çözeltisi ile yıkanıp süzölmüştür. Süzöntü atılarak kalan katı materyal doğal ortamda kurutulmuştur. Manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca aseton ile muamele edilmiştir. Süzöntü alınarak dönerli buharlaştırıcıda evapore edilmiştir. Kalıntı aseton ile viallenerek HPLC analizine hazır hale getirilmiştir. Şekil 5.12’de kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 19,748 ppm dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,720 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 7,21 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 39,496 mg/g



Şekil 5.12. Rosmarinik asit ve 5 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki maddelere göre 328 nm’de 59,5642% olarak ölçülmüştür.

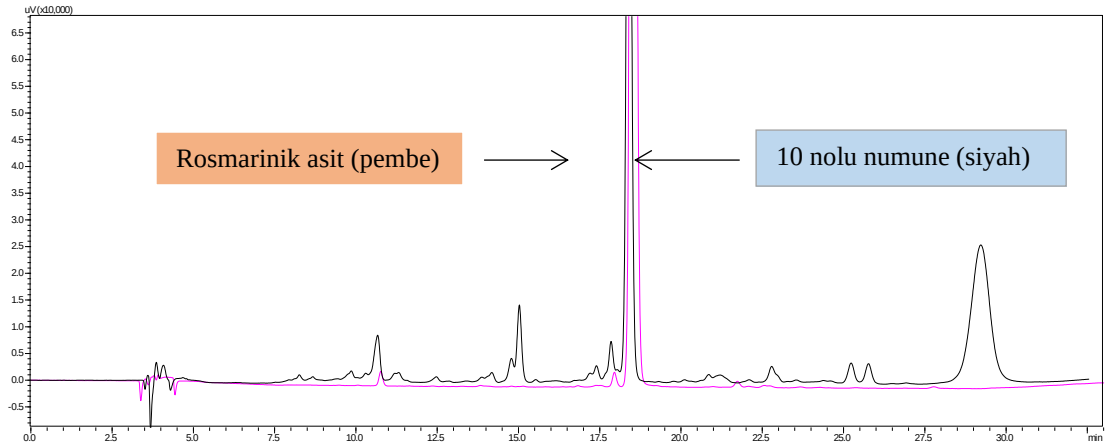
6 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı clevenger düzeneği kurularak hem uçucu yağ eldesi sağlanmıştır hem de balonda kalan posanın rosmarinik asit ihtivası için analize hazır hale getirilmiştir. Buradaki temel amaç uçucu yağ çıkarımı sonrası kalan posada rosmarinik asit ihtivasının kayda değer olup olmadığının araştırılması amacıyla uçucu yağ çıkarım prosesinin benzerinin kurulmasıdır. Elde edilen uçucu yağ % 1'dir. Bunun yanı sıra bol miktarda Adaçayı hidrolatı elde edilmiştir. Ekstraksiyon 8 saat sürmüştür. Bu süre sonunda clevenger düzeneğindeki posa süzöntüden ayrılıp. Süzöntü evapore edilmiştir. Kalıntı HPLC Grade metanolle viallenmiştir. Şekil 5.13'te karşılaştırılmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 172,214 ppm'dir. Başlangıçta 100 gram maddeden çıkarak 100 ml su kullanılarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 1,204 mg'dır. Ekstraksiyon verimi 12,04 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 172,214 mg/g'dır.



Şekil 5.13. Rosmarinik asit ve 6 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm'de 40,5519% olarak ölçülmüştür.

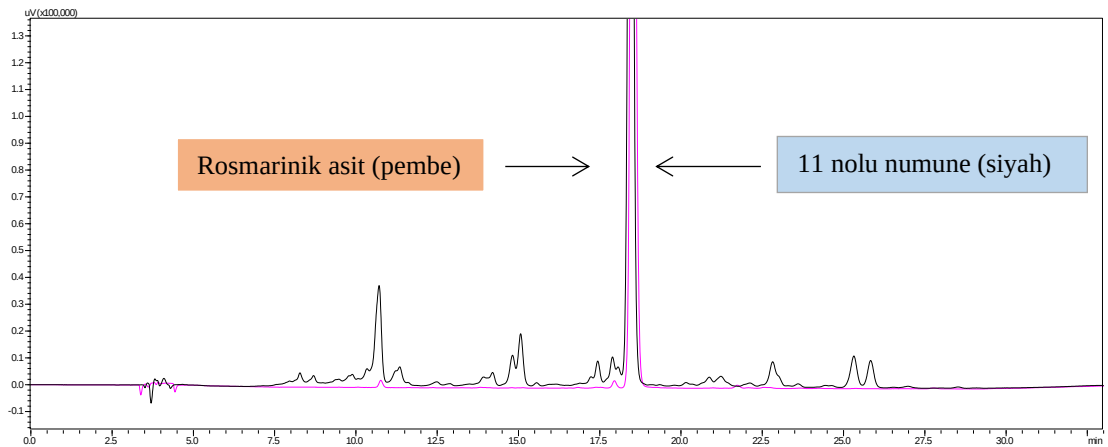
10 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı ön işlem olarak hekzan yıkaması yapılmıştır. Süzme işlemi ile hekzan ayrılmıştır. Adaçayları doğal ortamda kurutularak manyetik karıştırıcı yardımıyla katı sıvı ekstraksiyonuna tabii tutulmuştur. Manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat boyunca aseton ile muamele edilmiştir. Süzöntü alınarak dönerli buharlaştırıcıda evapore edilmiştir. Kalıntı aseton ile viallenerek HPLC analizine hazır hale getirilmiştir. Şekil 5.14'de karşılaştırılmalı kromatogram verilmiştir. Elde ettiğimiz sonuç 30,307 ppm dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,681 mg'dır. Ekstraksiyon verimi 6,81 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 60,614 mg/g'dır.



Şekil 5.14. Rosmarinik asit ve 10 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 51,1789% olarak ölçülmüştür.

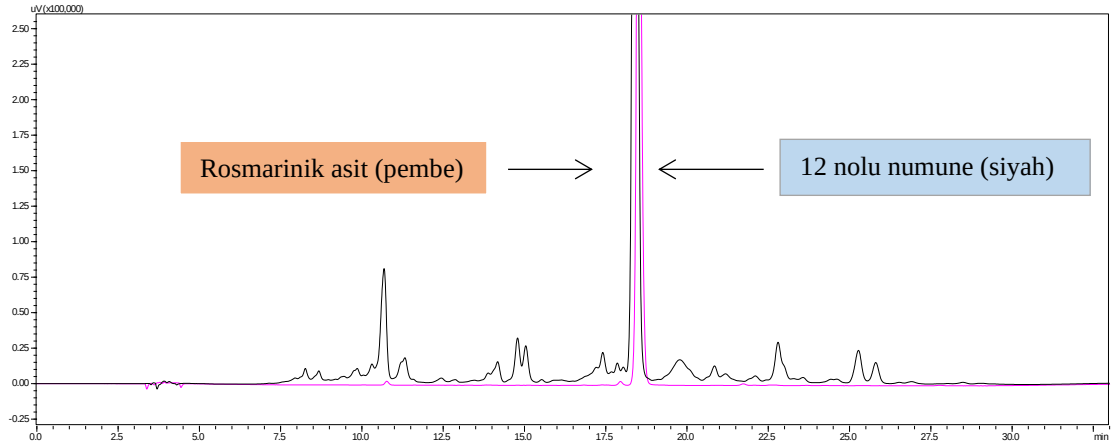
11 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı manyetik karıştırıcı yardımıyla aseton çözücüsü kullanılarak 24 saat boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süzöntü kalıntıdan ayrılarak dönerli buharlaştırıcıda evaporé edilmiştir. Kalıntı HPLC Grade Aseton ile viallenerek kalitatif ve kantitatif analizi yapılmıştır. Şekil 5.15’te karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 85,398 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,796 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 7,96 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 170,796 mg/g’dır.



Şekil 5.15. Rosmarinik asit ve 11 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 59,2853% olarak ölçülmüştür.

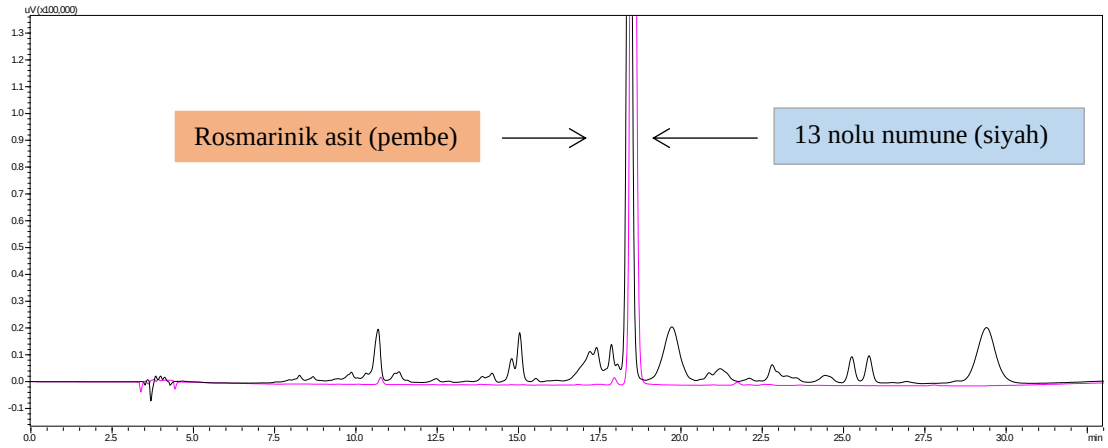
12 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 45 dakika boyunca 40 C sıcaklığında devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda erlendeki süzöntü süzme yardımıyla alınarak evapore edilmiştir. Kalan kalıntı HPLC Grade aseton ile çözündürölüp 45 mikron filtreden geçirilerek analize hazır duruma getirilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 193,474 ppm'dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,615 mg'dır. Ekstraksiyon verimi 6,15 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 386,948 mg/g'dır.



Şekil 5.16. Rosmarinik asit ve 12 nolu numune kromatogramı.

Şekil 5.17'de Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm'de 46,3739% olarak ölçölmüştür.

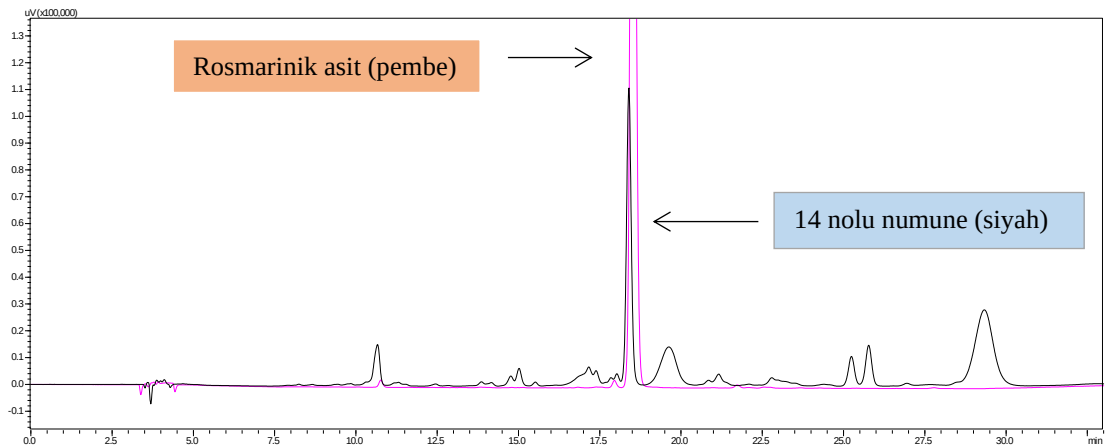
13 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı ekstraksiyon işlemi oda sıcaklığında 16 saat boyunca gerçekleştirildikten sonra süzöntü alınarak evapore edilmiştir. Kalıntı filtreden geçirilerek aseton ile viallenip HPLC analizi yapılmıştır. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 63,52 ppm'dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,734 mg'dır. Ekstraksiyon verimi 7,34 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 127,04 mg/g'dır.



Şekil 5.17. Rosmarinik asit ve 13 nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 26,0310 % olarak ölçülmüştür.

14 nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 1:20 oranı ayarlanarak aseton ile manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon süresi bitiminde süzöntü tekrar süzülerek dönerli buharlaştırıcı ile süzöntü evapore edilerek HPLC Grade aseton ile viallenmiştir. Şekil 5.18’de karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 19,401 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,612 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 6,12 %’dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 38,802 mg/g’dır.

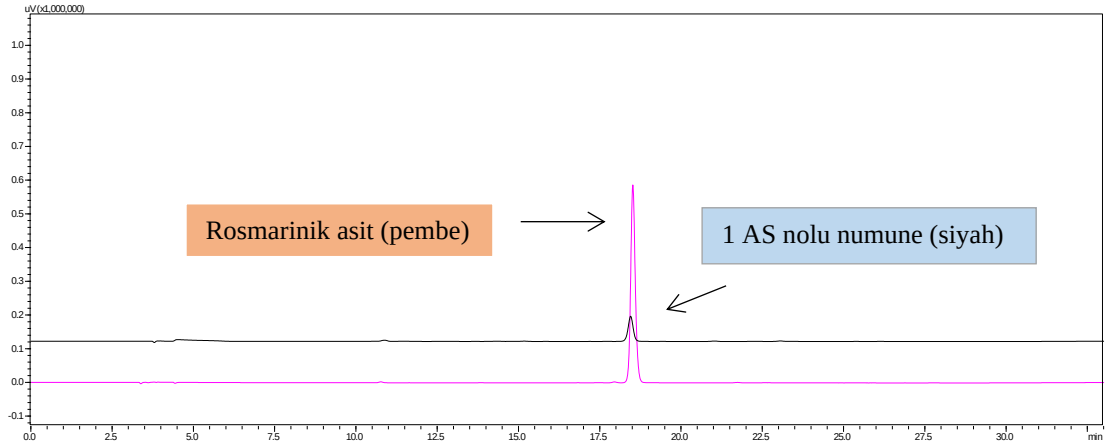


Şekil 5.18. Rosmarinik asit ve 14 nolu numune kromatogramı.

5.4. EKSTRAKSİYON METOTLARINDA AKTİF KARBON UYGULAMASI

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 50,7262% olarak ölçülmüştür.

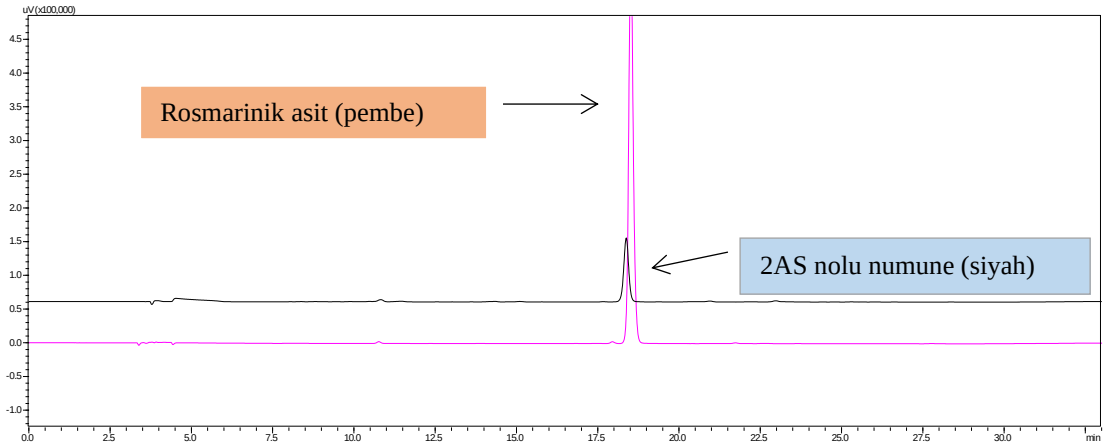
1AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 1 nolu numunedeki gibi 16 saat boyunca asetonla ekstrakte olması sağlanmıştır. Sonrasında süzülerek yöntemiyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Süzüntüye 5 gram aktif karbon eklenerek 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılıp süzölmüştür. Bu işlem ile boyar madde giderimi yapılmıştır. Kalan süzöntü evapore edilerek aseton ile viallenmiştir. Şekil 5.19’da karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 14,316 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,418 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 4,18 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 28,632 mg/g’dır.



Şekil 5.19. Rosmarinik asit ve 1 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 54,8690 % olarak ölçülmüştür.

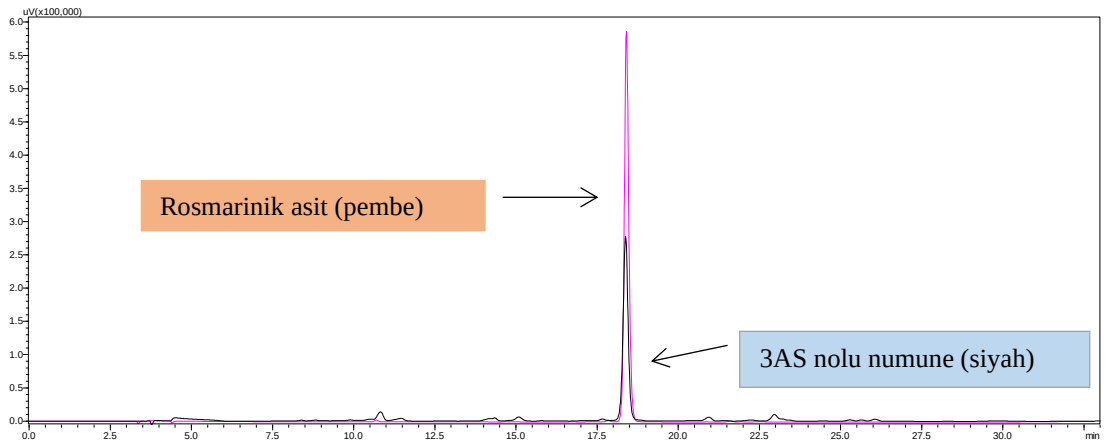
2 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 24 saat boyunca 1:20 oranında asetonla muamele edilerek manyetik karıştırıcı yöntemiyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.20’de karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 17,672 ppm dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,549 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 5,49 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 35,344 mg/g’dır.



Şekil 5.20. Rosmarinik asit ve 2 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 60,8226 % olarak ölçülmüştür.

3 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı aseton ile 45 dakika boyunca 40 C’de ultrasonik banyo yardımıyla ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Elde edilen süzöntü evapore edilip aseton ile viallenerek filtreden geçirilip HPLC analizine hazırlanmıştır. Şekil 5.21’de karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 52,410 ppm dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,421 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 4,21% dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 104,82 mg/g’dır.

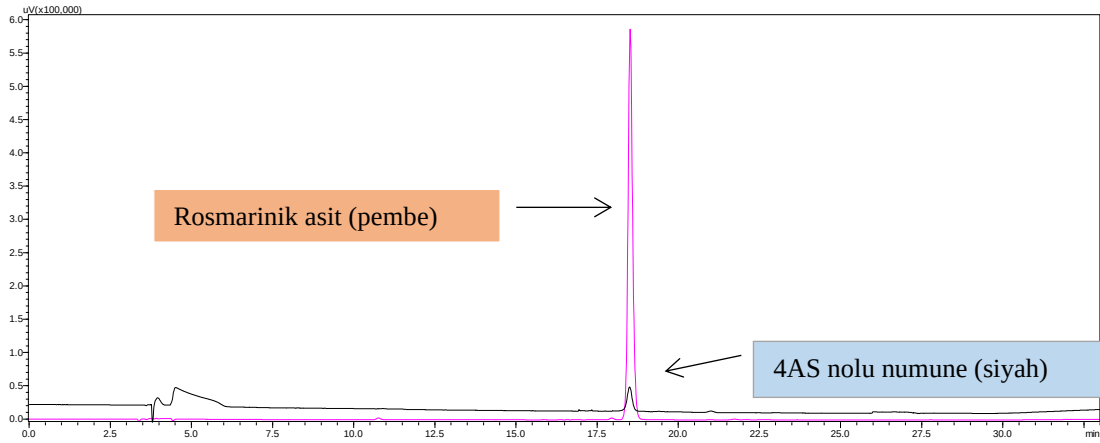


Şekil 5.21. Rosmarinik asit ve 3 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 10.0050 % olarak ölçülmüştür.

4 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı manyetik

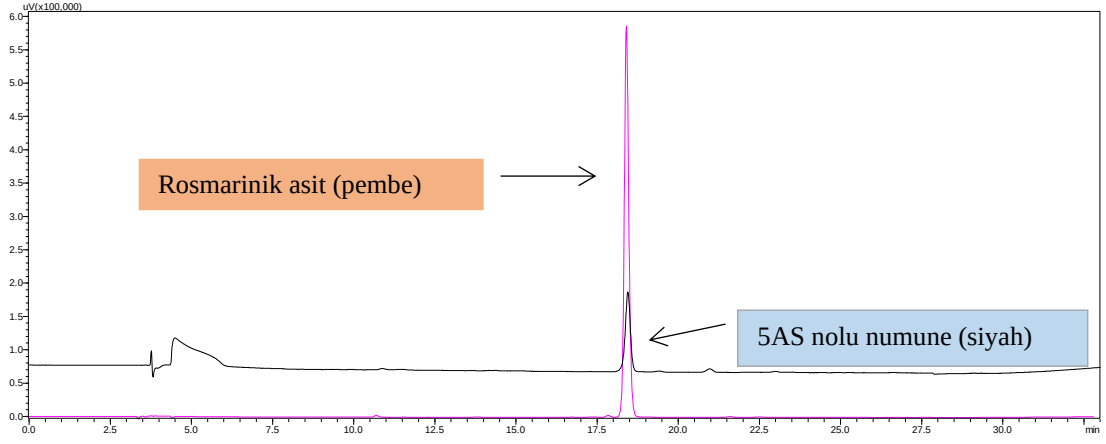
karıştırıcıda 2 saat ekstrakte edilerek süzölmüştür. Süzöntüye aktif karbon eklenerek 30 dakika boyunca adsorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve sonrasında süzölerek evapor edilmiştir. Şekil 5.22’de karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 1,275 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,214 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 2,14 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 2,55 mg/g’dır.



Şekil 5.22. Rosmarinik asit ve 4 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 25.5671 % olarak ölçölmüştür.

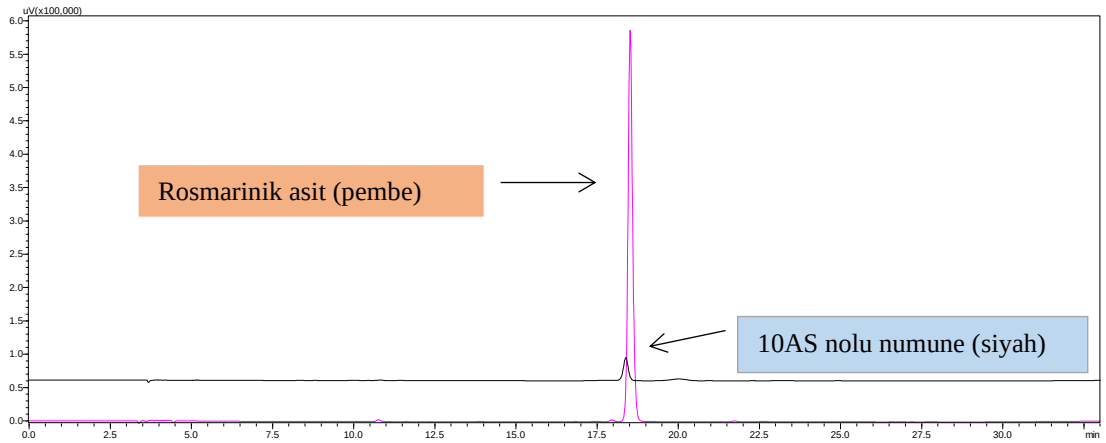
5 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 2 saat ekstraksiyon aseton ile manyetik karıştırıcı yardımıyla gerçekleştirildikten sonra süzöntü alınır ve aktif karbon uygulaması yapılır. Aktif karbon ile adsorpsiyon işlemi sonrası süzme yapılır ve aktif karbon süzöntüden ayrılır. Evaporasyon sonrası kalıntı aseton ile viallenerek HPLC analizine hazır hale getirilir. Şekil 5.23’te karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 2,673 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,374 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 3,74%’dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 5,346 mg/g’dır.



Şekil 5.23. Rosmarinik asit ve 5 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 57.1088 % olarak ölçülmüştür.

10 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 2 saat ekstraksiyon etanol ile manyetik karıştırıcı yardımıyla gerçekleştirildikten sonra süzüntü alınır ve aktif karbon uygulaması yapılır. Aktif karbon ile adsorpsiyon işlemi sonrası süzme yapılır ve aktif karbon süzüntüden ayrılır. Evaporasyon sonrası kalıntı aseton ile viallenerek, HPLC analizine hazır hale getirilir. Şekil 5.24’te karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 6,360 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,574 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 5,74%’dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 12,72 mg/g’dır.

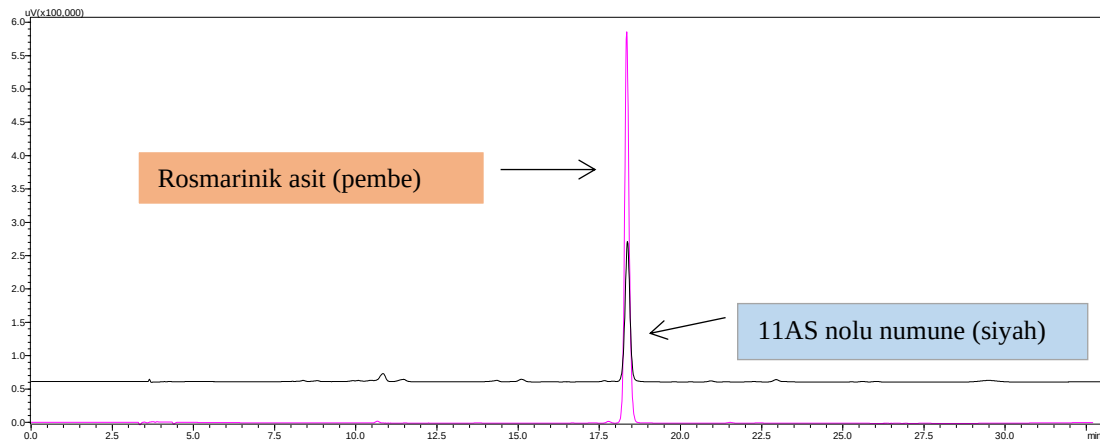


Şekil 5.24. Rosmarinik asit ve 10 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 72,6252

% olarak ölçülmüştür.

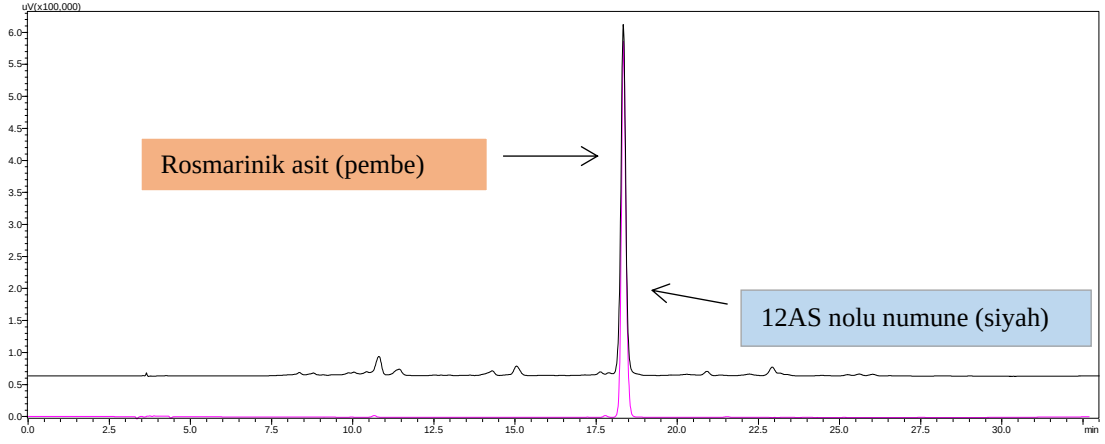
11 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 24 saat asetonla ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası süzme işlemi yapılarak aktif karbon uygulaması yapılmıştır. Aktif karbon ve süzüntü ayrılarak süzüntü evapore edilmiştir. Kalıntı HPLC Grade etanolle viallenerek HPLC analizine hazır hale getirilmiştir. Şekil 5.25’de karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 38,616 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,425 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 4,25% dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 77,232 mg/g’dır.



Şekil 5.25. Rosmarinik asit ve 11 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 70.8755 % olarak ölçülmüştür.

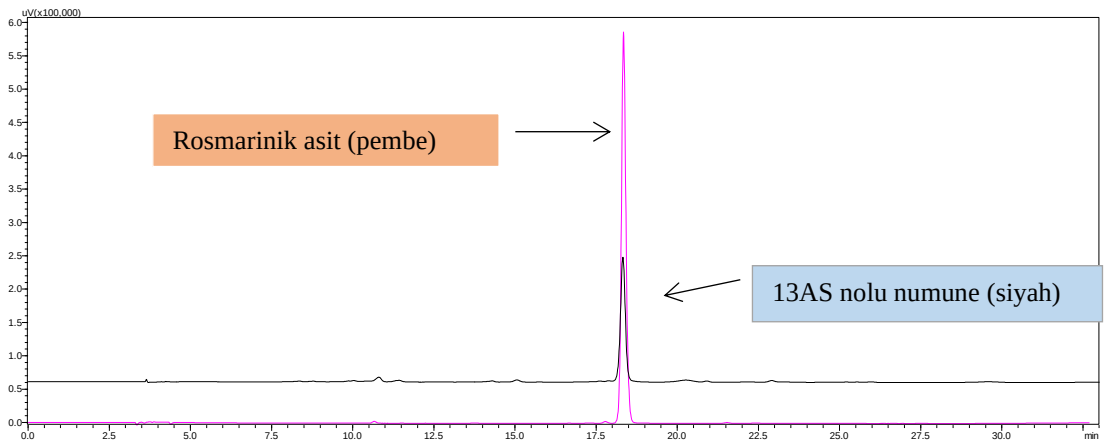
12 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 45 dakika boyunca 40 C’de ultrasonik banyo yardımıyla ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü etanol olarak kullanılmıştır. Kalıntı ve süzüntü birbirlerinden ayrıldıktan sonra süzüntü aktif karbon ile muamele edilmiş ve 30 dakika karıştırıcıda karıştırdıktan sonra süzüntü ve aktif karbon birbirinden ayrılmıştır. Şekil 5.26’da karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. Süzüntü evapore edilerek kalıntı HPLC grade metanolle viallenmiştir. HPLC analizinden elde edilen sonuç 99,897 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,325 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 3,25 % dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 199,794 mg/g’dır.



Şekil 5.26. Rosmarinik asit ve 12 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 72.3387 % olarak ölçülmüştür.

13 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı etanol çözeltisi ile 16 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla ekstraksiyon işlemine tabii tutulmuştur. Ekstraksiyon süresi sonunda süzöntü katı materyalden ayrılarak aktif karbon adsorbanıyla muamele edilmiştir. Aktif karbon da süzöntüden ayrılarak evapore edilmiştir. Kalan kalıntı HPLC grade metanolla viallenmiştir. Şekil 5.27’de karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC analizinden elde edilen sonuç 33,735 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,215 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 2,15 %’dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 67,47 mg/g’dır.

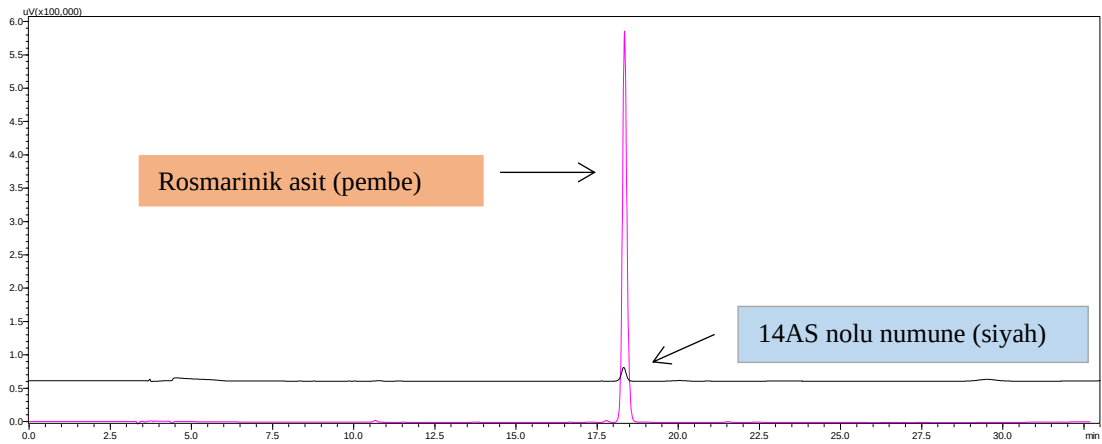


Şekil 5.27. Rosmarinik asit ve 13 AS nolu numune kromatogramı.

Kromatogram incelendiğinde elde edilen ekstredeki numune miktarı 328 nm’de 50,2942

% olarak ölçülmüştür.

14 AS nolu denemede gölgede kurutularak toz haline getirilen adaçayı 2 saat boyunca etanol ile manyetik karıştırıcıda ekstrakte edilmiştir. Süzüntü ve katı materyal birbirinden ayrılarak süzüntüye tekrar aktif karbon eklemek şartıyla 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıya konulmuştur. Elde edilen karışım süzülerek süzüntü alınıp evaporare edilmiştir. Kalıntı metanolle çözündürülüp filtreden geçirilerek viallenmiştir. Şekil 5.28’de karşılaştırmalı kromatogram verilmiştir. HPLC cihazından elde ettiğimiz sonuç 3,812 ppm’dir. Başlangıçta 10 gram maddeden çıkarak deneme yapılmıştır. Evaporasyon sonrası kalan kalıntı 0,174 mg’dır. Ekstraksiyon verimi 1,74%’dir. Rosmarinik asit ihtivası ise 7,624 mg/g’dır.



Şekil 5.28. Rosmarinik asit ve 14 AS nolu numune kromatogramı.

Çizelge 5.1. Deney numunelerine ait sayısal veriler.

Numune Kodu	Ekstraksiyon Verimi %	Rosmarinik Asit İhtivası mg/g	Kromatogramdan hesaplanan pik saflığı %
1	4,59	44,402	39.1865
2	6,17	63,144	36.4424
3	8,55	199,544	44.6535
4	4,60	12,819	14.8423
5	7,21	39,496	21.8406
10	6,81	60,614	40.5519
11	7,96	77,232	51.1789
12	6,15	199,794	59.2853

Çizelge 5. (devam) Deney numunelerine ait sayısal veriler.

Numune Kodu	Ekstraksiyon Verimi %	Rosmarinik Asit İhtivası mg/g	Kromatogramdan hesaplanan pik saflığı %
13	7,34	127,04	46.3739
14	6,12	38,802	26.0310
1 AS	4,18	28,632	50.7262
2 AS	5,49	35,344	54.8690
3 AS	4,21	104,82	60.8226
4 AS	2,14	2,55	10.0050
5 AS	3,74	5,346	25.5671
10 AS	5,74	12,72	57.1088
11 AS	4,25	77,232	72.6252
12 AS	3,25	199,794	70.8755
13 AS	2,15	67,47	72.3387
14 AS	1,74	7,624	50.2942
Klevenger denemesi	1,204	172,214	59.5642

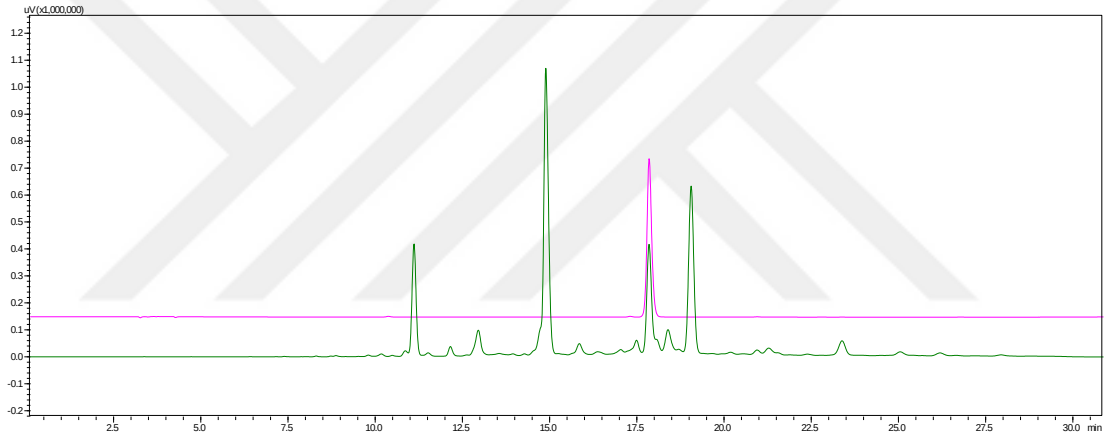
Planlanan ve uygulanan ekstraksiyon yöntemleri, ekstraksiyon süreleri, adsorban uygulanması kendi aralarında kıyaslandığında sırasıyla 2 saat, 16 saat, 24 saat uygulama ve ultrasonik uygulamada giderek artacak şekilde rosmarinik asit miktarları artmıştır. Çözücüler kıyaslandığında etanolün asetona göre çok daha etkili olduğu görülmüştür. Adsorban olarak aktif karbon uygulamasında bu adsorbanın organik yapılı etken madde olan rosmarinik asitte de adsorplanma gösterdiği gözlenmiştir. Fakat bunun yanı sıra HPLC verilerinde rosmarinik asite ait pik saflığının tüm denemelerinde aktif karbonsuz denemelere göre arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak rosmarinik asit miktarı düşerken pik saflığımızın arttığı gözlenmiştir.

Yöntem geliştirme çalışmalarımızın devamında ultrasonik destekli ekstraksiyon tekrarlı şekilde çalışarak sonuçlar kaydedildi. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda çok verimli sonuç alınmasına karşın hem atıkların değerlendirilmesi açısından hem de kimyasal çözücü yerine suyun kullanılmasının daha büyük kazanç sağlayacağı düşünülerek geri soğutucu altında sıcak su ile yapılan ekstraksiyonlarda geliştirme çalışmaları kapsamına

alındı. Aynı zamanda pH ayarı ve çöktürme denemeleri ile rosmarinik asit zenginleştirmesine katkı sağlayıp sağlamayacağımıza dair bilgileri açığa çıkarmak adına da çalışmalar yapıldı.

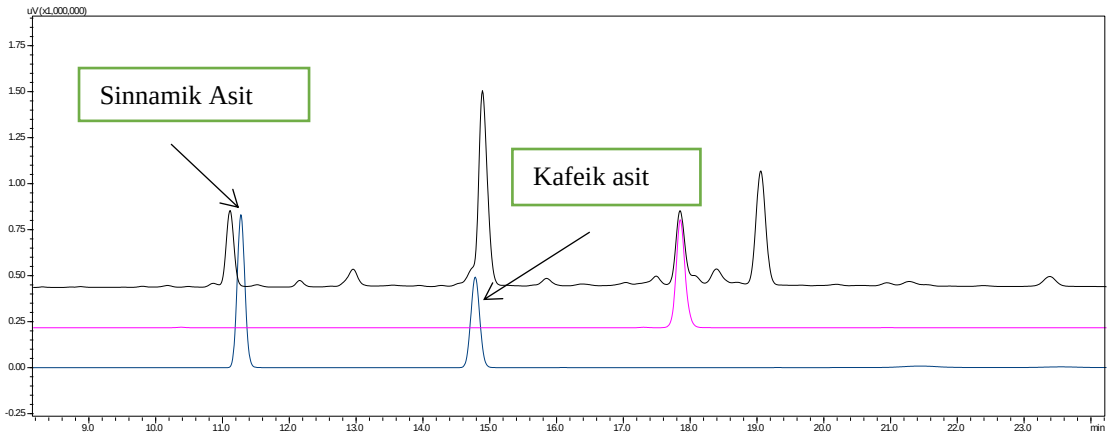
5.5. ADAÇAYI POSALARINA UYGULANAN EKSTRAKSİYONLAR

Geri soğutucu altında su ile ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ektre süzüldü. Sulu süzüntüye H_2SO_4 pH 2 olana kadar eklendi. Çamurumsu bir çökelek oluştu. Çökelti adi süzgeç kâğıdı ile alındı. Süzüntüye 1:1 oranında etilasetat ile s-s ekstraksiyon gerçekleştirildi. Etilasetat fazı evapore edildi. Kalıntı metanolle çözündürülerek alındı ve aşağıdaki HPLC Kromatogramı elde edildi. 106,7147 ppm RA elde edildi. Şekil 5.29'da yeşil renk ile ekstraksiyon kromatogramı pembe renk ile rosmarinik asit gösterilmiştir.



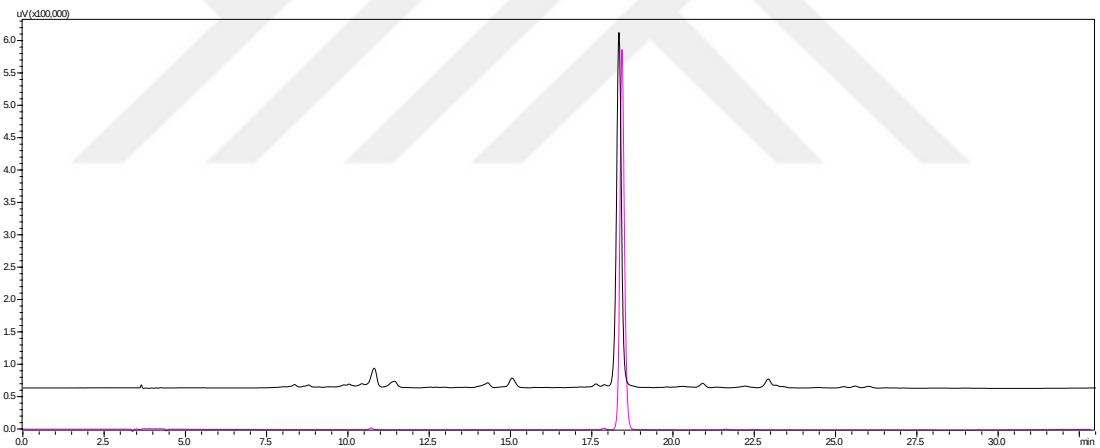
Şekil 5.29. Posaya denenen numuneye ait kromatogram.

Aynı numunede baskın gelen piklerin tanımlamasını yapabilmek adına literatür desteğiyle sinamik asit ve kafeik asit standartları ile numune kıyaslaması yapıldı. Şekil 5.30'da mavi renkle sinamik asit ve kafeik asit karışımı, pembe renkle rosmarinik asit, siyah renkle numune ekstraksiyonu karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.30 Ekstraksiyon sonrası elde edilen kromatogram ve standartlar kıyaslaması

Ultrasonik banyo yardımıyla 1:20 oranda 50 °C’de 40 dakika ekstraksiyon yapıldı. Numune süzüldü aynı katı materyal tekrar ultrasonik banyoda ekstre edildi. İşlem 3 kez tekrarlandı. Süzüntüler birleştirildi. Evapore edildi. Şekil 5.31’deki gibi aşağıdaki kromatogramlar elde edildi. HPLC Analizi kantitatif sonucu rosmarinik asit 1231,392 ppm elde edildi.

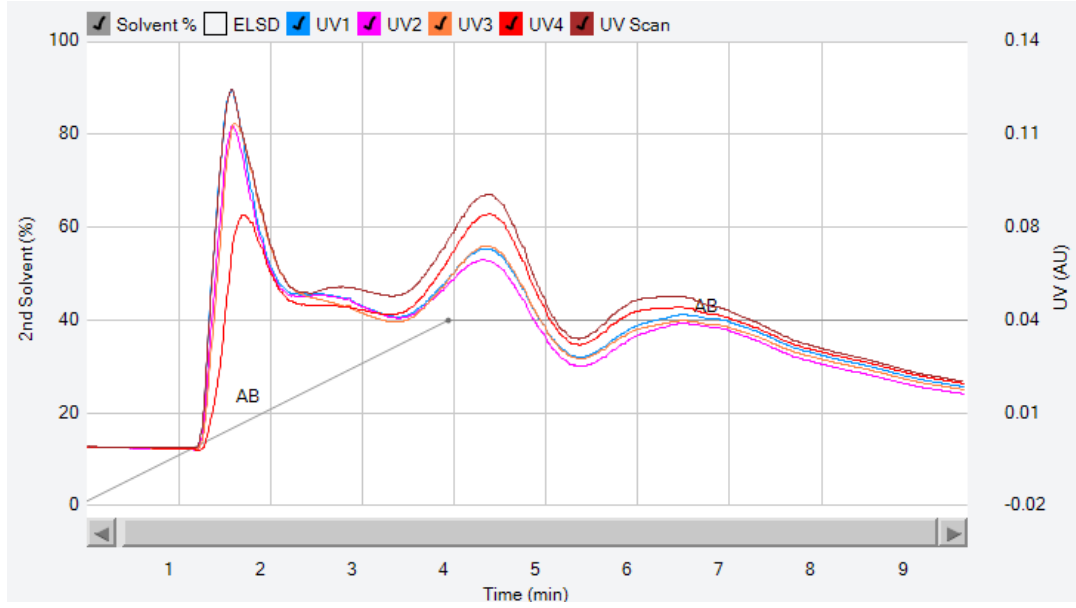


Şekil 5.31. Adaçayı posasına uygulanan tekrarlı ultrasonik banyo.

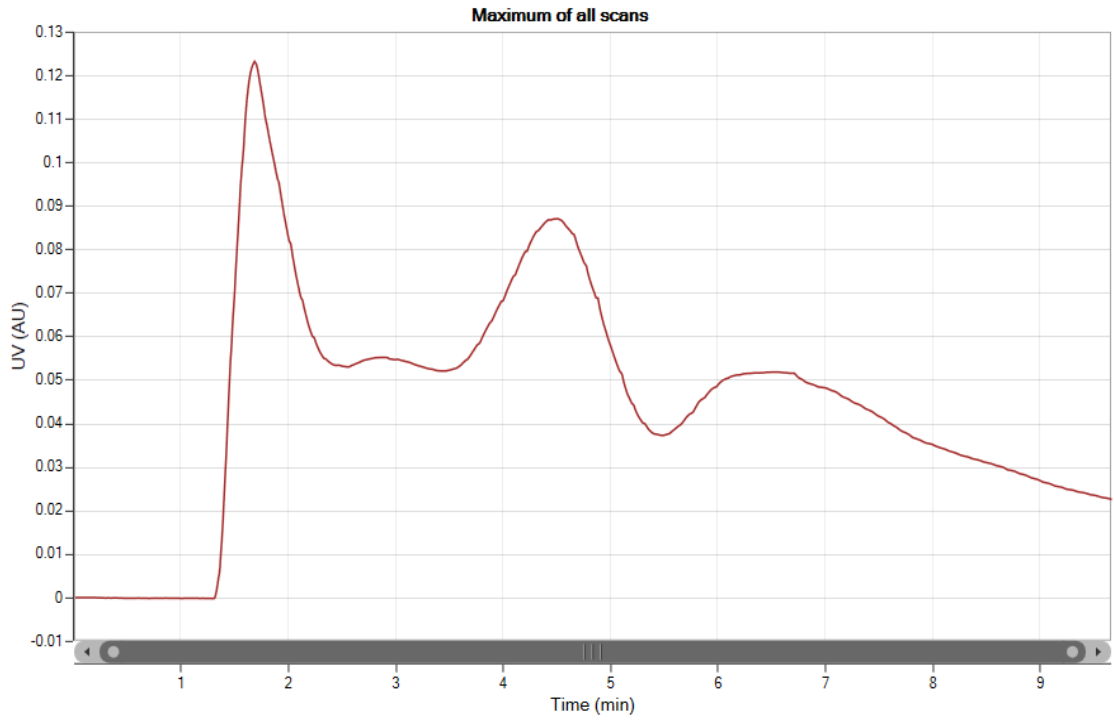
5.6. FLAŞ KROMATOĞRAFİSİ UYGULAMALARI

Geri soğutucu altında yapılan tekrarlı ekstraksiyon çalışmasından sonra elde edilen ekstre evapore edilerek viallendikten sonra flash kromatografisiyle ayrılma işlemine tabi tutuldu. Birçok metot denemesinden birkaçına baktığımızda; verilen metotta akış hızı 15ml/dk olarak ayarlandı. Mobil faz hatlarında A: Su B: Metanol olacak şekilde ayarlandıktan sonra gradient sistem oluşturuldu. 4. Dakikaya kadar % 60 su %40 metanol çekecek şekilde ayarlandı ve 10. Dakikaya kadar bu şekilde devam ederek analiz sonlandırıldı. 254-400 nm aralığında tarama yapıldı. Bunun haricinde spesifik

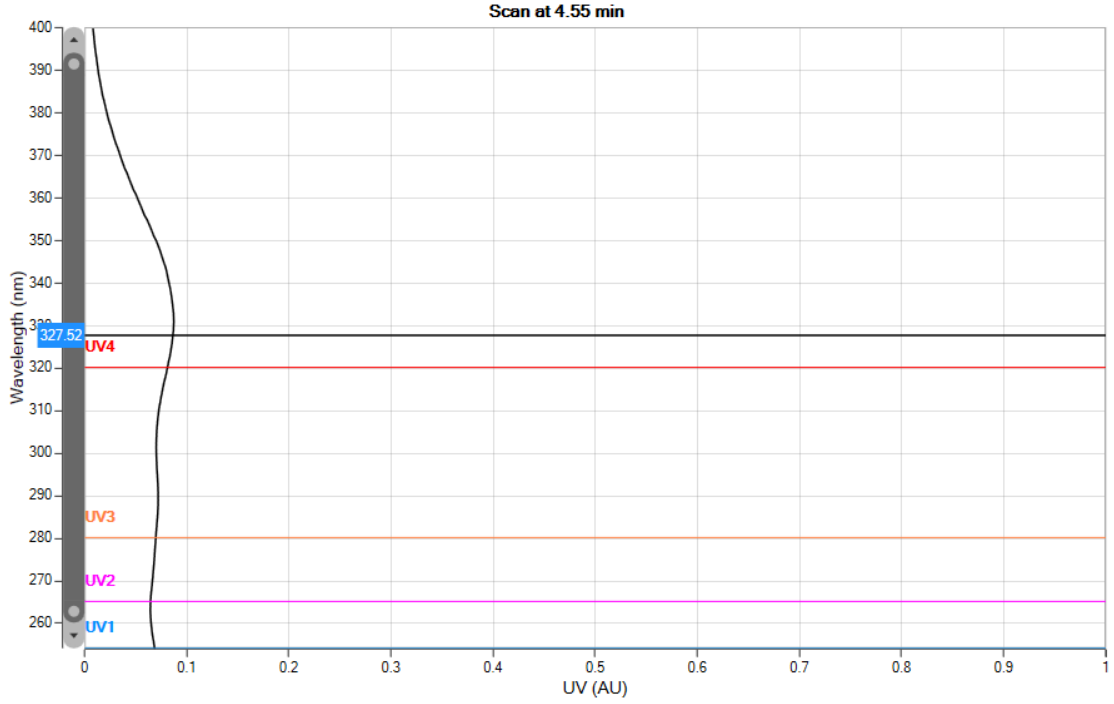
olarak 254-264-280-328 nm’de dedekte edildi. **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**’de flaş kromatografi metot deneme uygulamaları gösterilmiştir. Şekil 5.34’te flaş kromatografisi ile gözlenen piklere ait UV dalgaboyu görüntüsü gösterilmiştir. Sonuç olarak aşağıdaki kromatogram elde edildi.



Şekil 5.32 Flaş kromatografi metot geliştirme basamaklarına ait kromatogram.



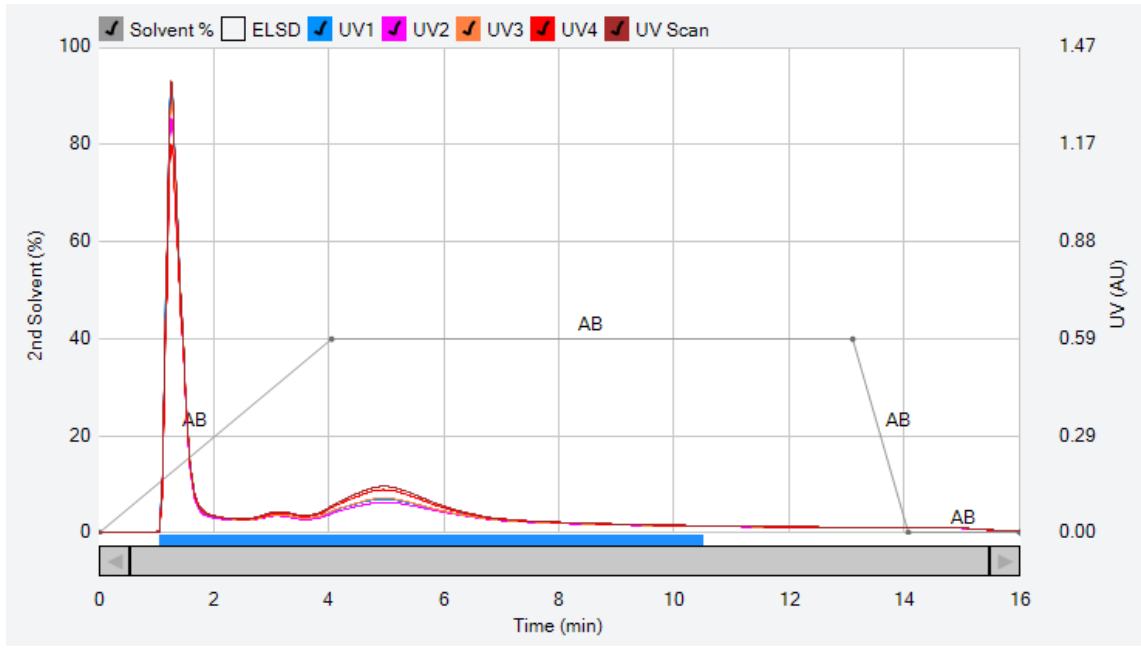
Şekil 5.33 Flaş kromatografisine ait kromatogram.



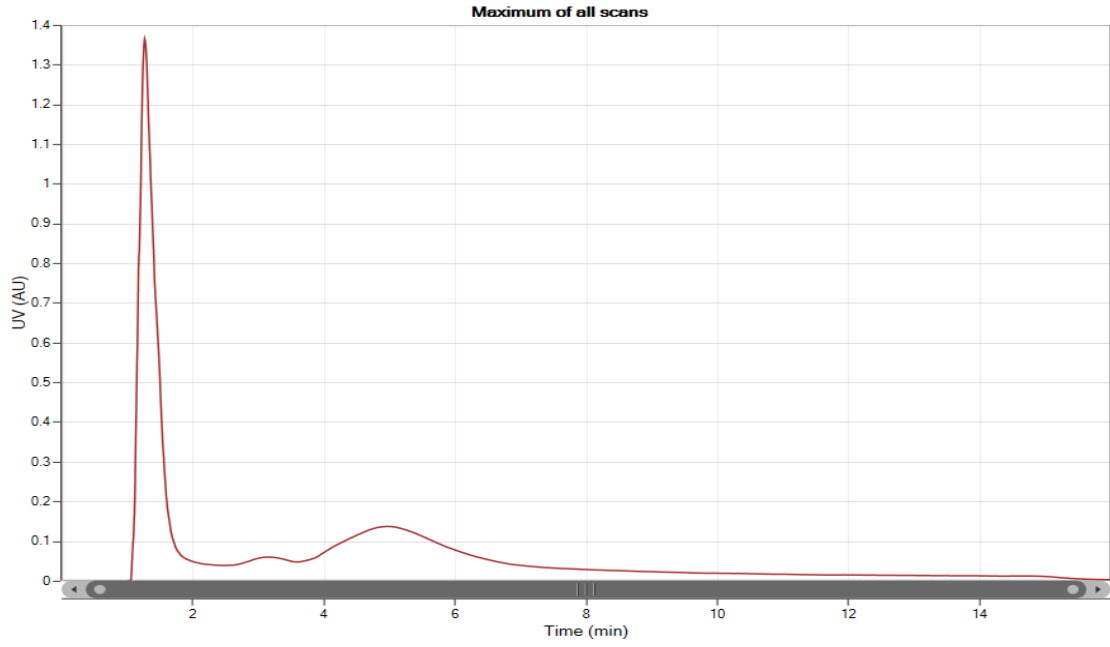
Şekil 5.34. Flaş kromatografisi ile gözlenen piklere ait UV dalgaboyu görüntüsü.

UV taramasında görüldüğü gibi rosmarinik asidin tayin edildiği 328 nm dalgaboyunda absorbands mevcuttur. Fakat tam olarak saf bir molekül absorbandsından bahsedilememektedir.

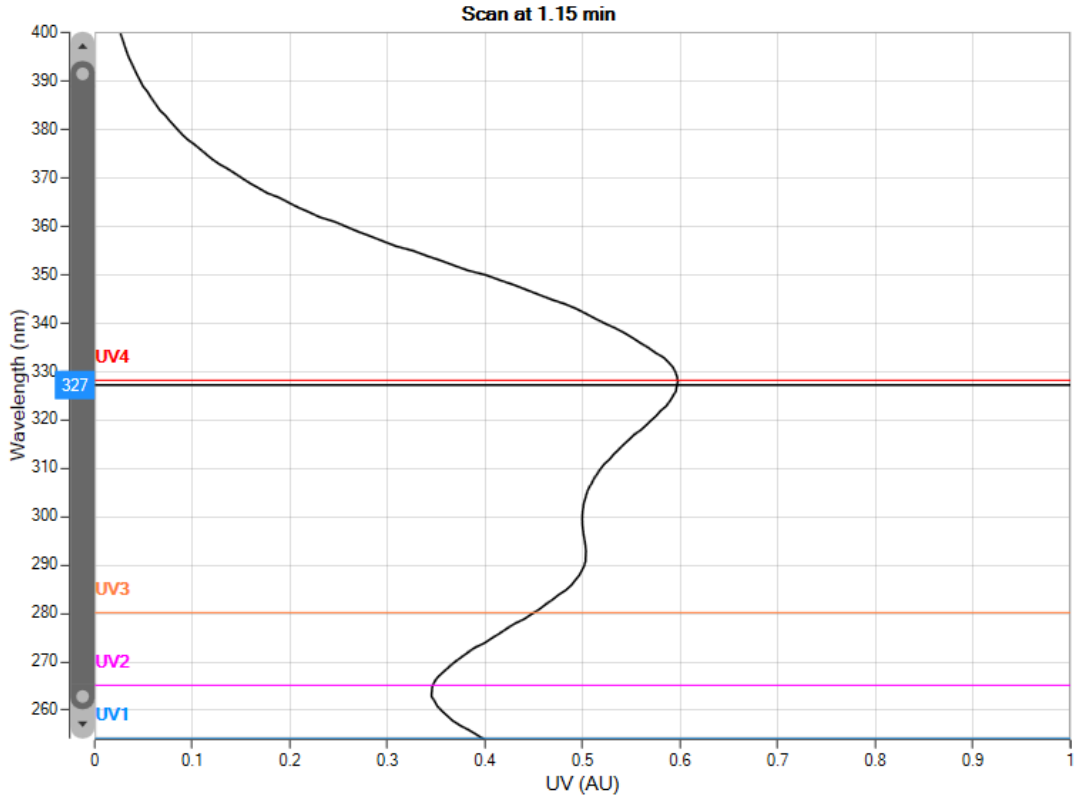
Tekrarlı ekstraksiyon çalışmasından sonra elde edilen ekstre evapore edilerek viallendikten sonra flaş kromatografisiyle yapılan başka bir denemede ise akış hızı 10 ml/dk olarak ayarlandı. Mobil faz hatlarında yine A: Su B: Metanol olacak şekilde ayarlandıktan sonra gradient sistem oluşturuldu. 4. Dakikaya kadar % 60 su %40 metanol çekecek şekilde ayarlandı ve 13. Dakikadan sonra tekrar 1 dakika içinde % 100 su olacak şekilde geri dönüşüm olmuştur. Şekil 5.35, Şekil 5.36, Şekil 5.37’de flaş kromatografisi cihazından alınan kromatogramlar alınmıştır.Şekil 5.40



Şekil 5.35 Flaş kromatografisi uygulaması metot denemeleri.

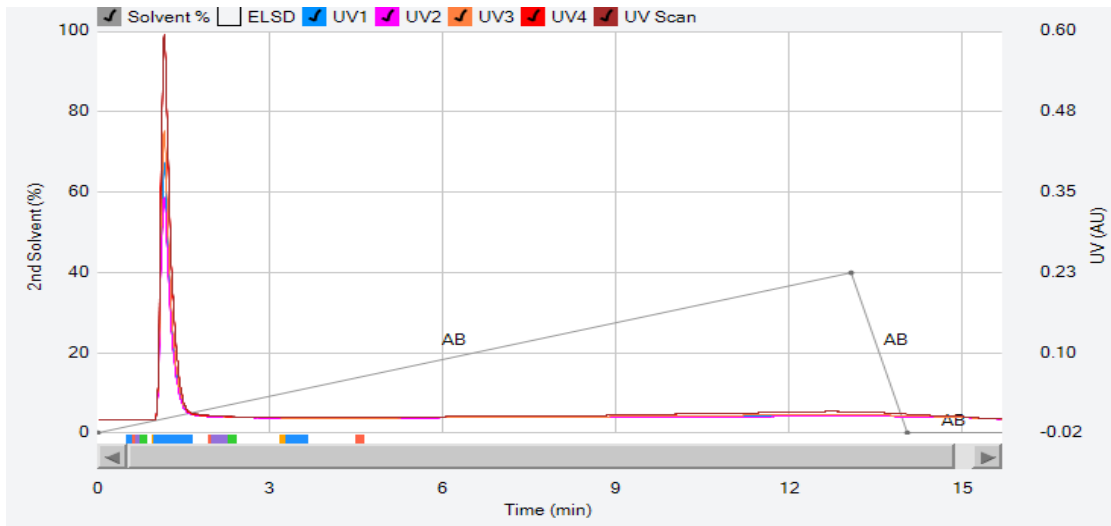


Şekil 5.36. Flaş kromatografisi kromatogramı.

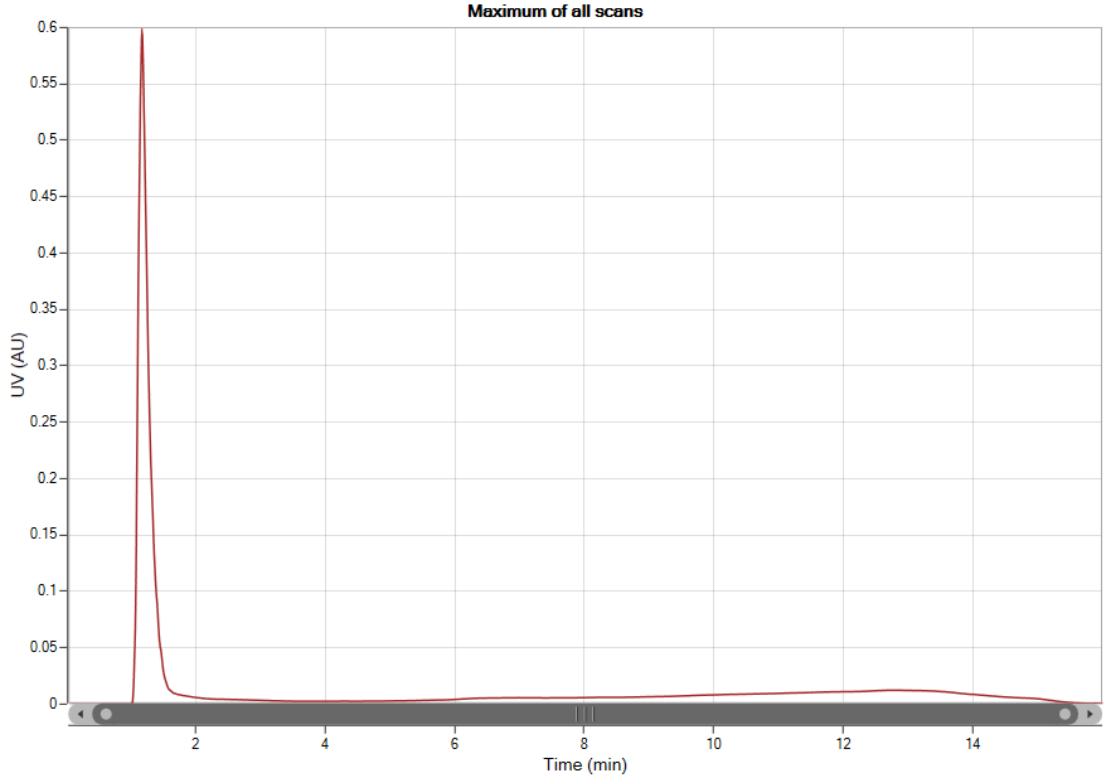


Şekil 5.37. Flaş kromatografisi ilk pike ait UV dalga boyu taraması.

Etanol çözücüsü kullanılarak ultrasonik banyo yardımıyla tekrarlı ekstraksiyon yapıldı ve elde edilen süzöntüler birleştirilerek evapore edildi. Evapore sonrası flaş kromatografisi uygulanarak elde edilen fraksiyon toplandı ve aşağıdaki kromatogram elde edildi.

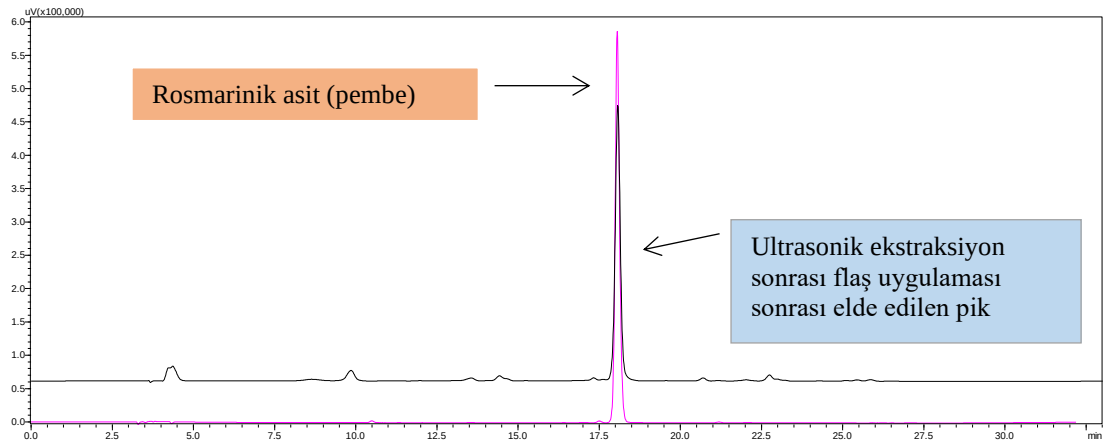


Şekil 5.38. Ultrasonikasyon yardımıyla elde edilen ekstreye ait flaş kromatografi kromatogramı.



Şekil 5.39. Flaş kromatografisi kromatogramı.

Flaş sonrası toplanan fraksiyonlara tekrar HPLC analizleri yapılarak saflık derecelerine bakıldı. Buradan toplanan fraksiyon HPLC analizi yapılmak üzere hazırlandı ve aşağıdaki kromatogram elde edildi.

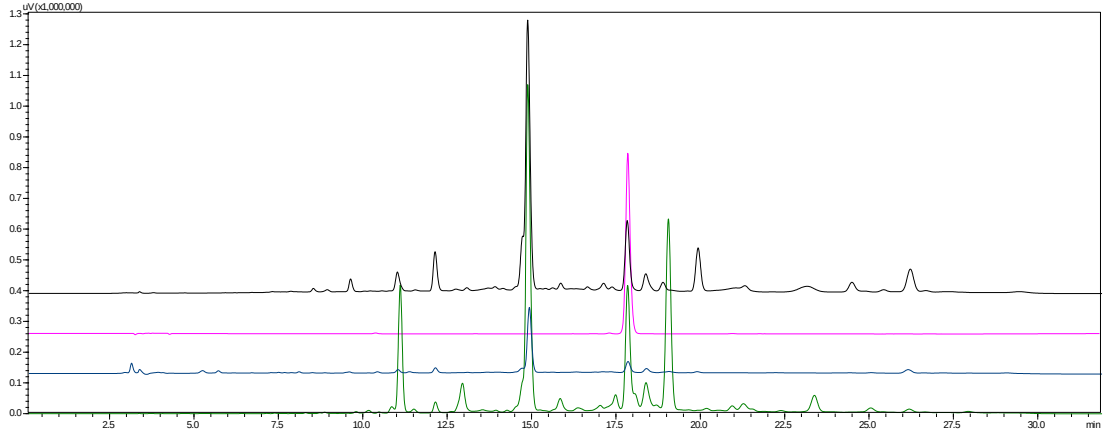


Şekil 5.40. Flaş kromatografisi ile elde edilen fraksiyonun HPLC analizi.

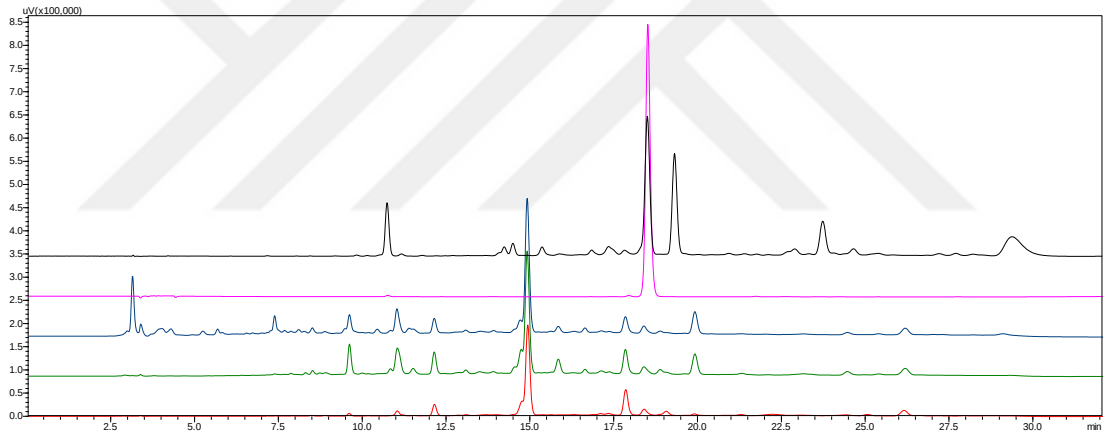
Tekrarlı ekstraksiyon çalışmaları sonrası elde edilen ekstratlar flaş kromatografisine uygulanarak fraksiyonlar toplandı ve rosmarinik asit içeriklerine HPLC ile bakıldı.

Farklı ekstraksiyon metotları ile belirlenen en uygun yöntem ve flaş kromatografisi öncesi denenilen metotlar kıyaslandığında her metodun kendine has önemli noktaları

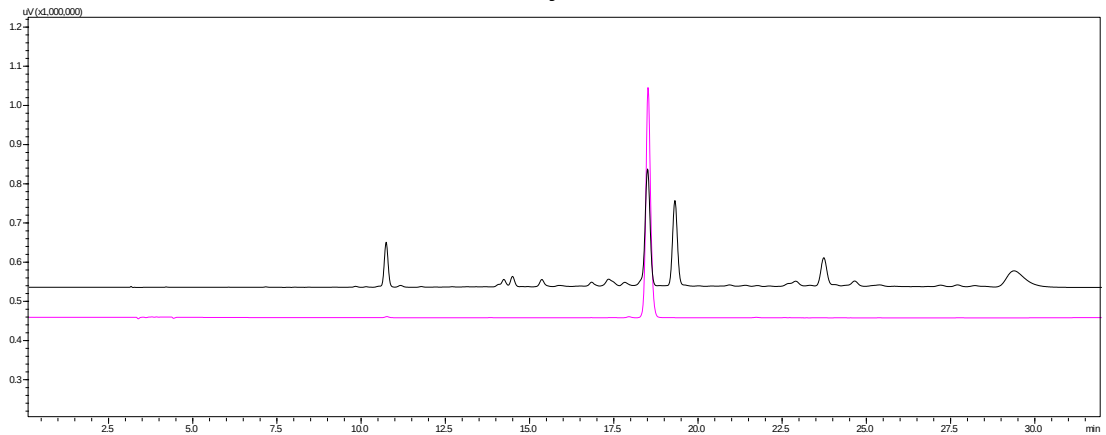
belirlendi. Etanol ile ve ultrasonik banyo ile yapılan denemelerden olumlu sonuçlar elde edilirken, pH ayarlanması ile elde edilen çalışmalardan da yüksek miktarlar elde edildi. Fakat bu denemelerde rosmarinik asit tek başına değil yanında farklı maddelerle elde edildi.Şekil 5.41’de flaştan toplanan her fraksiyona ait HPLC kromatogramı verilmiştir.



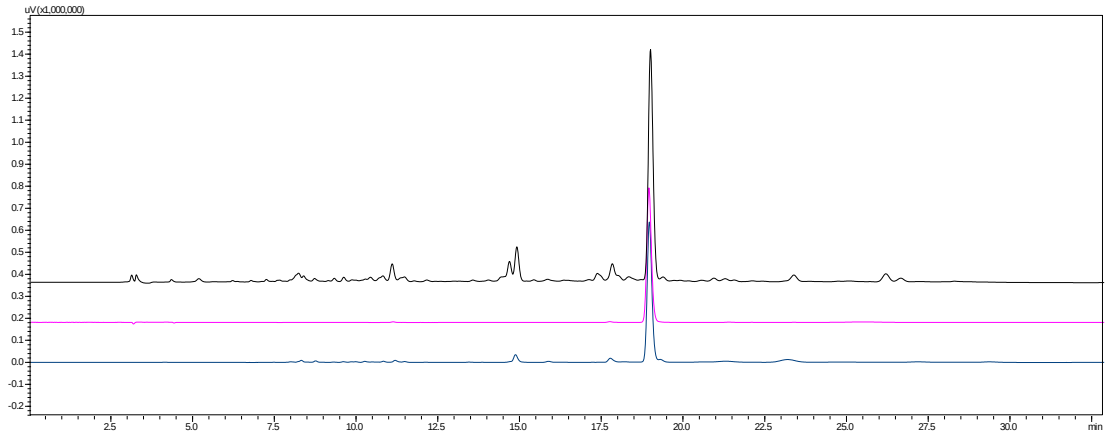
Şekil 5.41. Flaş uygulaması sonrası toplanan fraksiyonlara ait kromatogram.



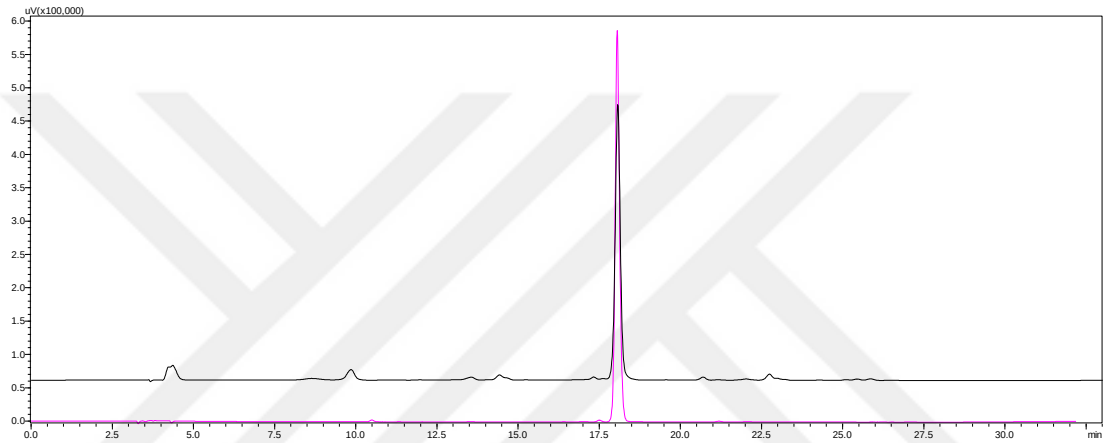
Şekil 5.42. Flaş uygulaması sonrası toplanan fraksiyonlara ait kromatogram tüm fraksiyonlar.



Şekil 5.43. Flaş uygulaması sonrasına ait zenginleştirilmiş rosmarinik asite ait kromatogram.



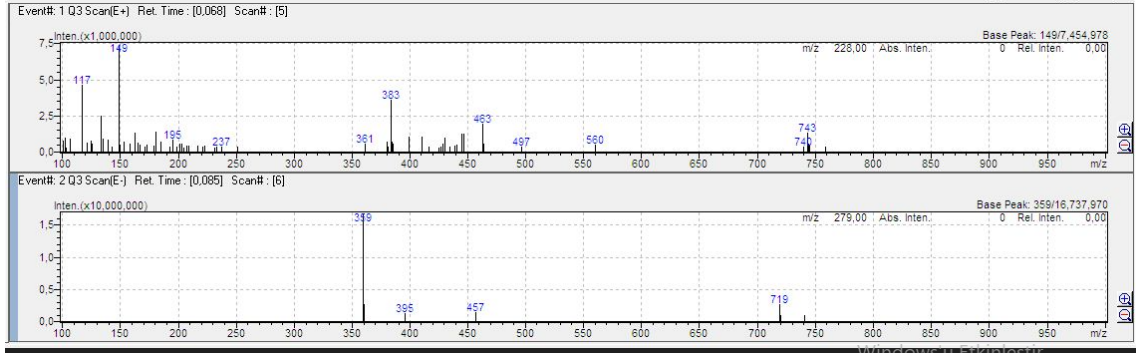
Şekil 5.44. Ultrasonik banyo sonrası flaş kromatografi uygulaması.



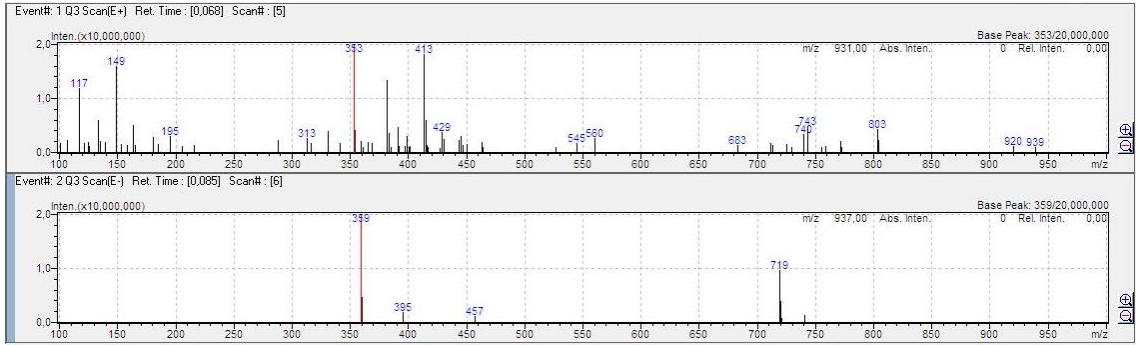
Şekil 5.45. Ultrasonik banyo uygulaması sonrası elde edilen zenginleştirilmiş rosmarinik asit.

5.7. FLAŞ KROMATOĞRAFI İLE TOPLANAN FRAKSİYONA AİT LC-MS ANALİZİ

Flaş kromatografisi ile toplanan fraksiyonlara öncelikle HPLC analizleri yapıldı. Hplc analizleri ile elde edilen pikin rosmarinik asit olduğu doğrulandı. Fakat tamamen doğrulama yapılması için LC-MS ile tayini yapıldı. LC-MS için bir dış laboratuvarından hizmet alımı yapıldı. Bunun için hem toplanan fraksiyon hem de rosmarinik asidin standardı analize gönderildi. Bu analizler sonunda aşağıdaki kromatogramlar elde edildi. Şekil 5.46 ve Şekil 5.47’de detaylı LC-MS kromatogramları verilmiştir.



Şekil 5.46. Elde edilen fraksiyona ait LC-MS analizi kromatogramı.



Şekil 5.47. Rosmarinik asit standardına ait LC-MS kromatogramı.

Görüldüğü gibi her ikisinin kütlesi rosmarinik aside ait olan molekül ağırlığını vermektedir. Negatif iyonlaşma gerçekleşerek 359,05 kütlesini rosmarinik asit standardında görürken, fraksiyon numunesine ait kütleyide 359,1 olarak dedekte etmiştir. Ve dimerleşerek her ikisinde de 719 M/Z' yi göstermiştir.

5.8. SİTOTOKSİTİTE ÇALIŞMALARI

Hizmet alımı kapsamında gerçekleştirilen bu deneme ile elde ettiğimiz zenginleştirilmiş ekstrenin toksikolojisi hakkında bilgi edinip devam çalışmalarının anlamlı olup olmayacağına karar verilmiştir. LC-MS'e gönderilen aynı içerikli numuneler bu analizlerde de kullanılmıştır. Bu çalışma hem standarda hem de numuneye uygulanmıştır. Fare fibroblastı hücre hattına uygulama yapılarak sitotoksitite analiz edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler hücre hatlarına uygulanarak 24 saat 37 C'e % 5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. Numunelerin toksitelerinin belirlenmesi için WST-1 hücre proliferasyonu protokolü uygulandı.

ELİSA okuma sonuçlarına göre aşağıdaki çizelge oluşturuldu. Çizelge 5.2 ve Çizelge 5.3'te ekstreye ve standarda ait canlılık verileri verilmiştir.

Çizelge 5.2. Test numunesine (UE) ait canlılık verileri.

Konsantrasyon (ppm)	Canlılık
Kontrol	100
1	113,83
5	87,5
10	73,22
25	48,45
50	46,15
75	35,43
100	30,4

Çizelge 5.3. Standart numunesine (RA) ait canlılık verileri.

Konsantrasyon (ppm)	Canlılık
Kontrol	100
1	75,3
5	52,07
10	46,23
25	40,75
50	37,2
75	34,39
100	31,07

6. SONUÇ

Son dönemlerde insanlar arasında sağlıklı yaşam ve sağlıklı beslenme konuları dünya çapında önem kazanmıştır. Bu durum hastalık durumlarında modern tıbbın yanı sıra tamamlayıcı tıp olarak tanımlanan alana da yönelmeleri beraberinde getirmiştir. Katkısız, doğal beslenmenin ve paketli olmayan ürünlerin kullanımı giderek artmıştır. Beraberinde hastalık olmadan önce önlem alma bağışıklık güçlendirme amaçlı doğal ve bitkisel ürünlerin kullanımı dünya çapında yaygınlaşmıştır. Fakat bu ilgi beraberinde bilimi taşımadığı zaman geri dönülmez sonuçlara veyahut insan sağlığı üzerinde geri dönülmez sonuçlara sebep olabilmektedir. Bunun yanı sıra ilaç kullanımı sırasında doğal ve bitkisel ürün kullanımı hekim kontrolünde olmazsa ilaç-bitkisel ürün etkileşimi ile farmakodinamik etkileşimler gerçekleşebilmektedir. Sinerjik etki ile ilacın etkileşiminin artmasına veya antagonist etki ile ilacın etkisinin azalmasına sebep olabilmektedir. Bu sebeple uygulanan tedavilerin yarıda kalması ve olumlu sonuç elde edilmemesine neden olmaktadır. Olumlu olması düşünülerek bilinçsizce kullanılan bu ürünlerin yapılmak istenen tedavinin uzamasına veya tam tersi etki ile farklı hastalıklara bile sebep olmaktadır. Zararsız gibi görünen tedavi amacıyla kullanılan doğal ürünlerin; üretim şekilleri kullanım talimatları kullanılacak doz belirlenmesi fazlasıyla önemlidir. Özellikle bilinen bir hastalık varsa ve kullanılan ilaç varsa kesinlikle hekim tavsiyesi dışında bu tip doğal ve bitkisel ürün diye piyasada satılan ürünlerden kullanılmamalıdır.

Bitkisel ürün dediğimiz zaman bir bitkinin veya birkaç bitki kombinasyonunun yaprakları, kökleri veya tohumlarının çeşitli formlarda kullanılması akla gelmektedir. Bitkisel ürünlerin tedavi amacıyla kullanılması çok eski dönemlere dayanmaktadır. Henüz bilimsel bilginin gelişmediği daha çok deneme yanılma ile bitkilerin iyileştirici etkilerinin belirlendiği dönemlerde bile bitkisel ürünler kullanılmaktaydı. Fakat o dönemlerde teknolojinin de tam olarak gelişmediği göz önüne alındığında bitkisel ürün olarak kullanılan ürünler sonrasında meydana gelen hasarlarında o ürünlerden olup olmadığı tam olarak kanıtlanamamaktaydı. Genel olarak gözlenen semptomlar kusma, ishal, bayılma, taşikardi, felç şeklinde olmaktaydı.

Günümüzde bitkisel ürünleri koruyucu ve iyileştirici olarak kullanmada doğal kaynaklı olması sebebiyle zararsız görülmektedir. Bitkinin direkt kullanımı yanı sıra piyasa harici

ve dahili olarak kullanılabilecek bitki ekstreleri bitkisel yağlar da bulunmaktadır. Bu durumlarda etken maddeler daha da zengin hale getirilerek alınmaktadır. Oysa ki tüm faz çalışmalarından geçmiş ilaçların dahil kullanım dozu mevcuttur. Bu sebeple dozu tam olarak belirlenemeyen ve hiçbir test yapılmamış ürünlerin tedavi edici olarak kullanımı son derece sakıncalıdır.

Tüm bunlarla birlikte ‘bitkilerden yararlanarak tedavi mümkün değildir’ savı da tam anlamıyla doğru değildir. Tarihsel gelişim sürecine bakıldığında deneme yanılma dediğimiz kullanımların teknolojinin gelişmesiyle doğruluğu veya yanlışlığı ispatlanabilir durumdadır. Bitkisel kaynaklı faz çalışmalarını tamamlamış hali hazırda ilaç olarak kullanılan tedavi ediciler mevcuttur. Hatta bitkilerden elde edilip ilaç formatında satılan birçok ilacın zehirli bitkilerden üretildiği bilinmektedir. Bunlara bir örnek olarak en yaygın kullanılan yüksük otundan elde edilen kalp glikozitleri içeren ilaç örnek verilebilir. Yüksük otu oldukça zehirli bir bitki olmasına karşın kalp hastalıklarında kullanılan digoxin ilacı bu zehirli bitkiden elde edilmiştir. Fakat pre-klinik ve klinik çalışmaları tamamlanarak ilaç ruhsatına sahip olmuştur. Yani tüm farmakodinamik farmakokinetik özellikleri belirlenmiştir. Hekim tarafından kullanıcıya belirli şartlarda reçete edilebilir ve güvenli bir şekilde kullanılabilir. Buradaki handikaplardan birisi de bu ilaçların saklama koşulları dahil belirlenmiştir fakat doğal ve bitkisel ekstrelerin saklama koşullarına dair veya kontaminasyonlarına dair bilgiler içermemektedir.

Burada önemli olan husus şudur ki; doğal ve bitkisel ürünler de gayet tabi güvenli bir şekilde koruyucu veya tamamlayıcı sağlık uygulamalarında kullanılabilmektedirler. Fakat içeriğinin gelişen teknoloji kullanılarak tam olarak belirlenmesine muhtaçtır. Doğal bitkisel ürün denildiği zaman elde edilecek olan ürünün tüm süreçleri önem arz etmektedir. Örneğin bitkinin botanik açıdan aydınlatılması türünün bitki sistematığına uygun şekilde belirlenmesi sonraki aşamalarda kurutma, saklama koşullarının tam olarak keskin çizgilerle belirlenmesi, ekstre veya yağ üretimi her ne amaçlanmışsa ürün eldesindeki prosesin tam olarak belirlenmesi ve standardizasyonunun yapılması gerekmektedir. Nihai ürün olarak elde ettiğimiz ürünün nitelik ve nicelik açısından tüm testlerinin yapılması ve bu testlerin ve yapan kuruluşların denetlenmesi gerekmektedir. Ürünler sertifikalı olarak uygun saklama koşulları belirlenerek herhangi bir kontaminasyon gerçekleşmeden saklanmaları ve tüketici ile bu şartlarda buluşturulmaları gerekmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında doğal ve bitkisel

ürün gelişen teknoloji ile desteklenerek tarladan-rafa kadar geçen tüm süreçlerde insan sağlığını tehdit edebilecek birincil veya ikincil sebepler içermemelidir. Nihai üründeki etken maddenin miktarı doz belirlenmesi açısından ne kadar birincil öneme sahipse tarlada henüz tohum halindeyken bile tarlaya uygulanan doğal veya sentetik tarım ilaçlarının varlığı, varsa bitkide kalıntı bırakıp bırakmadığına kadar denetimlerinin yapılması da ikincil öneme sahiptir denebilir. Yani bir bitkinin alınıp kaynatılıp içilip tüketilerek sağlığa kavuşulma düşüncesi her zaman masum olmayabilir. Tüm bu çalışmalardan geçmiş ve hekim kontrolünde yapılması her zaman önem atfedecektir. Eğer yine de kişi kendi karar verip kullanmayı tercih edilirse mutlaka denetimleri yapılmış sertifikalı ürünler tercih edilmelidir. Sonuç olarak doğal ürünlerin kullanımında bilimsel bilginin kanıtlanmış verilerin önemi insan sağlığı açısından düşünülenin aksine oldukça önem taşımaktadır.

Biz çalışmamızda tüm bunları göz önüne alarak yıllar boyunca halk arasında dahilen ve haricen kullanılmakta olan adaçayı bitkisi üzerine çalışmış bulunmaktayız Çayı yapılarak içilmek suretiyle iştah acısı, antiseptik, mide bulantısı önleyici, üst solunum yolları hastalıklarında etkisi sebebiyle kullanılmaktadır. Haricen kullanımda ise adaçayı yağı akne problemlerinde, kas eklem ağrılarında, iltihaplı yaralarda masaj yapılarak ciltte uzun süre tutmadan kullanılmaktadır. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz kurumunun internet sitesinde adaçayının *Salvia officinalis* türüne ait bitkisel monograf yer almaktadır. İlaç etkileşimleri, kullanılan kısımları, güvenlikle ilgili uyarılarına yer verilmiştir. Ayrıca *Salvia officinalis* türüne Türkiye Cumhuriyeti olarak onayladığımız Avrupa Farmakopesinin Adaptasyonu olan Türk Farmakopesinde de yer verilmektedir. Bir bitki türünün farmakopelerde bulunması doğal ve bitkisel ürünlerden elde edilen üründe etkin maddelerin özelliklerinin detaylarını içerdiği bilimsel olarak onaylandığının göstergesidir. Çalışmamızda *Salvia officinalis* türünün seçilip daha detaylı çalışmasının yapılmasının amacı bu bitkinin farmakopede onaylı şekilde yer alması sadece halk arasında kullanılıp kulaktan dolma bilgiler içermemesidir. *Salvia officinalis*'in içerdiği etken madde olan rosmarinik asidin zenginleştirilerek izole edilmesi amaçlanmıştır. Yani gelen hatlarıyla hali hazırda etkinliği belirlenen bitkinin etken maddesinin elde edilmesi ve bu etkenin ileriki çalışmalarda aktivitesinin belirlenmesi planlanmıştır.

Adaçayı bitkisinin seçilmesinin sebeplerinde birisi de Düzce bölgesinde kolaylıkla yetiştirilebilmesidir. Yaptığımız çalışmalarda adaçayının uçucu yağlarının ithalat ve

ihatacatları yapılarak çoğunlukla kullanıma açıldığı görülmüştür. Adaçayı uçucu yağı kullanımı açısından elde edilmesindeki zorluğa karşın kullanım alanlarının etkinliğine bakıldığında oldukça değerli bir üründür. Fakat yaptığımız detaylı literatür çalışmasında adaçayının posasında kalan ürünlerinin de son derece önemli etken maddeler içerdiği ve bu etken maddelerinde aktarlardan adaçaylarının alınıp çayı demlenerek genellikle bu etkenlerin antioksidan özelliklerinden yararlanıldığı görülmüştür. Fakat bunun yanı sıra kafeik asitin bir esteri olan rosmarinik asit etken maddesinin miktarca fazla olduğu ve bu etken madde incelendiğinde yurtdışında droglarının dahil kullanıldığı fakat ülkemizde bu etken madde üzerine çalışma sayısının azlığı tespit edilmiştir.

Adaçayı üretimi ile ilgili yapılan 2022 yılına ait fizibilite raporu detaylıca incelenmiştir. 2019 yılında 5.602 dönüm arazide dikimi yapılan adaçayından 1.233 ton bitki üretilmiştir. Bir dönümde 220 kg verim elde edilmiştir. Bölüm 2’de de bahsedildiği Düzce ilinde ise 45 dönüm ekim yapılmış ve 5 ton üretimin yanı sıra dönüm başına ortalama 111 kg verim elde edildiği not edilmiştir. Türkiye ekolojik açıdan farklı iklim çeşitlerine sahip bir bölge olması açısından birçok ürünün yetiştirilmesinin kolay olduğu bir ülkedir. Adaçayı bitki ve yağ ihracat ve ithalat miktarlarına bakıldığında 25.4 ton ihracat yapılırken, 0.67 ton ithalat yapıldığı ortaya konmuştur. İhracat verilerinde 6,94 ton bitkisel çay iken 18,4 ton adaçayı yağı olduğu belirlenmiştir. İthalat verilerinde ise 0,11 ton bitkisel çay ve 0,56 ton adaçayı veri tablosunda işlenmiştir. Bu sonuç göstermektedir ki adaçayı yağına talep artmıştır. Bu talep artışı ile adaçayı yağı üretimi ile bitki posası oluşumu ortaya çıkmıştır.

Bu bilgiler ışığında bizim çalışmalarımızın asıl amacı da adaçayı yağı sonrası kalan posaya yönelmemizi bu posanın değerlendirilmesi olmuştur. Bu çalışma Lamiacea familyasında yüksek miktarlarda bulunan rosmarinik asit etken maddesinin salvia officinaliste de fazla miktarda bulunması ve posanın atılması ise değerli bir sekonder metabolit olan etken maddenin atık olarak atılmadan nasıl değerlendirilebileceği üzerine başlangıç çalışması niteliği taşımaktadır.

Adaçayı yapraklarından elde edilen sekonder metabolitlerin mayıs-haziran ve ekim-kasım aylarında yapılan hasatlarda elde edildiği literatürde rastladığımız bilgilerdendi. Biz bu çalışmada adaçayı hasadımızı haziran ayında gerçekleştirdik. Yapılan tüm analizler sonucu rosmarinik asit eldesinde saflığı yüksek zenginleştirilmiş rosmarinik asit adaçayı yapraklarından elde edilmiştir. Başlangıç çalışmalarına bakıldığında aseton ve etanol çözücülerine göre tüm denemelerde etanol ile daha fazla miktarda rosmarinik

asit elde edildiği gözlenmiştir. Ekstraksiyon sürelerine bakıldığında 24 saat boyunca süren çalışmaların her iki çözücünde de fazla olduğu saptanmıştır. Klasik çözücü ekstraksiyonu ile ultrasonik banyo destekli ekstraksiyon karşılaştırıldığında her iki çözücünde de ultrasonik banyo sonucu elde edilen ekstrede en fazla miktarda rosmarinik asit elde edilmiştir. Kendi aralarında kıyaslandığında ise etanolle yapılan denemenin ultrasonik banyo destekli ekstraksiyoda fazla bulunduğu yapılan analiz ile kıyaslanmıştır. Bunların yanı sıra klevenger aparatı ile kurulan düzenekte kalan bitkisel materyalden elde edilen rosmarinik asit miktarının ise ultrasonik destekli ekstraksiyona yakın olduğu saptanmıştır. Devamında yapılan aktif karbon uygulaması çalışmasında ise aktif karbonun organik yapılı etken maddemiz olan rosmarinik aside de bir miktar adsorbladığı gözlenmiştir. Fakat bunun yanı sıra HPLC verilerinde rosmarinik asite ait pik saflığının tüm denemelerde aktif karbonsuz denemelere göre arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak rosmarinik asit miktarı düşerken pik saflığımızın arttığı gözlenmiştir.

Farklı ekstraksiyon metotları ile belirlenen en uygun yöntem ve flaş kromatografisi öncesi denenen metotlar kıyaslandığında her metodun kendine has önemli noktaları belirlendi. Etanol ile ve ultrasonik banyo ile yapılan denemelerden olumlu sonuçlar elde edilirken, pH ayarlanması ile elde edilen çalışmalardan da yüksek miktarlar elde edildi. Fakat bu denemelerde rosmarinik asit tek başına değil yanında farklı maddelerle elde edildi.

Çizelge 4.1 detaylı şekilde gösterilen veriler incelendiğinde *Salvia officinalis* bitkisinden rosmarinik asit eldesi için yapılan çalışmalar kapsamında en uygun çözücü etanol en uygun metot da ultrasonikasyon olarak belirlendi. Fakat bizim asıl amacımız posanın değerlendirilmesi olduğunu göz önünde bulundurursak yine Çizelge 4.1 incelendiğinde posadan elde edilen etken maddenin miktar olarak kayda değer şekilde yüksek olduğu görülmüştür.

Adaçayı yağı üretimi yapan gerçek üreticilerle görüşüldüğünde yağ üretimi sonrası kalan posa ve sulu fazın farklı alanlarda değerlendirildiği veya atıldığı öğrenilmiştir. Örneğin bir firma kalan posanın tarlalarda yabancı otların çıkmasını engellemek amacıyla tekrar bitkilerin altlarına koyulduğundan bahsetmiştir. Başka bir üretici bu posanın kurutularak tağşiş olarak yeni hasat edilen ürünlerle birleştirildiğinden bahsetmiştir. Yine yapılan görüşmeler sonrasında bir üretici sulu kısmın tekrar sulama amacıyla kullanıldığından bahsetmiştir. Yapılan görüşmeler sonucu öğrenilen bir diğer bilgi ise bitkinin yağı alındıktan sonra hayvan yemi olarak kullanıldığı yönündedir. Tüm

bu görüşmeler sonucu gerçek üreticiden aldığımız cevaplarla daha etkili alanlarda kullanılabilecek bir ürün varlığının tespit edildiğini düşünmekteyiz. Gerek üretimi konusunda ülkemizdeki iklim şartlarının elverişliği gerekse adaçayı bitkisinde var olan rosmarinik asit etken maddesinin önemli bir fitokimyasal olduğunun farmaknozi yaklaşımıyla literatürde doğrulandığından adaçayı bitkisinden katma değeri yüksek bir ürün elde edilebileceği görülmüştür. Bu çalışma kapsamında adaçayı bitkisinden çeşitli ekstraksiyonlar denenerek ve sonrasında flaş kromatografisi uygulanarak zenginleştirilmiş rosmarinik asit elde edilmiştir. Elde edilen etken madde, ticari olarak satın alınan etken maddesi ile hücre kültürü ortamında sitotoksitite testi yapılmak kaydıyla çalışılmıştır. Yapılan in-vitro çalışmalarda ticari rosmarinik asitin 5 ppm'e kadar, elde ettiğimiz ekstrenin ise 10 ppm'e kadar sitotoksik özellik göstermediği saptanmıştır. Rosmarinik asit üzerine literatürde *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar mevcuttur. Bu elde edilen ekstrenin bu tarz çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.



7. KAYNAKLAR

- [1] N. Chintoju, P. Konduru, R. L. Kathula, R. Lakshmi Kathula, and R. Remella, "Importance of natural products in the modern history" *Research and Reviews: Journal of Hospital and Clinic* c 1, sayı 1, ss 5-10, 2015.
- [2] H. Wagner, "Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st century: New developments and challenges," *Pure and Applied Chemistry*, c. 77, sayı. 1, ss. 1–6, 2005.
- [3] Bayat A.H., 2016, *Tıp Tarihi*, (1.Basım) İstanbul, Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği Yayınevi.
- [4] S. Demirci Kayıran, "Dioskorides'in de materia medica adlı eserindeki tıbbi bitkilerin doğu akdeniz'de günümüzdeki kullanımlarının araştırılması," *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, c. 9, sayı. 2, ss. 189–202, 2019.
- [5] N. Aydoğan, Y. Balcı, M. Özcan, and D. Akpınar, "Knidos tıp okulu'ndan günümüz tıp okuluna," *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi*, c. 9, sayı. 1, ss. 87–90, 2022.
- [6] K. Arıhan Seda, "Antik dönemde tıp ve bitkisel tedavi," Yüksek lisans tezi, Arkeoloj, Bölümü, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2003.
- [7] G. Tümer. (1992). "*Bîrûnî*", TDV İslâm Ansiklopedisi, [Online]. Erişim: <https://islamansiklopedisi.org.tr/biruni>
- [8] M. Hamidullah. (1992). *Dineveri Ebu Hanife* [Online]. Erişim: <https://islamansiklopedisi.org.tr/dineveri-ebu-hanife>
- [9] M. Kaya. (1992). "*Razi Ebu Bekir*" [Online]. Erişim: <https://islamansiklopedisi.org.tr/razi-ebu-bekir>
- [10] C. Yılmaz "Osmanlılarda ilaç yapımında kullanılan tıbbî bitkiler [medical plants used for making medicine in the ottomans], *Osmanlılarda Sağlık* c.1, ss. 231-247, İstanbul, 2006.

- [11] D. A. Dias, S. Urban, and U. Roessner, "A historical overview of natural products in drug discovery," *Metabolites*, c. 2, sayı. 2, ss. 303–336, 2012.
- [12] M.S. Butler "The role of natural product chemistry in drug discovery". *Journal of Natural Product*, c.67, s 12, ss 2411, 2004.
- [13] P.M. Dewick, 2002 *Medicinal Natural Product A Biosynthetic Approach*, c 3, ss. 150-154, United Kingdom, Wiley.
- [14] R. A. Maplestone, M. J. Stone, and D. H. Williams, "The evolutionary role of secondary metabolites-a review (Antibiotic resistance; pleiotropic switching; gene clusters; spores; natural products; biosynthesis)," *Gene*, c. 115, ss. 151–157, 1992.
- [15] Ö. Demir, Tuğba Akpınar, "Biological Activities of Phytochemicals in Plant," *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, c. 8, sayı. 11, ss. 2300–2306, 2020.
- [16] S. B. Akin and M. Sezgin, "Sekonder metabolitler," in *3rd International Euroasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EuroAsian BioChem 2020)*, 2020, ss. 832–836.
- [17] Y. Dundar, "Fitokimyasallar ve Sağlıklı Yaşam," *Kocatepe Tıp Dergisi*, c. 2, ss. 131–138, 2001.
- [18] F. Schottroff, T. Lasarus, M. Stupak, J. Hajslova, T. Fauster, and H. Jäger, "Decontamination of herbs and spices by gamma irradiation and low-energy electron beam treatments and influence on product characteristics upon storage," *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, c. 14, sayı. 1, ss. 380–395, 2021.
- [19] T. M. Takeuchi and C. G. Pereira, "Low-Pressure Extraction (Solid – Liquid Extraction , Microwave Assisted , and Ultrasound Assisted) from Condimentary Plants," *Extracting Bioactive Compounds for Food Products*, ss. 137–218, 2009.
- [20] E. S. Ong, "Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations," *Journal of Chromatography B: Analytical Techsayilogies in the Biomedical and Life Sciences*, c.. 812, sayı. 1-2, ss. 23–33, 2004.
- [21] Q. W. Zhang, L. G. Lin, and W. C. Ye, "Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review," *Chinese Medicine (United Kingdom)*, c. 13, sayı. 1, ss. 1–26, 2018.

- [22] S. Kongkiatpaiboon and W. Gritsanapan, "Optimized extraction for high yield of insecticidal dihydrostemofoline alkaloid in *Stemona collinsiae* root extracts," *Industrial Crops and Products*, c.. 41, sayı. 1, ss. 371–374, 2013.
- [23] Y. Murat, "Gıda Biyoteknolojisinde aroma maddelerinin süperkritik akışkan yöntemiyle ekstraksiyonu," *Gıda* c.. 30, sayı. 4, ss. 269–271, 2005.
- [24] L. Wang and C. L. Weller, "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants," *Trends in Food Science and Technology*, c.. 17, sayı. 6, ss. 300–312, 2006.
- [25] V. Mandal, Y. Mohan, and S. Hemalatha, "Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research," *Pharmacognosy Reviews*, c.. 1, sayı. 1, ss. 7–18, 2007.
- [26] J. Azmir *et al.*, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review," *Journal of Food Engineering*, c.. 117, sayı. 4, ss. 426–436, 2013.
- [27] Y. Y. Zhao, S. Q. Zhang, F. Wei, Y. M. Fan, F. Sun, and S. Bai, "Quality control of natural product medicine and nutrient supplements 2014," *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, c.. 2014.
- [28] Ş. Kalkan, "Bitkisel Ürünlerle Tedavilerde İlaç Etkileşimleri," *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, c. 31, sayı. 1, ss. 41–50, 2017.
- [29] [Online]. Erişim: <https://www.titck.gov.tr/faaliyetalanlari/gbtusorular>
- [30] M. Insider, M. Plants, and A. Plants, "Medicinal and Aromatic Plant," sayı.5 February, 2015.
- [31] WHO, "Quality control methods for medicinal plant materials World Health Organization Geneva," *Who*, 1998.
- [32] A. G. Atanasov *et al.*, "Natural products in drug discovery: advances and opportunities," *Nature Reviews Drug Discovery*, c.. 20, sayı. 3, ss. 200–216, 2021.
- [33] C. Veeresham, "Natural products derived from plants as a source of drugs," *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, c. 3, sayı. 4, ss. 200–201, 2012.

- [34] M. Ganzera and A. Muraier, "Separation of natural products", *Supercritical Fluid Chromatography* Elsevier Inc., ss:438-460, 2017.
- [35] A. V. B. Reddy, M. Moniruzzaman, V. Madhavi, and J. Jaafar, "Recent improvements in the extraction, cleanup and quantification of bioactive flavonoids," *Studies in Natural Products Chemistry* c. 1, sayı. 66, ss. 197-223. Elsevier B.V., 2020.
- [36] J. L. Wolfender, "HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue Author," *Planta Medica*, c.. 75, sayı. 7, ss. 719-734, 2009.
- [37] D. R. McMullin, S. Hoogstra, K. P. McDonald, M. W. Sumarah, and J. B. Renaud, "Natural Product Discovery with LC-MS/MS Diagnostic Fragmentation Filtering: Application for Microcystin Analysis," *Journal of Visualized Experiments*, c. 2019, sayı. 147, ss. 1-6, 2019.
- [38] S. Patel, A. Raulji, D. Patel, D. Panchal, M. Dalwadi, and U. Upadhyay, "A review on 'uv visible spectroscopy,'" *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, c.. 7, sayı. 5, p. 1151, 2022.
- [39] A. Windarsih, A. Rohman, Irnawati, and S. Riyanto, "Comprehensive review on application of ftr spectroscopy coupled with chemometrics for authentication analysis of fats and oils in the food products," *International Journal of Food Science*, c.2, ss. 1-28, 2021.
- [40] R. Bahtiyarca Bağdat, "Tıbbı ve aromatik bitkilerin kullanım alanları tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) ve ülkemizde kekik adıyla bilinen türlerin yetiştirilme teknikleri," *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, c.. 15, sayı. 1-2, ss. 19-28, 2006.
- [41] A. İ. Pek, "Türkiye florasında bulunan salvia türleri ve tehlike durumları," *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, c.. 19, sayı. 1-2, ss. 30-35, 2010.
- [42] A. Fatma, "Adaçayı Fizibilite Raporu ve Yatırımcı Rehberi," ss. 26-30, 2020.
- [43] M. Beheshti-Rouy, M. Azarsina, L. Rezaie-Soufi, M. Y. Alikhani, G. Roshanaie, and S. Komaki, "The antibacterial effect of sage extract (*Salvia officinalis*) mouthwash against *Streptococcus mutans* in dental plaque: A randomized clinical trial," *Iranian Journal of Microbiology*, c. 7, sayı. 3, ss. 173-177, 2015.
- [44] E. Kayalar, "Salvia officinalis l. (tıbbi adaçayı)'in farmasötik botanik özellikleri ve hızlı üst çene genişletmesinde yeni kemik yapımı üzerine etkisinin ın vivo

olarak incelenmes,” Anadolu Üniversitesi, 2019.

- [45] G. Y. Salman, “The Effect Of Sage (*Salvia Officinalis*), Oregano (*Origanum Vulgare*), And Peppermint (*Mentha Piperita*) Essential Oils On Growth Performance And Intestinal Microbial Population Of Quail,” Erciyes Üniversitesi, 2014.
- [46] N. S. L. Perry *et al.*, “A randomised double-blind placebo-controlled pilot trial of a combined extract of sage, rosemary and melissa, traditional herbal medicines, on the enhancement of memory in normal healthy subjects, including influence of age,” *Phytomedicine*, c. 39, ss. 42–48, 2018.
- [47] M. Amirhosseini, M. Dehghan, P. Mangolian Shahrabaki, and H. Pakmanesh, “Effectiveness of Aromatherapy for Relief of Pain, Nausea, and Vomiting after Percutaneous Nephrolithotomy: A Randomized Controlled Trial,” *Complementary Medicine Research*, c.. 27, sayı. 6, ss. 440–448, 2020.
- [48] Y. Sharma, J. Fagan, and J. Schaefer, “Ethnobotany, phytochemistry, cultivation and medicinal properties of Garden sage (*Salvia officinalis* L.) Yashaswini,” c.. 8, sayı. 3, ss. 3139–3148, 2019.
- [49] S. A. Çelik, İ. Ayran, A. Kan, and Y. Kan, “Essential oil yield and compositions of sage (*Salvia Officinalis* L.) cultivated in different province of Turkey,” *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*, c.. 2, sayı. Special 1, ss. 193–195, 2018.
- [50] Z. M. Cai *et al.*, “1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application,” *Journal of Asian Natural Products Research*, c.. 23, sayı. 10, ss. 938–954, 2021.
- [51] A. Raal, A. Orav, and E. Arak, “Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries,” *Natural Product Research*, c.. 21, sayı. 5, ss. 406–411, 2007.
- [52] Y. Lu and L. Foo, “Polyphenolic in *Salvia*,” *Phytochemistry*, c.. 59, ss. 117–140, 2002.
- [53] H. Marzag, P. Warnault, K. Bougrin, N. Martinet, and R. Benhida, *Natural polyphenols as potent inhibitors of DNA methyltransferases*, 1st ed., c.. 41. Elsevier B.V., 2014.
- [54] G. P. P. Kamatou, W. Chen, and A. M. Viljoen, “Quantification of Rosmarinic

acid in *Salvia* species indigenous to South Africa by HPTLC,” *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, c.. 25, sayı. 5, ss. 403–408, 2012.

- [55] E. Trócsányi, Z. György, and É. Zámoriné-Németh, “New insights into rosmarinic acid biosynthesis based on molecular studies,” *Current Plant Biology*, c.. 23, sayı.7, ss 100162, 2020.
- [56] S. K. S. Amoah, L. P. Sandjo, J. M. Kratz, and M. W. Biavatti, “Rosmarinic Acid - Pharmaceutical and Clinical Aspects,” *Planta Medica*, c. 82, sayı. 5, ss. 388–406, 2016.
- [57] J. Lee, E. Jung, J. Koh, Y. S. Kim, and D. Park, “Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis,” *Journal of Dermatology*, c.. 35, sayı. 12, ss. 768–771, 2008.
- [58] Y. L. Ngo, C. H. Lau, and L. S. Chua, “Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential,” *Food and Chemical Toxicology*, c.. 121, sayı. June, ss. 687–700, 2018.
- [59] A. B. Ramos-Hryb, M. P. Cunha, M. P. Kaster, and A. L. S. Rodrigues, *Natural Polyphenols and Terpenoids for Depression Treatment: Current Status*, c.. 55. 2017.
- [60] S. S. Handa, “An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants,” *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.*, no. January 2008, p. 25, 2008.
- [61] M. Shekarchi, H. Hajimehdipoor, S. Saeidnia, A. R. Gohari, and M. P. Hamedani, “Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family,” *Pharmacognosy Magazine*, c.. 8, no. 29, ss. 37–41, 2012.
- [62] H. Guan *et al.*, “A Comprehensive Review of Rosmarinic Acid: From Phytochemistry to Pharmacology and Its New Insight,” *Molecules*, c.. 27, sayı. 10, ss. 1–28, 2022.
- [63] C. H. Lau, L. S. Chua, C. T. Lee, and R. Aziz, “Optimization and Kinetic Modeling of Rosmarinic Acid Extraction from *Orthosiphon stamineus*,” *Current Bioactive Compounds*, c.. 10, no. 4, ss. 271–285, 2015.
- [64] M. Jacotet-Navarro, N. Rombaut, A. S. Fabiano-Tixier, M. Danguien, A. Bily, and F. Chemat, “Ultrasound versus microwave as green processes for extraction of rosmarinic, carnosic and ursolic acids from rosemary,” *Ultrasonics Sonochemistry*, c.. 27, ss. 102–109, 2015.

- [65] I. Bettaieb Rebey *et al.*, “Ripening Stage and Extraction Method Effects on Physical Properties, Polyphenol Composition and Antioxidant Activities of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Seeds,” *Plant Foods for Human Nutrition*, c.. 69, no. 4, ss. 358–364, 2014.
- [66] T. Liu *et al.*, “Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*,” *Journal of Chromatography A*, c. 1218, no. 47, ss. 8480–8489, 2011.
- [67] C. N. A. N. Che Mansor, J. Latip, and M. Markom, “Preparation of Orthosiphon stamineus enriched-extracts and evaluation of their free radical scavenging activity,” *AIP Conference Proceedings*, c. 1784, 2016.
- [68] A. Chatterjee, S. Tandon, and A. Ahmad, “Comparative extraction and downstream processing techniques for quantitative analysis of rosmarinic acid in *rosmarinus officinalis*,” *Asian Journal of Chemistry*, c.. 26, no. 14, ss. 4313–4318, 2014.
- [69] J. Baranauskaite *et al.*, “Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites* L., *Origanum vulgare* spp. *hirtum* and *Origanum vulgare* L.),” *Natural Product Research*, c.. 30, no. 6, ss. 672–674, 2016.
- [70] G. Peev, P. Penchev, D. Peshev, and G. Angelov, “Solvent extraction of rosmarinic acid from lemon balm and concentration of extracts by nanofiltration: Effect of plant pre-treatment by supercritical carbon dioxide,” *Chemical Engineering Research and Design*, c.. 89, no. 11, ss. 2236–2243, 2011.
- [71] E. L. Bakota, J. K. Winkler-Moser, M. A. Berhow, F. J. Eller, and S. F. Vaughn, “Antioxidant Activity and Sensory Evaluation of a Rosmarinic Acid-Enriched Extract of *Salvia officinalis*,” *Journal of Food Science*, c.. 80, no. 4, ss. C711–C717, 2015.
- [72] F. Ebru K, A. A, and C. K, “Extraction and HPLC Analysis of Sage (*Salvia officinalis*) Plant,” *Natural Products Chemistry & Research*, c.. 05, no. 08, ss. 8–10, 2017.
- [73] K. B. De Oliveira and B. H. De Oliveira, “HPLC/DAD determination of rosmarinic acid in *Salvia officinalis*: Sample preparation optimization by factorial design,” *Journal of the Brazilian Chemical Society*, c.. 24, no. 1, ss. 85–91, 2013.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Elif Sine DÜVENÇİ

Yabancı Dili : İngilizce

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler	Düzce Üniversitesi	2023
Y. Lisans	Kimya	Düzce Üniversitesi	2017
Lisans	Kimya.	Gazi Üniversitesi	2012
Lise	Matematik-Fen	Arsal Anadolu Lisesi	2007

YAYINLAR

Sibel Bayıl Oğuzkan, Serpil Uğraş, **E. Sine Aksoy**, Sultan Ülger, Şebnem Üzmez, Bora Karagül and Halil İbrahim Uğraş ‘Biological Activity Analysis of Hazelnut Nutshell Extracts’ KSÜ Doğa Bil. Derg., Vol. 4, No. 5 (2016): 481-485

S. Bayıl Oğuzkan, S. Uğraş, **E. S. Aksoy**, S. Ülger, Ş. Üzmez, B. Karagül & H. İ. Uğraş, “Biological Activity Analysis Of Hazelnut Nutshell Extracts,” *International Journal of Chemical and Natural Science*, 2016, 2347-6672, 4, 5, 481-485

Sibel Bayıl Oğuzkan, Bora Karagül, **Elif Sine Aksoy**, Ayşe Uzun, Merve Can, Hasibe Yılmaz, Halil İbrahim Uğraş, Burcu Binici and Ahmet C.Goren, “Determination Of Taxanes By Validated LC-MS/MS Method In

Hazelnut Collected From Different Regions And Altitudes İn Turkey,” *J. Chem.Metrol.* 12:1 (2018) 26-33

Sibel Bayıl Oğuzkan, Şeref Karadeniz, Bora Karagül, Ayşe Uzun, **Elif Sine Aksoy**, Özen Özensoy Güler, Ümit Çakır and Halil İbrahim Uğras, “Effects of Some Adsorbents on the Pre-purification of Taxol (Anticancer Drug) from Hazelnut Nutshells.” *International Journal of Pharmacology*, 2018, 14 : 835-840.

