



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ORMANCILIK VE ÇEVRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

ORMAN ALTI BİTKİLERİNDEN *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus*
BİTKİSİNDE UÇUCU YAĞLARIN KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ; BETA PİNEN'İN 2,4-
DİNİTROBENZENSÜLFENİL KLORÜR İLE KATILMA TEPKİMESİ VE
ANTIÖKSİDAN-RADİKAL GİDERİCİ AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinan ÖZTÜRK

ŞUBAT 2015

GÜMÜŞHANE

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORMANCILIK VE ÇEVRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

ORMAN ALTI BİTKİLERİNDEN *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus*
BİTKİSİNDE UÇUCU YAĞLARIN KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ; BETA PİNEN'İN 2,4-
DİNİTROBENZENSÜLFENİL Klorür İLE KATILMA TEPKİMESİ VE
ANTIÖKSİDAN-RADİKAL GİDERİCİ AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sinan ÖZTÜRK

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
“Ormancılık ve Çevre Bilimleri Anabilim Dalı”
Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22.01.2015

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 05.02.2015

ŞUBAT 2015



KABUL VE ONAY



Yrd. Doç. Dr. Afşin Ahmet KAYA danışmalığında **Sinan ÖZTÜRK** tarafından hazırlanan **“ORMAN ALTI BİTKİLERİNDEN *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* BİTKİSİNDE UÇUCU YAĞLARIN KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ; BETA PİNEN’İN 2,4-DİNİTROBENZENSÜLFENİL KLORÜR İLE KATILMA TEPKİMESİ VE ANTİOKSİDAN-RADİKAL GİDERİCİ AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ”** isimli bu çalışma jürimiz tarafından Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Ormancılık ve Çevre Bilimleri** Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak Oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman

:

Yrd. Doç. Dr. Afşin Ahmet KAYA

Üye

:

Doç. Dr. Osman ÜÇÜNCÜ

Üye

:

Doç. Dr. Elif ÇELENK KAYA

ONAY

Bu tez 15.4.2015 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ormancılık ve Çevre Bilimleri Anabilim Dalı'nda, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlamış olduğum “ORMAN ALTI BİTKİLERİNDEN *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* BİTKİSİNDE UÇUCU YAĞLARIN KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ; BETA PİNEN'İN 2,4-DİNİTROBENZENSÜLFENİL Klorür İLE KATILMA TEPKİMESİ VE ANTİOKSİDAN-RADİKAL GİDERİCİ AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ” isimli tez çalışmasında; bütün bilgi ve belgeleri genel akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 22/01/2015


Sinan ÖZTÜRK

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ORMAN ALTI BİTKİLERİNDEN *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus*
BİTKİSİNDE UÇUCU YAĞLARIN KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ; BETA PİNEN'in 2,4-
DİNİTROBENZENSÜLFENİL KLORÜR İLE KATILMA TEPKİMESİ VE
ANTİOKSİDAN-RADİKAL GİDERİCİ AKTİVİTE ÖLÇÜMLERİ**

Sinan ÖZTÜRK

Gümüşhane Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Ormancılık ve Çevre Bilimleri Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Afşin Ahmet KAYA

2015, 53 sayfa

Bu çalışmanın birinci kısmında *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinin uçucu yağının kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal aktiviteleri incelendi. Uçucu yağlar su buharı destilasyonu yöntemi ile bitkinin tüm kısımlarından elde edilerek GC-FID ve GC-MS yöntemi ile analiz edildi. Bitkiden elde edilen toplam yağın %99.46' sını içeren 31 adet bileşiğin yapısı aydınlatıldı. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisindeki ana bileşenler, 1H-Inden, 2,3-dihydro-5-metil- (%25.137), α -Kubeben (%19.27), 1-Hekzadeken (%15.59), n-Hekzadekanoik asit (%12.14) olarak

belirlendi. Bitkiden izole edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri de incelendi. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *Grandiflorus* bitkisine ait uçucu yağın *B. cereus*, *E. coli*, *E.coli* O157:H7 ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlendi. Aynı zamanda *Sac. cerevisiae* ve *C. albicans* cinsi mayalar üzerinde de etkili olduğu tespit edildi.

Çalışmanın ikinci kısmında ise, β -pinen başlangıç bileşiğinin 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür bileşiği ile oda sıcaklığında katılma tepkimesi gerçekleştirildi. Tepkime sonucu elde edilen yeni terpen türevi bileşiklerinin izolasyon çalışması başladı. Uzun çalışmalar sonucu üç farklı reaksiyon ürünü saf olarak elde edildi. Yeni bileşiklerin yapıları NMR, IR, kütle spektral verileri ve elementel analiz teknikleri kullanılarak spektroskopik yöntemlerle belirlendi. Yapılan çalışmada beta pinenin iskelet düzenlenmesi (Wagner-Meerwein) sonucu katılma ürünleri verdiği anlaşıldı. Ayrıca elde edilen üç yeni bileşiğin antioksidan ve radikal giderici etkilerinin ölçümleri yapıldı. Ölçümlerin sonuçlarına sentezlenen üç bileşiğinde antioksidan etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, Antioksidan-Radikal giderici aktivite ölçümleri, β -pinen, 2,4- Dinitrobenzen sülfenil klorür, GC/MS, GC/FID, *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus*, Uçucu yağ, Wagner meerwein düzenlenmesi.

ABSTRACT

MS THESIS

CHEMICAL COMPOUNDS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS IN THE *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* THAT IS ONE OF THE PLANTS UNDER GROWTHS ; ADDITION REACTION OF BETA PINEN WITH DINITROBEZENE SULFENYL CHLORIDE, MEASURES OF ANTIOXIDANT AND RADICAL REMOVING EFFECTS.

Sinan ÖZTÜRK

Gümüşhane University

The Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Forestry and Environmental Science

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Afşin Ahmet KAYA

2015, 53 pages

In the first part of this study, chemical compositions and antimicrobial activities of essential oil of *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* plants' were investigated. Essential oil was obtained from the all parts of the plant by hydrodistillation and analyzed by GC-FID and GC-MS. 31 components representing 99.46% of the total oils were characterized. The main components of these species were found to be 1H-Indene, 2,3-dihydro-5-methyl- (%25.137), α -Cubebene (%19.27), 1-Hexadecene (%15.59), n-Hexadecanoic acid (%12.14) from *Rhinanthus angustifolius* subsp. *Grandiflorus*. The antimicrobial activity of the isolated essential oil of the plant was also investigated.

Grandiflorus against B. cereus, E. coli, E.coli O157:H7 ve S. Aureus microorganisms. In addition to that, effect on ferments of B. cereus, E. coli, E.coli O157:H7 ve S. Aureus was detected.

In the second part of this study, the addition reaction of starting material of β -pinen with dinitrobenzene sulfonyl chloride was carried out in the room temperature. The new terpen's derivatives that obtained from the result of reaction was isolated. In the result of long studies, three different reaction productions were obtained purely. Chemistry of new compositions was defined by the spectroscopic methods by using NMR, IR, mass spectral data and elemental analysis techniques. In the study, the result showed that β -pinen gives additional products with the effect of skeletal arrangement. Besides, new three compound antioxidant and radical removing effects measures were made. The result of measurements is three synthesized compound have possessess antioxidant effect.

Keywords : Antimicrobial activity, Measures of antioxidant-radical removing effects, β -pinen, 2,4- Dinitrobenzene sulfonyl chloride, GC/MS, GC/FID *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus*, Arrangement, Essential oil, Wagner-Meerwein regulation.

TEŞEKKÜR

Tezin konusunun seçiminde, uygulamasında ve çalışmamda yardımlarını esirgemeyen danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Afşin Ahmet KAYA' ya, sentez çalışmalarında yardımcı olan sayın Doç. Dr. Elif ÇELENK KAYA' ya, bitki uçucu yağ çalışmalarında yardımcı olan sayın Doç. Dr. Osman ÜÇÜNCÜ' ye, Yrd. Doç. Dr. Cemalettin BALTACI'ya, antioksidant-radikal giderici ölçümlerinde yardımcı olan sayın Yrd. Doç. Dr. S.Beyza Ö.SARIKAYA'ya, antimikrobiyal aktivite ölçümlerinde yardımcı olan sayın Arş. Gör. Şeyda Merve İLTER'e, tüm çalışmalarım boyunca desteğini hiç esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Sinan ÖZTÜRK
Gümüşhane, 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. GİRİŞ.....	1
1.2. Uçucu yağlar.....	1
1.3. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri	2
1.3.1. Destilasyon	3
1.3.2. Sıkma.....	4
1.3.3. Çözücü Ekstraksiyonu	4
1.3.4. Yağ Ekstraksiyonu (Anfloranj)	5
1.3.5. Karbondioksit Ekstraksiyonu	5
1.3.6. Hidrodifüzyon / Süzme.....	6
1.4.. Uçucu Yağların Biyolojik Etkinlikleri ve Kullanım Alanları	6
1.5. Terpenler.....	8
1.6. 2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın Katılma Tepkimeleri.....	13
1.7. Spektroskopik Yöntemler	15
1.8. Kromatografi	16
1.9. Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1. Enstrümantasyon	19
2.2. Bitki Materyalleri	20
2.3. Uçucu Yağların İzolasyonu	20
2.4. Bileşenlerin Aydınlatılması	20
2.5. Antimikrobiyal Aktiviteleri	21

2.6.	β - pinen(18)'e 2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın Katılma Tepkimesi.....	22
2.7.	Antioksidan Ve Radikal Giderici Aktivite Ölçümleri.....	23
2.7.1.	1,2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali giderme aktivitesi.....	23
2.7.2.	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikalleri giderme aktivitesi:.....	24
2.7.3.	N,N'-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD)radikali giderme aktivitesi	24
2.7.4.	Fe^{3+} - Fe^{2+} indirgeme kapasitesi	24
2.7.5.	Ferröz İyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi.....	25
3.	BULGULAR	26
4.	TARTIŞMA.....	35
5.	SONUÇLAR.....	46
6.	KAYNAKLAR.....	47
7.	EKLER	54
	ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	İzopren yapısı.....	8
Şekil 1.2.	Asiklik Monoterpenler.....	9
Şekil 1.3.	Monosiklik Monoterpenler.....	10
Şekil 1.4.	Bisiklik Monoterpenler	10
Şekil 1.5.	Seskiterpenler.....	12
Şekil 1.6.	Diterpenler.....	12
Şekil 1.7.	Triterpenler.....	13
Şekil 1.8.	Olefinlere 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın katılması.....	13
Şekil 1.9.	2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (26) bileşiğinin sitiren (27) ve p-substitue sitiren (28) olan katılma reaksiyonları.....	14
Şekil 1.10.	2,4-dinitrobenzensülfenil klorür (26) bileşiğinin siklohekzen (29) ile olan katılma reaksiyonu.....	14
Şekil 1.11.	α -Pinen (17)'nin iskelet yapısındaki dörtlü halkada meydana gelen düzenlenmeler.....	15
Şekil 2.1.	GC-MS cihazı.....	19
Şekil 2.2.	<i>Rhinanthus angustifolius</i> subsp. <i>grandiflorus</i>	20
Şekil 2.3.	Clevenger tipi subuharı destilasyon düzeneği.....	22
Şekil 2.4.	Klasik Yaklaşımla Katılma Tepkimesi Şeması.....	23
Şekil 3.1.	<i>Rhinanthus angustifolius</i> subsp. <i>grandiflorus</i> bitkisinden elde edilen bileşiklerin kimyasal yapıları.....	27
Şekil 3.2.	<i>Rhinanthus angustifolius</i> subsp. <i>grandiflorus</i> bitkisinden elde edilen bileşiklerin kimyasal yapıları.....	28
Şekil 3.3.	<i>Rhinanthus angustifolius</i> subsp. <i>grandiflorus</i> bitkisinden elde edilen bileşiklerin kimyasal yapıları.....	29
Şekil 3.4.	Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin (10-30 μ g/ml) ABTS ^{•+} giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA,BHT ve troloks ile karşılaştırılması.....	32

Şekil 3.5.	Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) moleküllerin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırması.....	33
Şekil 3.6.	Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin (10-30 µg/ml) metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırması.....	34
Şekil 4.1.	Potasyum persülfat oksidasyonu ile ABST^{2-} den oksidan $\text{ABST}^{\cdot-}$ nin oluşması.....	40
Şekil 4.2.	Bir antioksidan tarafından DPPH radikalının giderilmesi.....	41
Şekil 4.3.	İki molekül rezveratrolun iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Rezveratrol- Fe^{2+} kompleksi oluşturması.....	43
Şekil 4.4	Bileşik 39'un iki tanesinin iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Molekül2- Fe^{2+} kompleksi oluşturması.....	44
Şekil 4.5	Bileşik 41'in iki tanesinin iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Molekül3- Fe^{2+} kompleksi oluşturması.....	44
Şekil 4.6	Bileşik 42'nin iki tanesinin iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Molekül1- Fe^{2+} kompleksi oluşturması.....	45

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	GC-MS spektrumunun alındığı deneysel koşullar.....	19
Tablo 3.1.	Sentezlenen bileşiklerin verim ve kütle spektrum değerleri(m/z).....	31
Tablo 3.2.	Sentezlenen bileşiklerin elementel analiz değerleri.....	31
Tablo 3.3.	Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin ABTS ^{•+} giderme aktivitesinde EC ₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks karşılaştırmaları.....	32
Tablo 3.4.	20 µg/ml konsantrasyonunda moleküllerin ferik iyonlarını (Fe ³⁺) indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırmaları.....	33
Tablo 3.5.	Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin ferröz iyonlarını (Fe ²⁺) şelatlama aktivitelerinin EC ₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA,BHT ve troloks ile karşılaştırmaları.....	34
Tablo 4.1.	Rhinanthus angustifolius subsp. Grandiflorus bitkisinin uçucu bileşenlerinin GC-MS analiz sonuçları.....	35
Tablo 4.2.	Rhinanthus angustifolius subsp. Grandiflorus bitkisinden elde edilen uçucu yağ ve metanol ekstraktın antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	37

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

B	: Broad (geniş)
bs	: Broad singlet
C	: Karbon
d	: Dublet
dd	: Dubletin dubleti
ddd	: Dubletin dubletinin dubleti
dt	: Dubletin tripleti
E.N.	: Erime noktası
EtOAc	: Etil asetat
EI	: Elektron iyonlaştırması
FID	: Alev İyonlaştırma Detektörü
GC	: Gaz Kromatografisi
GC/FID	: Gaz Kromatografisi Alev İyonlaştırma Detektörü
GC/MS	: Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IR	: İnfrared (kızıl ötesi) Spektroskopisi
J	: Jiromanyetik etkileşim sabiti
KTUB	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü
LRI	: Literatür Alıkonma İndeksi
m	: Multiplet
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MS	: Kütle Spektroskopisi
NEt ₃	: Trietilamin
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
PLOT	: Gözenek Tabakalı Kapiler Kolon
q	: Kuvartet
RI	: Alıkonma İndeksi
rt	: Oda sıcaklığı
RT	: Alıkonma Zamanı

s	: Singlet
SCOT	: Destek Kaplı Kapiler Kolon
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
t	: Triplet
td	: Tripletin dubleti
UV-VIS	: Mor Ötesi-Görünür Bölge
WCOT	: Duvar Kaplı Kapiler Kolon

1. GENEL BİLGİLER

1.1. GİRİŞ

Scrophulariaceae Juss. ailesinin Rhinanthus L.cinsinin 40 doğal türü Avrupa, Kuzey Asya ve Kuzey Amerika’da mevcut olup, bu bitkiler tek yıllık ya da çok yıllık otsu bitki ya da çalı formundadırlar (Davis, 1988; Güner, Özhatay, Ekim, Başer, 2000). Bu çalışmada kullanılan türlerden *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisi de bu ailenin çoğunlukla Doğu Anadolu Bölgesi’ nin kuzeyinde bulunan endemik olmayan sarı renkli çiçekleri çingırağa benzer bir *Rhinanthus* taksonudur. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *Grandiflorus* bitkisinin çiçeği Anadolu’ da halk arasında kulak ağrısını gidermek için ilaç olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1999)

Literatürde *Rhinanthus* bitkilerine ait çok az çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar arasında bazı türlere ait ekstraktların antioksidan aktiviteleri, flavonoid içerikleri, uçucu yağlarının analizi ve uçucu yağların biyolojik aktivite incelemeleri yer almaktadır (Nicolini, 2012; Imbrea, 2012; Bohdanowicz, 2013).

Bu bilgilerden hareketle, bitkilerin uçucu yağları Clevenger tipi cihaz kullanılarak, su buharı destilasyon yöntemiyle elde edildi ve GC/MS ve GC/FID yöntemleri ile analizleri yapıldı. Uçucu yağ bileşimi NIST ve WILEY kütüphanelerinin yardımıyla belirlenip literatür karşılaştırmasıyla doğrulandı (Eminagaoglu; Tepe; Yumrutas; Akpulat.; Daferera Polissiou; Sokmen, 2007; Zaikin, 2008). Çeşitli test mikroorganizmaları kullanılarak izole edilen bu uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri agar-well difüzyon metodu kullanılarak tayin edildi (Cabrera, 1999; Perez, 1999; Erdemoğlu,2003; küpeli, 2003; yeşilada, 2003).

1.2. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, su veya su buharı destilasyonu ile bitkilerin, çiçek, yaprak, gövde, kabuk, kök, meyve ve tohum gibi çok çeşitli kısımlarından elde edilen, normal koşullarda sıvı olan, bazen donabilen, uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır. Yapıları soya, susam, ayçiçeği, zeytinyağı, bademyağı gibi bitkisel yağlardan çok farklıdır. En önemli farkları, emici bir kâğıda damlatılıp açığa bırakıldıklarında hiçbir iz bırakmadan

uçmalarıdır. Bitkilerin taşıdığı uçucu yağ oranı yüzde 10 ile yüzde 0.01 arasında değişir. Örnek olarak, 1 kg gül yağı elde etmek için, ortalama 2000 kg gül yaprağı kullanılmaktadır (Toroğlu, 2006; Çenet, 2006; URL-3, 2008).

Bugüne kadar uçucu yağlarda 2000'den fazla kimyasal bileşiğin bulunduğu gösterilmiştir ki, bunların en önemlileri terpenler, alkoller, esterler, aldehitler ve kumarinlerdir. Ayrıca su buharında, uçucu özellikte olan, çok sayıda azot ve kükürt içeren bileşiklerin varlığı da görülmüştür. Bu maddeler uçucu yağlara antiseptik, antispazmodik, analjezik, antivirütik, bakterisid, antitoksik, ekspektoran, tonik, diüretik, sedatif, antidepresan, tansiyon düzenleyici vb. gibi çok çeşitli etkiler kazandırır. Ayrıca bu maddeler fizyolojik etkileri nedeni ile bazen bireysel veya toplu halde terapide kullanılmaktadır. Uçucu yağlar ve izokinolin alkaloidi gibi bazı kimyasal maddelerin, bazı bakteri ve mantar türleri üzerinde antimikrobiyal etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Bitki uçucu yağlarının bitki kimyasında da önemli rolleri bulunmaktadır. Hücreler arasında bulunan bu uçucu yağlar bilgilerin taşınmasında görev yaparlar. Dengeleyici ve dış etkenlere karşı koruyucudurlar. Önemli hormonlar uçucu yağlarda bulunurlar (Toroğlu, 2006; Çenet, 2006; URL-2, 2008; Çelik, 2007).

Uçucu yağları barındıran aromatik bitkilerin kullanımı neredeyse insanlık tarihi kadar eskidir. Örneğin, Sümerlerden kalan kil tabletlerde aromatik bazı bitkilerin kullanılışlarından söz edilmektedir. Hipokrat, Galen, İbn-i Sina gibi pek çok ünlü bilgin bitkilerin tıbbi kullanılışlarıyla ilgili değerli çalışmalar yapmışlar ve günümüzdeki çalışmalara temel olmuşlardır. 16. yüzyılda John Gerard, Nicholas Culpeper, Friedrich Hoffman gibi ünlü bilim adamları uçucu yağların özellikleri ve kullanılışları ile ilgili önemli temel bilgileri kayıtlara geçirdiler. Fransız Kimyager Renee Gottefosse ise 1926 da ilk defa terim olarak Aromaterapi' yi uçucu yağlarla yapılan tedavileri tanımlamak için kullanmış ve 1928 de aynı isimle araştırmalarını topladığı bir kitap yayınlamıştır (URL-2, 2008; URL-3, 2008).

1.3. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri

Uçucu yağlar bitkilerden genel olarak çeşitli damıtma yöntemleriyle elde edilirler. Bu işlemler sırasında organik yapılardan da, biyolojik etkilerinden de bir şey kaybetmezler. Ancak bitkilerin hassasiyetine, kullanılan kısmına, içerdikleri uçucu yağ miktarına ve

cinsine göre farklı yöntemler kullanılmaktadır (Toroğlu, 2006; Çenet, 2006; URL-4, 2008). Bu yöntemler şunlardır:

- ✓ Destilasyon
- ✓ Sıkma
- ✓ Çözücü Ekstraksiyonu
- ✓ Yağ Ekstraksiyonu (Anfloranj)
- ✓ Karbondioksit Ekstraksiyonu
- ✓ Hidrodifüzyon / Süzme

Uçucu yağlar elde edilirken en verimli şekilde yağ elde edilmesi için uygun yöntemin belirlenmesinin yanı sıra, bitkilerin toplanma zamanına, kurutma ve depolama şartları ve sürelerine, parçalama ve öğütme şekillerine de dikkat etmek gerekir. Ayrıca uçucu yağların iyi koşullarda saklanmaları gerekir. Çünkü ısı, ışık, oksijen gibi etkenler çabuk bozunmalarına neden olur (URL-2, 2008).

1.3.1. Destilasyon

Uçucu yağ eldesinde en çok kullanılan ve en ekonomik yöntem destilasyon yöntemidir. Bazı bitkilere toplandıktan hemen sonra bazılarına ise kurutulduktan sonra destilasyon uygulanır. Destilasyonda temel olarak ısı ve buhar, bitki materyalinin hücre yapısının parçalanmasına neden olur ve uçucu yağlar serbest kalarak su buharı ile birlikte soğutucuya sürüklenir. Buradaki yoğunlaşmanın ardından sudan hafif olan uçucu yağlar su yüzeyinde, ağır olanlar ise su tabakasının altında toplanır. Elde edilen uçucu yağ su ile karışmadığından kolaylıkla ayrılabilir (URL-4, 2008).

Destilasyonda bitkilerin durumuna göre su destilasyonu, su ve buhar destilasyonu ve doğrudan doğruya buhar destilasyonu olmak üzere üç farklı yöntem kullanılabilir (Toroğlu, 2006; Çenet, 2006).

Su destilasyonu, kurutulmuş olan ve kaynatılmakla bozulmayan bitkisel materyal ile çalışılıyorsa seçilir. Materyal destilasyon aygıtına yerleştirilir ve bütün uçucu kısımlar yani uçucu yağ, su toplama kabında yoğunlaşana kadar ısıtılır ve destile edilir.

Su ve buhar destilasyonu, ister kuru ister taze bitki olsun, ısıdan bozulan maddeler varsa uygulanır. Kuru materyalden hareket ediliyorsa bitki kısmı önce toz edilir, sonra su ile örtülerek ıslatmaya bırakılır. Bu karışımdan su buharı geçirilmek suretiyle uçucu kısımlar ayrılır. Taze materyalden hareket ediliyorsa uzun süre ıslatmaya gerek yoktur. Su buharı genellikle başka bir yerde elde edilir ve bir boru aracılığı ile su-bitki karışımı içine yöneltilir. Böylece ısı ile parçalanma olasılığı ortadan kaldırılmış olur.

Doğrudan doğruya buhar destilasyonu, taze materyale uygulanan yöntemdir. Bitki canlı olduğundan ve yeterince su taşıdığından bu yöntemde su ile ıslatma gereği yoktur. Bitki materyali toplanır, kesilir, tel sepet ya da benzeri kaplar içine konularak destilasyon kazanına yerleştirilir. Basınç ile taze bitki parçalarına yöneltilen buhar, yağ damlacıklarını da sürükleyerek toplama kabına gelir.

1.3.2. Sıkma

Bu metod özellikle bergamot, limon, greyfurt, mandalina ve portakal gibi turunçgil yağlarının eldesinde kullanılır. Çünkü bu yağların çoğu destilasyon yönteminde bozunmaya uğrar. Ayrıca bu bitkilerdeki yağların kabuk üzerindeki keseciklerde bulunması, yöntemin kolay uygulanmasına neden olur. Bu yöntemde meyve, üzeri yeterince keskin ve çıkıntılı bir kesenin iç çeperinde yuvarlanır, böylece uçucu yağ taşıyan salgı cepleri parçalanmış olur. Bunun ardından meyve üzerine basınç uygulanarak sıkılır ve elde edilen sıvının üzerindeki uçucu yağlar toplanır. Bazen, narenciye kabukları sünger arasında sıkılarak salgı ceplerinin ezilmesi ve çıkan uçucu yağların sünger tarafından emilmesi yöntemi ile de uçucu yağlar toplanabilir. Sonradan sünger sıkılarak akan sıvının üzerinde toplanan uçucu yağ alınır (URL-2, 2008; URL-4, 2008).

1.3.3. Çözücü Ekstraksiyonu

Bu yöntem yüksek verim istendiğinde veya diğer yöntemlerle çalışılmadığında kullanılır. Bitki hegzan, benzen gibi bir organik çözücü ile soksilet prensibine göre, (organik çözücünün hafifçe ısıtılarak devamlı şekilde bitkinin üzerinden geçirilmesi) ekstre edilir. Bu esnada uçucu yağ, sabit yağ, mum, boya maddeleri v.s. gibi, organik çözücülerde çözünabilen maddeler organik çözücüye geçer. Süzülerek alınan organik çözücü vakumda tamamen uçurulur. Sabit yağları ve mumları da taşıyan bu renkli maddeye eğer taze materyalden elde edilmişse ‘konkret’, kurutulmuş materyalden elde edilmişse ‘rezinoit’ adı

verilmektedir. Elde edilen konkret ya da rezinoit uçucu yağ yanında kokulu olmayan maddeleri de içermektedir. Uçucu yağ, etanol ya da sulu etanol ile çözülerek alınır. -15 °C de bir süre, genellikle bir gece bekletilir. Çöken kısımlar ayrıldıktan sonra, çözücü vakumda uçurularak uçucu yağ elde edilir. Bu yöntemle elde edilen uçucu yağa ‘absolü’ denir (URL-2, 2008; URL-4, 2008).

1.3.4. Yağ Ekstraksiyonu (Anfloranj)

Çok zaman alması ve pahalı olması nedeniyle günümüzde çok fazla kullanılmayan bu yöntem, materyaldeki uçucu yağı az olan kıymetli bitkiler için kullanılmaktadır ve genellikle taze materyal ile çalışılmaktadır. Taze materyal, özellikle çiçekler, soğuk bir yağ sürülmüş cam plaklar üzerine konur ve bu yağ bitkinin uçucu yağlarını absoblar. Birkaç saat veya gün sonra konulan bitki yenisiyle değiştirilir ve bu işleme yağ doyana kadar devam edilir. Daha sonra cam plaket üzerine sürülmüş yağdan, alkol ekstraksiyonu ile uçucu yağ elde edilir. Bu yöntem parfümeride çok önemli olan, fakat bitkideki oranı düşük olan uçucu yağların elde edilmesinde ekonomik olabilmektedir.

Diğer bir yağ ekstraksiyonu yöntemi ise sıcak anfloranj veya maserasyon olarak bilinir. Maserasyonda bitki sıcak bitkisel yağ içeren teknelere konularak birkaç gün çalkalanır. Sıcak yağ bitki hücrelerini patlatarak uçucu yağları emer ve bu yağ şişelenerek masaj yağı olarak kullanılır. Günümüzde gül ve karanfil uçucu yağlarının elde edilmesinde de kullanılan bir yöntemdir (URL-2, 2008; URL-4, 2008).

1.3.5. Karbondioksit Ekstraksiyonu

Bu yöntem 1980’ lerde parfüm endüstrisi için geliştirilmiştir. Kullanılan ekipmanlardan dolayı oldukça pahalı bir yöntemdir. Yöntemde soğutulan karbondioksit basınç uygulanarak sıvı hale getirilir ve bitkiden uçucu yağı ekstrakte edecek bir çözücü gibi kullanılır. Basınç kaldırıldığında karbondioksit buharlaşır ve geriye oldukça saf bir şekilde uçucu yağ kalır. Karbondioksit tarafından ekstrakte edilen uçucu yağlar bitkide bulunduğu şekline oldukça yakın bir saflıkta elde edilir. Çünkü karbondioksit inerttir ve uçucu yağlarla etkileşime girme ihtimali yoktur, hem de normal basınç altına gelindiğinde direk gaz haline geçerek ortamdaki uzaklaştığından geride kalıntı bırakmaz. Ayrıca sıcak bir işlem uygulanmadığından bitkideki uçucu yağların bozunma ihtimali de ortadan kalkmış olur (URL-4, 2008; URL-5, 2008; URL-6, 2008).

1.3.6. Hidrodifüzyon / Süzme

Hidrodifüzyon veya süzme yöntemi, ekstraksiyonun daha modern bir şekli olup destilasyondan daha hızlıdır. Yöntemde, ızgara üzerine asılan bitki kısımları üzerinden spreyleme şeklinde buhar geçirilir. Buhar ve uçucu yağdan oluşan karışım soğutulur ve elde edilen sıvıdan destilasyondaki gibi uçucu yağ ayrılır (URL-4, 2008).

1.4. Uçucu Yağların Biyolojik Etkinlikleri ve Kullanım Alanları

1926 yılından bu yana bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri laboratuvarlarda araştırılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır. Bitkilerde, selüloz, nişasta, pektin, protein, şeker gibi tedavi yönünden etkisiz maddeler yanında, çok az miktarları bile farmakolojik etkilere sahip bileşikler de bulunmaktadır. Bu bileşiklere 'etkili madde' ismi verilmektedir. Uçucu yağların içeriklerini ise onlara tedavi edici değerini kazandıran çeşitli alkoller, esterler, terpenler, aldehitler, kumarinler oluşturur. Bu maddeler uçucu yağlara antiseptik, antispazmodik, analjezik, antivirütik, bakterisid, antitoksik, ekspektoran, tonik, diüretik, sedatif, antidepresan, tansiyon düzenleyici vb. gibi çok çeşitli etkiler kazandırır. Doğada tabii olarak yetişen bazı bitki ekstraktlarının ve uçucu yağlarının bakterilere olduğu kadar, mantarlara karşı da antifungal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Toroğlu, 2006; Çenet, 2006; URL-2, 2008).

Bitkilerdeki uçucu yağların ve bitki ekstraktlarının bu kadar geniş alanda etki gösteriyor olması, gıda, kozmetik, ilaç gibi oldukça farklı alanlarda kullanılmalarına neden olmaktadır. Özellikle tıbbi amaçlı olarak bitkilerden oldukça geniş alanda faydalanılmaktadır. Bunun en önemli nedeni, bakterilerin bilinen tüm antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirmesi ve ilaç dirençliliğinin artmasıdır. Bakterilerde antibiyotik dirençliliğinin artmasına karşılık antimikrobiyal özellik gösteren bitkilere ve bitkisel ürünlere karşı direnç kazandığı görülmemektedir. Sentetik olarak üretilen ilaçlar, bitkilerdeki herhangi bir aktif maddenin izole edilmesi suretiyle yapılmakta ve bu nedenle bakteriler, sade bir yapısı bulunan sentetik ilaçlara karşı kısa zamanda dayanıklı ırklar oluşturarak ilaçları etkisiz hale getirebilmektedirler. Buna karşılık, bitkilerdeki aktif maddeler diğer maddelerle birlikte karışık bir yapı oluşturdıklarından, bakterilerin bu

yapıya karşı dayanıklı ırklar oluşturmada daha zor olmaktadır. Bu nedenle, ilaçlara alternatif olarak tıbbi bitkilerin kullanılması önerilmektedir ve bazı geleneksel bitkiler antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin daha fazla olması nedeniyle bitki ve bitkisel ürünlerin kullanılması bu yönden avantajlıdır (Toroğlu, 2006; Çenet, 2006).

Bitki uçucu yağları ayrıca aromaterapi alanında oldukça geniş bir kullanıma sahiptir. Uçucu yağlar kolaylıkla havaya karışarak burundaki alfa faktör sinir uçları aracılığıyla doğrudan beyni etkilerler. Bu nedenle uçucu yağlar, parfüm veya oda spreyi şeklinde ve aroma lambaları ile uygulanarak yoğun stres, huzursuzluk, endişe ve uyku problemleri gibi pek çok sorunun çözülmesine yardımcı olmak için kullanılır. Yine havaya kolaylıkla karışabilmeleri sayesinde solunum sistemindeki bazı sorunları çözmek için kullanılırlar. Uçucu yağlar ciltten kolaylıkla emilerek lenfatik sistem ve kan dolaşımına karışabildiklerinden masajlarla uygulanıp, kan ve lenf dolaşımının uyarılarak düzenlenmesi, vücuttaki toksinlerin atılması, gergin kasların rahatlatılması ve elastikiyetinin korunması, cildin daha sağlıklı hale gelmesi, çeşitli ağrıların giderilmesi, enerji akışının düzenlenmesi ve kişinin duygusal olarak rahatlaması sağlanır (URL-2, 2008).

Uçucu yağların bir diğer kullanım alanı da gıda sektörüdür. Tüketicilerin, koruyucu içeren gıdaların güvenliği konusunda endişeleri vardır. Bu nedenle, gıda kaynaklı hastalık olaylarının azaltılması için daha yeni ve daha etkili tekniklere artan bir şekilde ilgi duyulmaktadır. Bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda korumayı başardığı ve baharat özelliğindeki bazı bitkilerin içerdikleri uçucu yağlar ile gıdaların özelliğinde kayba neden olmaksızın bakteriyel bozulmayı geciktirdikleri ve buna bağlı olarak koruyucu amaçla kullanıldıkları saptanmıştır (Toroğlu, 2006; Çenet, 2006; Çelik, 2007).

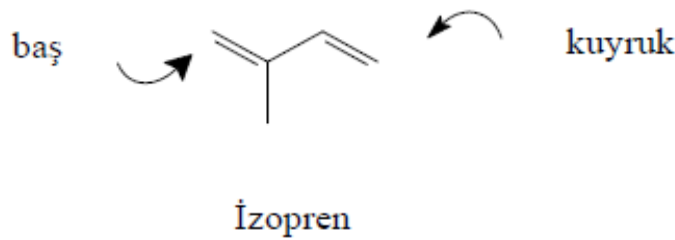
Uçucu yağlar doğru uygulandıklarında kişiye zarar vermezler. Ancak yanlış dozda ve şekilde uygulandıkları takdirde cilt ve mukozayı tahriş edebilir, metabolik faaliyetler ile kan ve lenf dolaşımında düzensizlikler, hormon düzeylerinde değişiklikler, sinir sistemi, karaciğer ve böbreklerde toksik etkiler gösterebilirler. Alerjik reaksiyonlara neden olabileceklerinden, seyreltilmeden ve test edilmeden direkt cilt üzerine uygulanmamalıdır. Bitkilerden elde edilen ekstraktların yan etkileri ve ilaçlarla birlikte kullanıldığında meydana gelebilecek ilaç etkileşimleri tam olarak bilinmemektedir.

Antibiyotiklerle günlük olarak alınan bazı yiyecek ve yiyeceklere ilave edilen baharatlardaki maddelerin etkileşime geçerek istenmeyen yan etkilere veya aktivitenin azalmasına neden olduğu belirtilmektedir. Bu bakımdan önemli hastalıkların tedavisinde yanılığa düşmemek için mutlaka doktor önerisine ve tedavisine ihtiyaç vardır (Toroğlu, Çenet, 2006; URL-2, 2008).

1.5. Terpenler

Terpenler, bitkilerde bulunan bileşiklerin bir grubunu oluşturur. Bitkilerden elde edilen kokulu bileşiklere "uçucu yağlar" denir (Chiron, Chalchat, Garry, 1997). Organik kimyanın ilk zamanlarından beri uçucu yağlar özellikle terpenler, kimyacıların dikkatini çekmiştir. Uçucu yağların birçoğunun $C_{10}H_{16}$ doymamış hidrokarbon yapısında oldukları ve bu bileşiklerde karbon-hidrojen atom oranlarının 5:8 olduğu tespit edilmiştir. Bileşiminde karbon-hidrojen oranı 5:8 olan bu bileşiklere daha sonra terpenler adı verilmiştir. Bu isimlendirme etimolojik olarak turpentin ve alken kelimeleriyle ilgilidir (turpentine=neft yağı) (Yücesoy, 2002).

Daha sonra terpenlerin izopren iskelet birimlerinin baş-kuyruk bağlanmasıyla oluştuğu keşfedilmiştir (Baş metil dalına daha yakın olan uçtur). Bu nedenle sonraları izopren iskelet birimi içeren bütün bileşiklere terpenler adı verilmiştir. İzopren birimi içeren, terpenlere benzer tabii olarak oluşan bileşiklere terpenoidler denir (Fesenden, 2001; Logue, 2001).



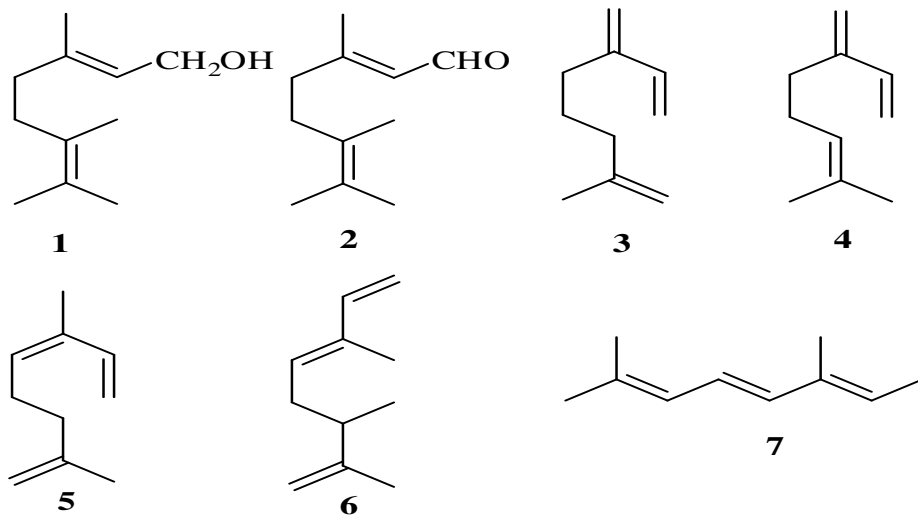
Şekil 1.1. İzopren yapısı

Bu bileşikler bazen izoprenoid olarak da adlandırılır. Terpenler iki, üç ya da daha fazla izopren birimi içerebilir. Molekülleri açık zincir ya da halkalı olabilir. Çift bağlar, hidroksil grupları, karbonil grupları ya da daha başka işlevsel grupları taşıyabilirler. Terpenler içerdikleri izopren birimlerinin sayısına göre sınıflandırılırlar.

- Monoterpenler : İki izopren birimi (10 karbon)
- Seskiterpenler : Üç izopren birimi (15 karbon)
- Diterpenler : Dört izopren birimi (20 karbon)
- Triterpenler : Altı izopren birimi (30 karbon)
- Tetraterpenler : Sekiz izopren birimi (40 karbon)

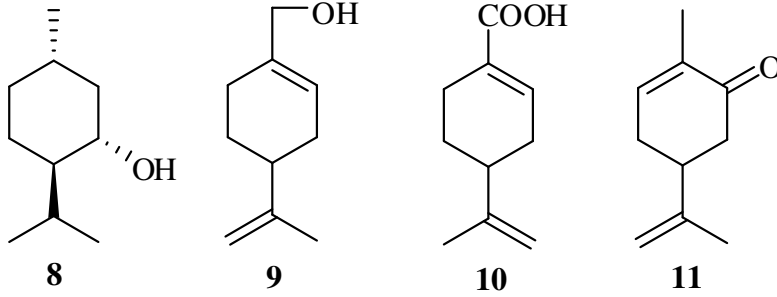
Belirli bitkilerden (yapraklarından, çiçeklerinden ve meyvelerinden) elde edilen temel yağların (essential oils) ana bileşeni basit mono- ve seski-terpenlerdir. Kompleks olmaları, kolayca temin edilebilmeleri sebebiyle bu doğal oluşumlu monoterpenler 19.YY'ın ortalarından beri kimyacıların ilgisini çekmiştir. Bu konuda ilk çalışmalar, bu moleküllerde kolaylıkla meydana gelen düzenlenmeler nedeniyle güçlüklerle karşılaşmıştır (Yücesoy, 2002).

Asiklik monoterpenlere 2,6-dimetiloktanın türevleri olarak bakılabilir. Asiklik monoterpenlerdeki çift bağların yeri geçmişte çok tartışılmıştır. Çift bağların yerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar ozonoliz deneylerine dayanır. Asiklik monoterpenlere geraniol (1), sitral (2), α -mirsen (3), β -mirsen (4), cis- α -osimen (5), trans- α -osimen (6) ve trans, trans-2,6-dimetil-2,4,6-oktatrien (7) örnek verilebilir (Şekil 1.2.) (Finar, 1975).



Şekil 1.2. Asiklik Monoterpenler

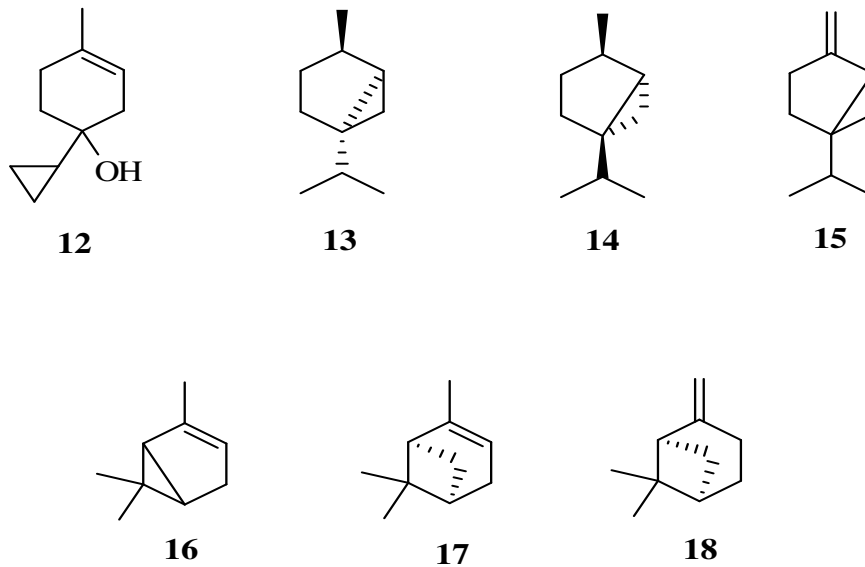
Monosiklik terpenlere örnek olarak ($\pm$) mentol (**8**), perillil alkol (**9**), perillil asit (**10**) ve carvon (**11**)'u verebiliriz (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Monosiklik Monoterpenler

Moleküllerin konformasyonları koltuk-sandalye konformasyonudur, ayrıca halkada çift bağı olan bileşiklerin yarı sandalye konformasyonuna sahip olmaları beklenir. Bu moleküllerde metil grubundan büyük olan izopropil grubu ekvatorial pozisyonundadır (Yücesoy, 2002).

Genelde bisiklik monoterpenler asimetrik yapıya sahip olduklarından izolasyonları ve sentezleri üzerine olan ilgi oldukça fazladır. Bisiklik monoterpenlere örnek olarak ($\pm$) p-mentan (**12**), ($\pm$) trans-thujan (**13**), ($\pm$) cis-thujan (**14**), ($\pm$) sabinen (**15**), ($\pm$) car-3-en (**16**), ($\pm$) α -pinen (**17**) ve ($\pm$) β -pinen (**18**) verebiliriz (Şekil 1.4.) (Finar, 1975).



Şekil 1.4. Bisiklik Monoterpenler

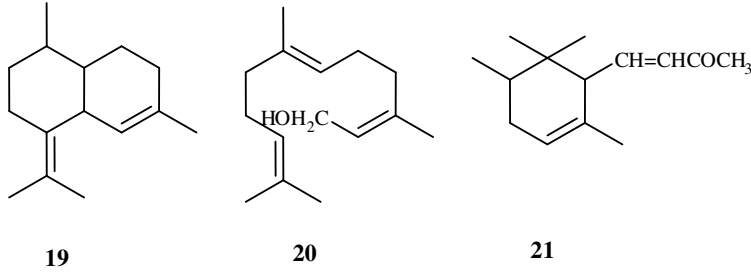
Bisiklik monotermenlerden olan β -pinen (**18**), doğada en bol ve en kolay elde edilebilen terpenik hidrokarbonlardandır ve kullanım alanları çok geniştir (Benkli, 1990). β -Pinen (**18**) bir alkendir ve dört karbonlu reaktif bir halkaya sahiptir. Bu reaktif halka Wagner-Meerwein düzenlenmesi gibi iskelet düzenlenmesine eğilimlidir (Richter, 1945).

Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve onların temel bileşeni olan terpenler, çeşitli alanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu alanlar başlıca; tıpta tedavi amaçlı, parfümeri, uyuşturuu maddeler, yapışkanlar gibi sıralanabilir. Bunun ötesinde bu bileşikler, özellikle sentetik kimyada kullanılan kimyasallara karşı ilgi ile bakılan ve bu yüzyılın sonuna doğru ilgi çekici hale gelen doğal ürünlerin en önemlilerindendir. Bu açıdan bakıldığında terpenler ve türevleri veya bitkilerden elde edilen uçucu yağların anti-mikrobiyal özelliklerinin potansiyel uygulamaları yönünden belirgin yükselişi oldukça dikkat çekicidir. Bu yükseliş terpen yada terpenoid gibi doymamış bileşiklerin değişimi, olefinlerin veya doymamış terpenoidlerin polimerleşen oksidasyonu ve ara ürünleri olan hidroperoksitlerin oluşumu ve düzenlenmeleri ile ilgilidir (Kim, Shim, Wada, Inove, 2001). Terpenleri içeren karışım lar tıpta tedavi amaçlı ve parfümeride kullanılmaktadır (Finar, 1975). Ülkemizde bitki çeşidi oldukça fazladır. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de bitkilerin bünyelerinden terpen ve terpenoidler izole edilmektedir.

Monoterpenler, gün boyunca OH radikalleri ve ozonun her ikisi tarafından, geceleri ise NO₃ radikalleri ve ozon tarafından atmosfere okside edilir. Aynı zamanda ozonla reaksiyon fazladan OH radikallerinin oluşumuna neden olur. Bu reaksiyonların önemi oksitlenmiş mono terpen oluşumu atmosferdeki konsantrasyonuna ve bu oksidantlara karşı ilgilerine dayanır. Gaz fazında terpen oksidasyon ürünlerinin terpen-ozon reaksiyonlarında oluşan asıl ürünün karbonil bileşiklerinden kaynaklandığı son zamanlarda belirlenmiştir. Bunun yanında aerosol oluşumunda anahtar role sahip olduğu söylenen karboksilik asitler de, α -pinenin ozonolizinde az miktarda oluşmaktadır. Bu çalışmalarla organik asitlerin ve tohum elde edilen aerosollerin yokluğunda bir seri mono terpenlerin ozonla reaksiyonlarında yeni ürünlerin oluşumu incelenmektedir (Hardcastle; Rowlands; Barber; 1999). Bu sebeplerden dolayı mono terpenlerin oksitlenmiş türevlerinin bazıları tatlandırma, parfümeri ve eczacılık sahalarında ticari anlamda değeri olan maddelerdir.

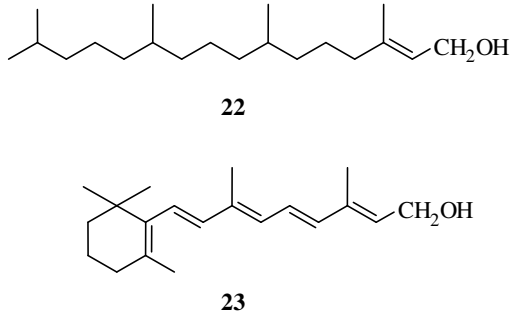
Bunlar da asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik seskiterpenler olarak alt gruplara ayrılır. Bugün uçucu yağlarda 1000 kadar seskiterpen bağlantılı türevler bulunmaktadır.

Seskiterpenler örnek olarak α -Bizabolen (**19**), farnesol (**20**) ve α -iyomon (**21**) verilebilir (Ceylan, 1987) (Şekil 1.5).



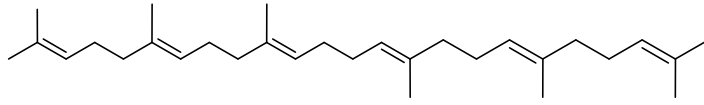
Şekil 1.5. Seskiterpenler

Diterpenler doğal ürünlerin içerisinde yaygın olarak bulunmaktadırlar ve çoğunlukla mantar ve bitkisel kaynaklıdır. Örnek olarak fitol (**22**) ve vitamin A₁ (**23**) verilebilir (Bingöl, 1976) (Şekil 1.6).

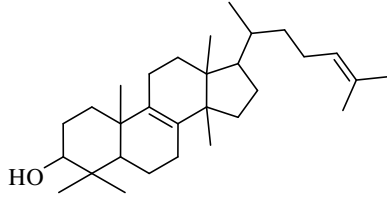


Şekil 1.6. Diterpenler

Triterpenlere örnek olarak squalen (**24**) ve lanosterol (**25**) verilebilir (Bingöl, 1976) (Şekil 1.7).



24

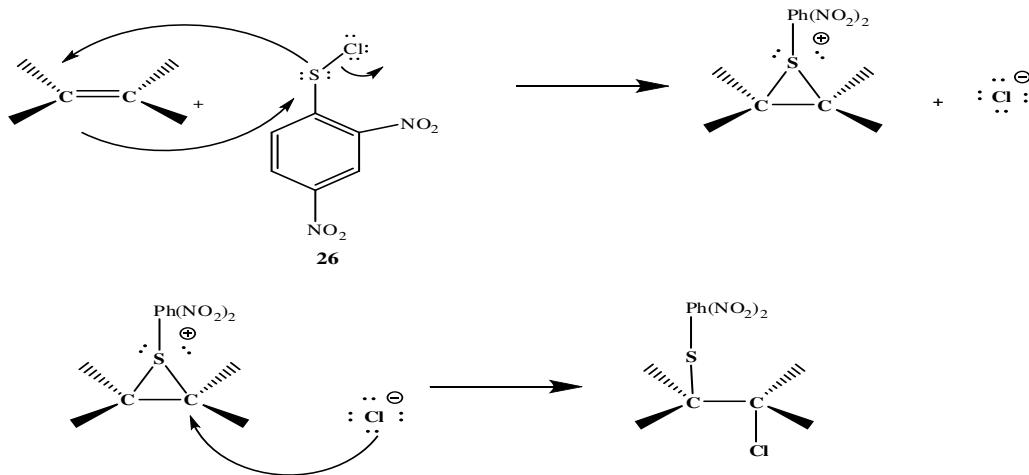


25

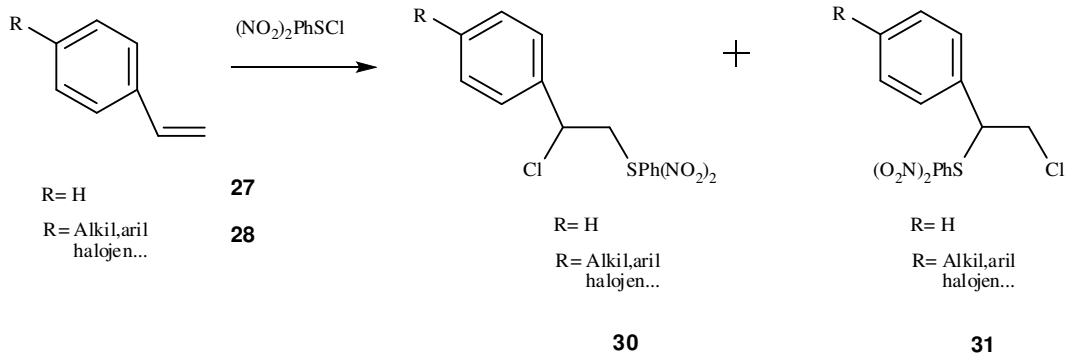
Şekil 1.7. Triterpenler

1.6. 2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın Katılma Tepkimeleri

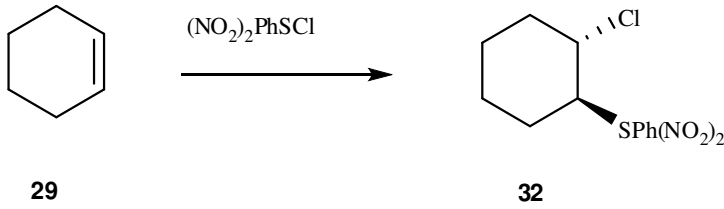
2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (26) bileşiği de bileşikteki kükürt elektrofil olduğundan dolayı, olefinlere bromun katılmasına benzer şekilde tepkime vererek bir katılma gerçekleştirir (Şekil 1.7). Yine literatürde 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür'ün sitiren (27) (Orr, Kharasch, 1953) p-substitue sitiren (28) (Orr, Kharasch, 1956) (Şekil 1.8), simetrik alkenler (Kharasch, Assony, 1953; Kharasch, Assony, 1954), siklohekzen (29) (Kharasch, Hogg, 1956) (Şekil 1.9), cis- ve trans-2-büten (Kharasch, Havlik, 1953; Kharasch, Havlik, 1956) cis- ve trans-sitilben (Kharasch, Slobodkin, 1960), ile katılma reaksiyonunun benzer mekanizma üzerinden gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 1.8. Olefinlere 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın katılması

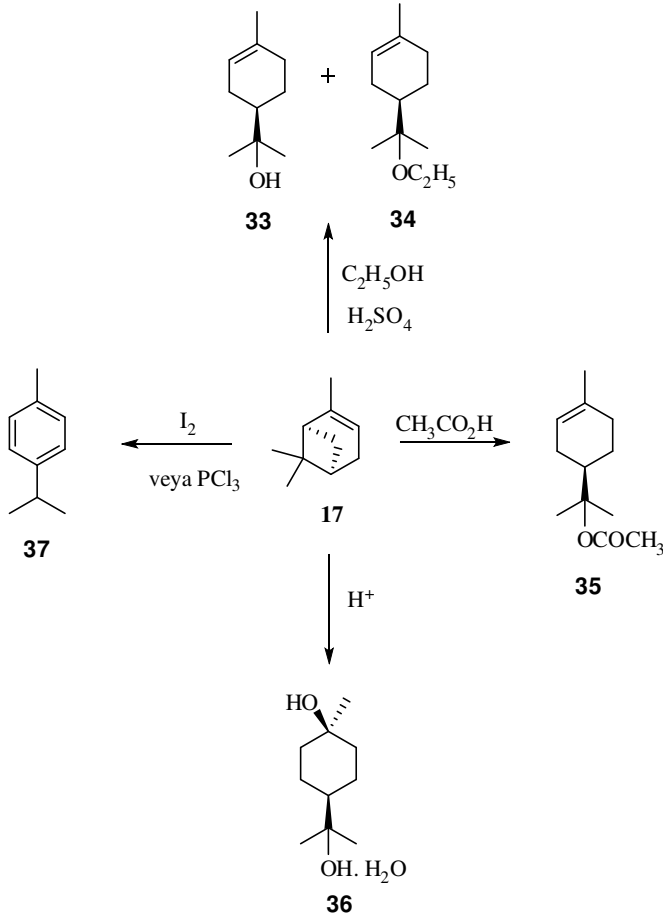


Şekil 1.9. 2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (**26**) bileşiğinin sitiren (**27**) ve p-substitue sitiren (**28**) olan katılma reaksiyonları



Şekil 1.10. 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür (**26**) bileşiğinin sikloheksen (**29**) ile olan katılma reaksiyonu

α -Pinen (**17**)'nin derişik sülfürik asit ve etanol ile reaksiyonunda ana ürünler terpineol (**33**) ve terpineol (**33**)'nin etil esteri **34** iken susuz asetik asitle reaksiyonunda ana ürün terpineol **33**'ün asetat esteri **35**'dir. Ancak sulu asitlerle α -pinen (**17**)'nin reaksiyonunda artık terpin hidrat (**36**) ana ürün olur. İyot veya PCl_3 ile reaksiyonunda aromatlama sonucu p-simen (**37**) oluşur (Şekil 1.10) (Richter, 1945).



Şekil 1.11. α -Pinen (17)'nin iskelet yapısında meydana gelen düzenlenmeler

1.7. Spektroskopik Yöntemler

Elektromagnetik ışımının madde ile etkileşmesini konu alan bilim dalına spektroskopi denir ve ışımının madde (atomlar veya moleküller) tarafından soğurulması veya yayınması incelenirse, sırasıyla, soğurma (absorpsiyon) ve yayınma (emisyon) spektroskopileri olarak adlandırılır. Elektromagnetik ışımının organik moleküller tarafından soğurulması, moleküldeki atomların türüne, düzenlenmesine, moleküllerin şekline, büyüklüğüne, v.b. bağlı olduğundan organik kimyada spektroskopik yöntemler, organik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizi, yapılarının aydınlatılması, stereokimyasal özelliklerinin bulunması ve saflık kontrolü, v.b. gibi çok geniş bir alanda uygulanmaktadır.

Organik kimyada en çok kullanılan beş spektroskopik yöntem; UV-VIS (Mor ötesi-Görünür bölge), IR (Kırmızı ötesi), NMR (Nükleer magnetik rezonans), Elementel Analiz, MS (Kütle spektroskopisi)'dir.

Kütle spektrometrisinde, madde yüksek enerjili (70 eV veya 6000 kal mol⁻¹) elektron demeti ile bombardıman edilir ve oluşan pozitif iyonlar, kütle/yük oranlarına göre kaydedilir. Kütle spektrumu ile maddenin molekül kütlesi ve molekül formülü elde edilir, içerdiği fonksiyonel gruplar ve yapısı da bulunabilir.

1.8. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin sabit yüzeylerdeki tutunma hızlarından yararlanarak birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Bu yöntemlerde çalışma düzeneği iki bileşenden oluşur. Bu bileşenlere sabit faz ve hareketli faz ya da mobil faz adı verilir.

Mobil fazın içerisinde yer alan bileşenler, sabit faza ait dolgu maddesiyle etkileşimleri sebebiyle, bir miktar tutulurlar. Bu tutulma, örnekteki farklı bileşenler için farklı miktarlarda olur. Böylece bileşenler sabit fazın sonlarına doğru, farklı hızlarda ilerledikleri için, birbirinden ayrılmış vaziyette sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler.

Kromatografide sabit faz, bir katı veya bir katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Sabit fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne sıvı kromatografisi (SK, LC); hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise gaz kromatografisi (GK, GC) denir. Gaz kromatografisi gaz, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir. Sıvı kromatografisi ise özellikle ısıl kararsız ve uçucu olmayan örnekler için kullanılır. Uygulama amacına göre değişik kromatografik yöntemler vardır. Bunlar; adsorpsiyon kromatografisi, dağılma kromatografisi, gaz kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi, iyon kromatografisi, yüksek performans kromatografisidir.

Adsorpsiyon kromatografisinde, sabit faz alümina ya da silika jel gibi katı bir madde, hareketli faz ise gaz ya da sıvı gibi harekete açık maddelerdir. Adsorpsiyon kromatografisi maddelerin değişik oran ve kuvvette adsorbe olmaları esasına dayanır. Dağılma kromatografisinde analizi yapılan maddelerin, sabit faz tabakasında ilerlemekte olan hareketli fazın etkisiyle sürüklenmesi söz konusudur. Sabit faz genellikle silika jel, hareketli faz ise organik çözücülerden oluşmuş bir çözeltidir.

İnce tabaka kromatografisinde sabit fazı bir plaka (cam da olabilir) üzerine yayılmış ince silika jel veya alümina tabakası teşkil eder. Bu tabakaya damla mertebesinde

emdirilen çözeltilerdeki bileşenler, hareketli faz olarak uygun bir çözücü veya çözücüler karışımı kullanılarak plaka üzerindeki sabit fazda ayrı ayrı yerlerde toplanır. Bu kromatografi adsorpsiyon veya dağılma kromatografisine benzer.

Kağıt kromatografisi ince tabaka kromatografisine benzer. Her iki metot da eser oranda maddeleri ayırmak için kullanılır. Yüksek performans ve iyon kromatografileride ayırma amacıyla geliştirilmiş yeni kromatografi teknikleridir.

Gaz kromatografisinde uçucu veya kolaylıkla uçucu hale getirilen bileşenler ayrılır. Bu tür kromatografilerde hareketli faz olarak, azot, helyum, argon gibi inert gazlar kullanılır. Numunede bulunan bileşenler bir cihazla spektrum haline getirilir. Bu spektrumda bulunan her pik ayrı bir bileşeni gösterir. GC yönteminde karışımın çok küçük bir miktarını analiz etmek mümkündür. Bu yöntemde uygulama, genellikle numunenin seyreltik bir çözeltisinin 0.001 mL (1 µL)'lik ya da daha az bir miktarın bir şırıngayla gaz kromatografisi cihazının ısıtılan kısmına verilmesiyle başlar. Numune, enjeksiyon bölümünde buharlaşır ve inert bir gazla kapiler kolona taşınır. Tipik bir kapiler kolon, 10-30 m boyunda ve çapı 0.1 mm ile 0.5 mm arasında değişen ince bir borudur ve sıcaklığı analiz edilecek numunenin uçuculuğuna göre ayarlanabilen bir bölmenin (fırının) içerisine yerleştirilmiştir. Kapiler kolonun iç yüzeyi, genel olarak polar olmayan bir sabit fazla kaplanır. Sabit faz olarak, yüksek kaynama noktasına sahip çok viskoz sıvılar olan silikon esaslı polimerler kullanılır. Karışımdaki moleküller, inert gaz tarafından kolon boyunca sürüklenirken, kaynama noktalarına ve sabit faza olan ilgilerine bağlı olarak kolon içinde değişik hızlarla hareket ederler. Kaynama noktası ve sabit faza ilgisi fazla olan moleküller kolonu daha uzun sürede geçerken, kaynama noktası düşük ve polar olmayan moleküller kolonu çok daha çabuk geçerler. Her bileşenin kolonu geçme süresine alıkonma zamanı denir.

Gaz kromatografi-kütle spektrometrisi (GC-MS) tekniğinde gaz kromatografiden çıkan gaz bir kütle spektrometresinden geçer ve her pikin kütle spektrumu alınır. Böylece gaz kromatografisi karışımı ayırmada ve kütle spektrometrisi ise onu analiz etmede kullanılır. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi çok güçlü bir analitik tekniktir. Bu tekniğin çok bilinen uygulamalarından biri steroidler, uyarıcılar ve diğer başarı artırıcılar için atletlerin test edilmesidir. Bu ilaçlar vücutta metabolit denilen türevlerine dönüştürülür ve sonra idrarla dışarı atılır. İdrarın GC-MS analizi yapıldığında içindeki organik bileşiklerin kütle spektrumları, aletin bilgisayarına yüklenmiş, bilinen metabolitlerin kütle

spektrumlarıyla karşılaştırılarak bu bileşikler belirlenir. Benzer şekilde yeni doğmuş bebeklerin idrarı GC-MS ile incelenerek genetik bozukluğu gösteren metabolitlerin belirlenmesiyle erken tedavi mümkün olabilir. Gaz kromatografi-kütle spektrometrisi içme sularındaki halojenli hidrokarbonların belirlenmesi ve ölçülmesi gibi rutin analizlerde de kullanılır. Yine besin maddeleri, su kirliliği, hava kirliliği, nefeste bulunan bileşenler gibi karışım içinde bulunan bileşenlerin belirlenmesinde kullanılır. Sıvı karışımlar için ise sıvı kromatografisi aleti kütle spektrometresinin girişine bağlanılır. Buda LC-MS tekniğidir.

GC-MS ve LC-MS teknikleri, kromatografik ayırma ile kütle spektrometrisi yoluyla belirleme analitik yöntemlerini biraraya getirmekle beraber bu alanda tek bir yöntem değildir. Kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (MS-MS) de bu tekniklerden biridir. Bu teknikte bir kütle spektrometresi karışımındaki bileşiklerin moleküler iyonlarını oluşturup birbirinden ayırırken diğer kütle spektrometresi bu iyonların parçalanma şekillerini inceler.

1.9. Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri

Antimikrobiyal maddeler mikroorganizmalar üzerinde çeşitli etkilere sahiptirler. Bu etkiler mikroorganizma cins sayısına bağlı olarak iki şekilde sınıflandırılır. Birincisi mikroorganizma sayısının az olduğu dar spektrumlu hal ve diğeri ise mikroorganizma sayısının çok olduğu geniş spektrumlu haldir. Dar spektrumlu antimikrobiyal maddeler enfeksiyona yol açan mikroorganizma üzerine oldukça etkili olup, tedavi için ideal oldukları kabul edilir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler ise canlının doğal bağışıklığında önemli rol oynayan ve ekolojik dengeyi sağlayan normal mikroorganizma doğasını bozarlar. Bununla birlikte, geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler (karbapenemler, kinolonlar vs.), birden çok patojenin birlikte meydana getirdiği enfeksiyonlarda ve mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının beklenemeyeceği acil durumlarda kullanılırlar.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Enstrümantasyon

Bitkilerin GC-MS analizinde Agilent-7890B marka gaz kromatografisi cihazı ile Agilent 5975C Series GC/MSD marka kütle spektrometresi cihazları kullanıldı. Analiz şartları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. GC-MS spektrumunun alındığı deneysel koşullar

Sıcaklık 1	60 °C
Zaman 1	2 dakika
Hızı	3 °C/dakika
Sıcaklık 2	240 °C
Zaman 2	5 dakika
Toplam analiz süresi	67 dakika
Enjekte edilen numune miktarı	1 mikrolitre
Enjektör sıcaklığı	250 °C
Kapiler kolon	HP-5MS kolonu (30 m uzunluğunda, 0,32 mm çapında, film kalınlığı 0,25 µm)
Taşıyıcı gaz	Helyum, 1 mL/dakika



Şekil 2.1. GC-MS cihazı

2.2. Bitki Materyalleri

Rhinanthus angustifolius subsp. *grandiflorus* bitkisi Temmuz 2013’de, A8 Gümüşhane ili Torul İlçesi Altınpınar beldesi Limni Gölü çevresinden (1800 m) toplandı. Bitkiler toplandıktan sonra hemen teşhis edilerek (Davis, 1988; Güner, Özhatay, Ekim, Başer, 2000) oda sıcaklığında kurutuldu ve ardından K.T.Ü. FEN-EDEB. FAK. Biyoloji Bölümü Herbariumu’na konuldu (No. Gültepe 508-2013, KTUB).



Şekil 2.2. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisi

2.3. Uçucu Yağların İzolasyonu

Kurutulmuş *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinden alınan 76 gramlık kısım küçük parçalara ayrıldıktan sonra 2 L’lik şilifli balonna konularak üzerlerine 800 ml saf su eklendi. Isıtıcı gömlek üzerinde 3 saat ısıtılarak bitkilerin uçucu yağları Clevenger tipi cihazda, buz banyosuyla soğutma sağlanarak toplandı. Yağlar 1 ml n-hekzan’da (HPLC kalitesinde) çözülerek alındıktan sonra koyu renkli şişelerde ağzı kapatılarak 4 °C’de saklandı. Daha sonra uçucu yağ ekstraktından alınan 1 µl’lik çözelti GC-MS cihazına enjekte edilerek analizi yapıldı. Clevenger tipi su buharı destilasyon düzeneği Şekil 2.3’de görülmektedir.

2.4. Bileşenlerin Aydınlatılması

Uçucu yağın bileşenleri kütle spektrumlarının cihazda bulunan NIST ve Willey kütüphaneleriyle, alıkonma indekslerinin ise literatür verileriyle karşılaştırılması sonucu

tanımlandı (Eminagaoglu, Tepe, Yumurtaş,Akpulat, Sökmen, Daferera, Polissiou, 2007; Zaikin, 2008).

2.5. Antimikrobiyal Aktiviteleri

Daha önceden yapılan çalışmalardan da faydalanılarak agar-well difüzyon metodu kullanıldı (Perez, Agnese,Cabrera, 1999; Erdemoglu,Yeşilada, küpeli, 2003). Tüm test mikroorganizmaları Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden alınmıştır. Bu mikroorganizmalar şunlardır: *A. hydrophila*, *B. Cereus*, *B. Subtilis*, *Ent. Cloacae*, *E. Coli*, *E.coli O157:H7*, *K. Pneumoniae*, *L.monocytogenes*, *P. Vulgaris*, *Pseu. Aeruginosa*, *Sal. Typhimurium*, *S. Aureus*, *Sac. Cerevisiae*, *C. Albicans*, *A.niger*, *A.flavus*, *Penicillum..* Uçucu yağların asetonunda 1000 ve 500 µg/ml’lik stok çözeltileri hazırlandı.

Bu testte her mikroorganizma Brain Heart Infusion’da (BHI) süspanse hale getirilip yaklaşık mL’de 10⁶ koloni oluşturan birime kadar seyreltilmiştir. Hazırlanan süspanسیونlar BHI Agar ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, MI) üzerine serilmiş ve kurutulmuştur. Maya benzeri mantarlar olan *C. albicans* ve *C. tropicalis* için SDA kullanılmıştır. Agarda steril bir mantar delici ile 5 mm çapında kuyucuklar delinmiş ve bu kuyucuklara 100 µL numune aktarılmıştır. Kuyucukların bulunduğu plakalar 35 °C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite, test organizmalarına karşı meydana gelen inhibisyon alanları ölçülerek belirlenmiştir. Aseton çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır. Ceftazidime (Fortum) (10 µg) standart antibakteriyel olarak ve Triflucan (5 µg) standart antifungal olarak kullanılmıştır. Testler paralel çalışılmış ve sonuçlar inhibisyon alanının çapı cinsinden ifade edilmiştir: (-): < 5.5 mm; (+): 5.5-10 mm; (++) : 11-15 mm; (+++) : ≥ 16 mm. Sonuçlar Tablo 4.2.’de gösterilmiştir.



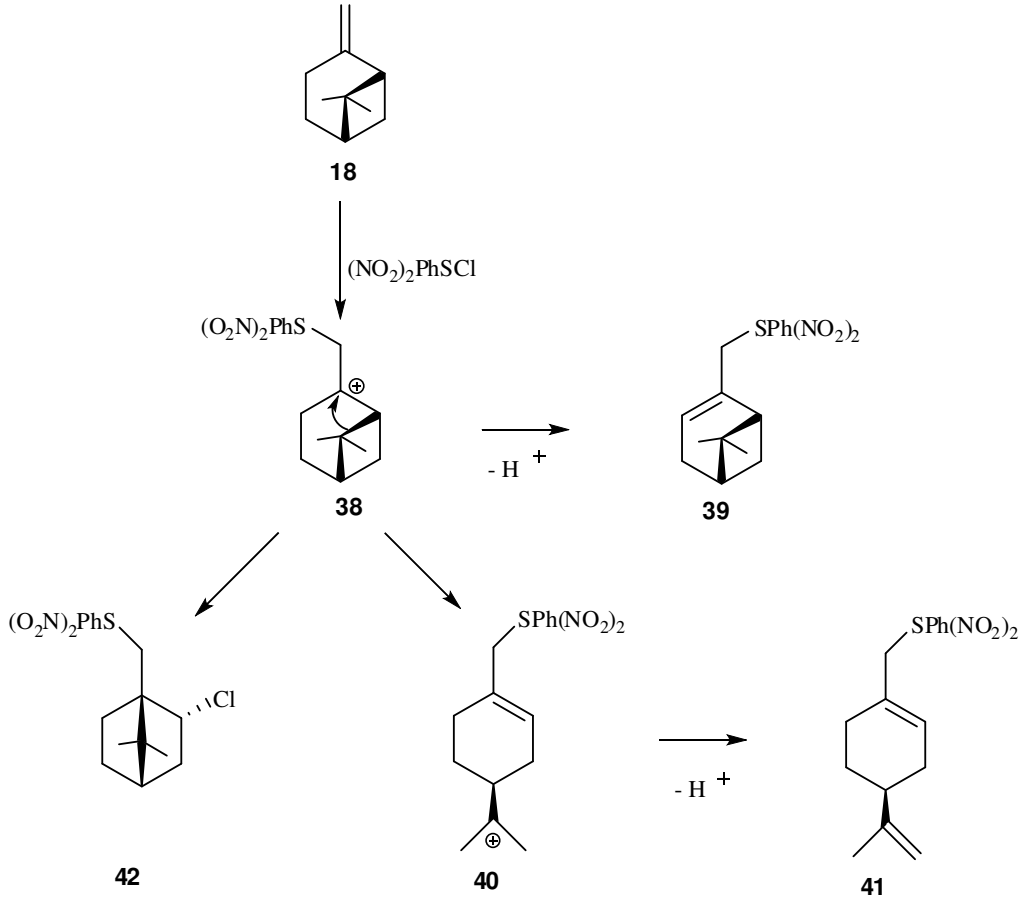
Şekil 2.3. Clevenger tipi subuharı destilasyon düzeneği

2.6. β - pinen(18)'e 2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın Katılma Tepkimesi

2,4-Dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın (2.0 g, 8.4 mmol) dikloroetandaki çözeltisi (100 ml) bir balona (250 ml) konuldu ve buna β -pinen (18)'in (2.32 g, 17 mmol) dikloroetandaki (20 ml) çözeltisi 10 dakikada ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 2 gün karıştırıldıktan ince tabaka kromatografisi yardımı ile çıkış bileşikleri tamamen bittiği için reaksiyon sonlandırıldı. Sonra çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Ham ürün silika-jel kolondan (100 g) EtOAc/hekzan (1/5) ile saflaştırıldı. Kolondan sırayla 3 tane ürün **39** (%52. 744 mg), **41** (%35, 508 mg) ve **42**(%12. 189 mg) elde edildi. Gerekli saflaştırma işlemleri yapıldıktan sonra yapıları çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edildi.

Bu katılma reaksiyonları iyonik bir mekanizma üzerinden yürüyeceği düşünülmektedir(Richter, 1945). Bu şekilde yürüyen reaksiyonlarda gerilimli siklobütan

halkalarının iskelet düzenlenmesi (Wagner-Meerwein düzenlenmesi) ürünlerine rastlaması kuvvetle muhtemeldir. β -pinen molekülü içinde olası bir şema hazırlanmıştır.



Şekil 2.4. Klasik Yaklaşımla Katılma Tepkimesi Şeması

2.7. Antioksidan ve Radikal Giderici Aktivite Ölçümleri

2.7.1. 2,2-Azino-bis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) Radikal Giderme Aktivitesi:

ABTS radikali giderme aktivitesi Roberta Re ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre belirlenmiştir (Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, Rice-Evans, 1999). Öncelikle 7 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanacaktır. Bu çözeltiye 2.45 nM'lık persülfat çözeltisi eklenerek ABTS radikalleri üretilecektir. ABTS radikal çözeltisi kullanılmadan önce kontrol çözeltisinin 734 nm'de absorbansı 0.1 M ve pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu ile 0.700 ± 0.025 nm'ye ayarlandı. ABTS radikal giderme aktivitesine bakılan bileşik 39, 41 ve 42'nin farklı konsantrasyonlarına (10-30 $\mu\text{g/ml}$) birer ml ABTS radikal çözeltisi ilave

edildikten sonra yarım saat inkübe edildi. Etanoldan oluşan köre karşı 734 nm’de absorbanlar kaydedildi ve grafiği çizilerek EC₅₀ değerleri hesaplandı. (Şekil 3.4, Tablo 3.3.) Küçük EC₅₀ değeri yüksek radikal giderme anlamına gelmektedir.

2.7.2. 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) Serbest Radikalleri Giderme Aktivitesi:

DPPH serbest radikal giderme aktivitesi Blois metoduna göre yapıldı (Blois, 1958). Serbest radikal olarak DPPH•’ın 1 mM’lık çözeltisi kullanıldı. Numune olarak daha önce hazırlanan 1 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi kullandı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyonlarında çözelti oluşturacak şekilde stok çözeltiler aktarıldı ve toplam hacimleri 3 ml olacak şekilde etanol ile tamamlandı. Daha sonra her bir numune tüpüne stok DPPH• çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Yarım saat oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildikten sonra etanoldan oluşan köre karşı 517 nm’de absorbanları ölçüldü. Kontrol olarak, 3 ml etanol ve 1 ml DPPH• çözeltisi kullanıldı. Azalan absorban geriye kalan DPPH• çözeltisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini verdi. Sonuçlara bakıldığında 3 molekülünde DPPH radikalini gideremediği gözlemlendi.

2.7.3. N,N’-dimetil-p-fenilendiamin Dihidroklorür (DMPD) Radikali Giderme Aktivitesi:

N,N’-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) radikali giderme aktivitesi tayini Fogliona ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (Foglione, Verde, Randazzo, Ritene, 1999). Bu amaçla, ilk olarak renkli radikal katyon (DMPD^{•+}) elde edildi. Numunelerin ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri (10–30 µg/ml) deney tüplerine aktararak hacim destile suyla 0.5 ml ye tamamlandı. Bunun üzerine 1 ml DMPD^{•+} çözeltisi eklendi. 50 dakikalık bir inkübasyondan sonra absorban değerleri 505 nm’de ölçüldü. Sonuçlara bakıldığında 3 bileşiğinde çözeltideki DMPD radikalini gideremediği gözlemlendi.

2.7.4. Fe³⁺-Fe²⁺ İndirgeme Kapasitesi:

Toplam indirgeme kuvveti tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (Oyaizu, 1986). Bunun için öncelikle 1mg/ml konsantrasyonunda stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltilerden farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde cam tüplere aktararak, hacim destile suyla 1 ml’ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2.5 ml 0.2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ve 2.5 ml %1’lik potasyum ferrisiyanür (K₃Fe(CN)₆) ilave edilerek karışım 50 °C’de 20 dk

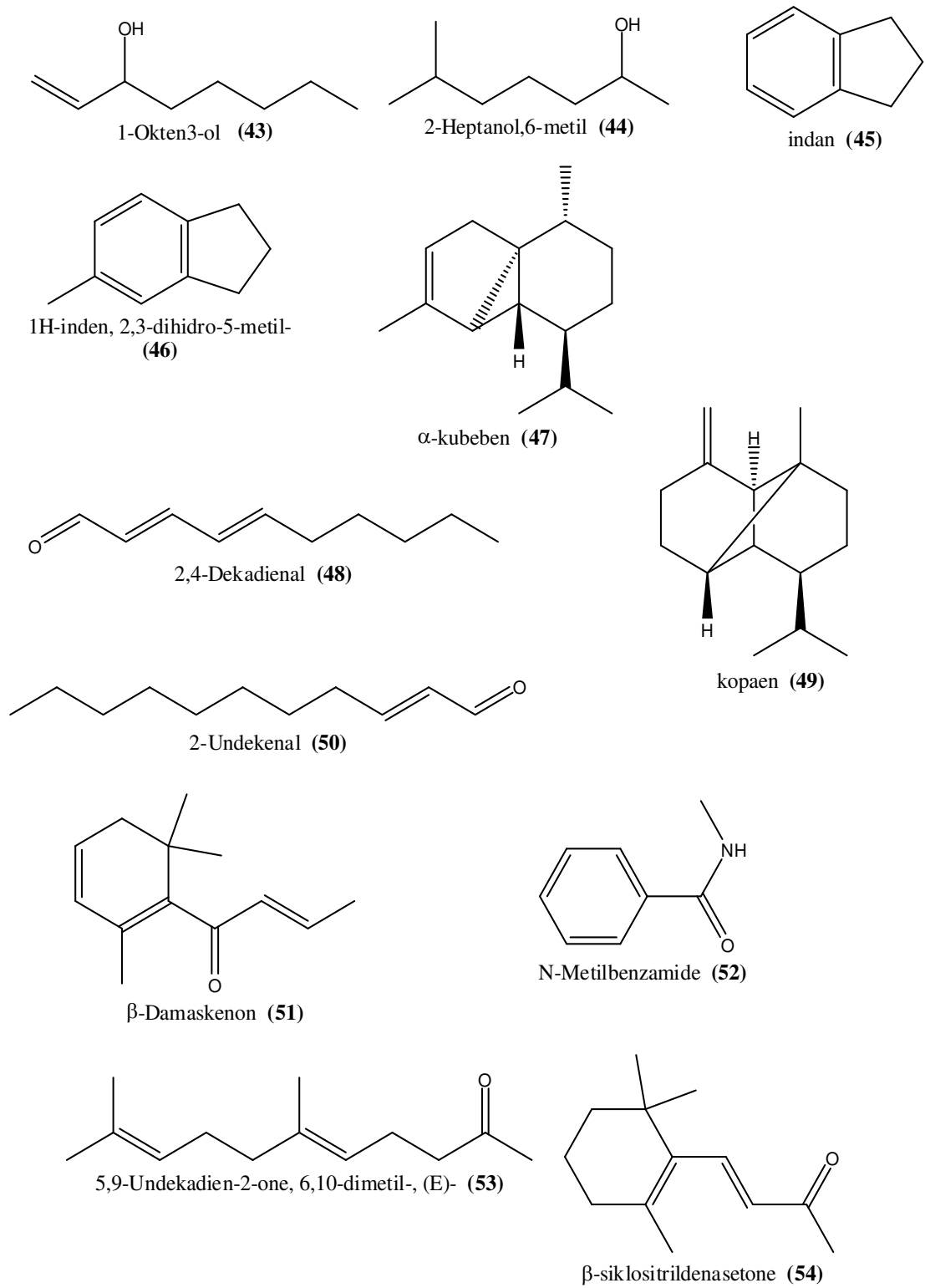
inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2.5 ml % 10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. Çözeltinin üst fazından 2.5 ml alındıktan sonra bunun üzerine 2,5 ml destile su ve %0,1'lik 0.5 ml FeCl₃ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okundu. Kör olarak destile su kullanıldı ve grafiği çizildi (Şekil 3.2). 20 µg/ml ye karşılık gelen absorbans değerleri Tablo 4.1. de verilerek mukayese edildi.

2.7.5. Ferröz İyonları (Fe²⁺) Şelatlama Aktivitesi:

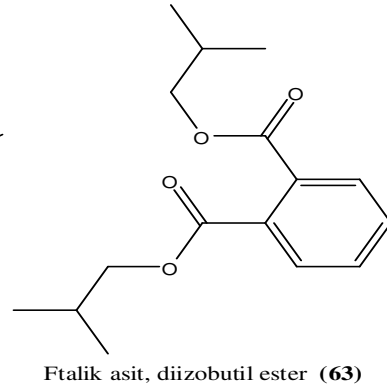
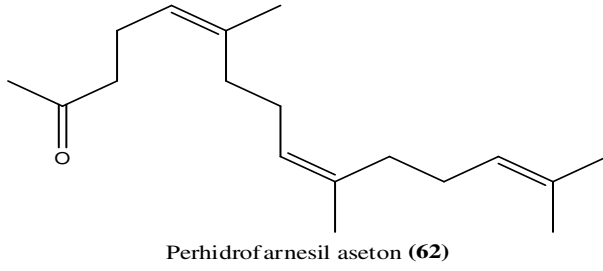
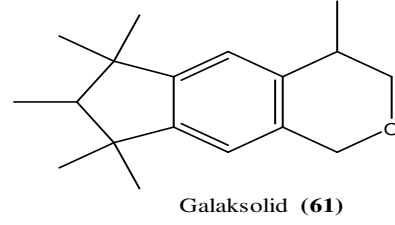
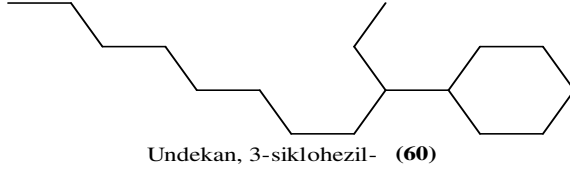
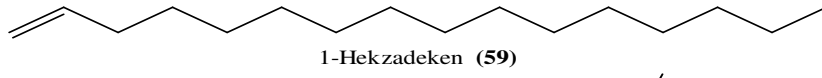
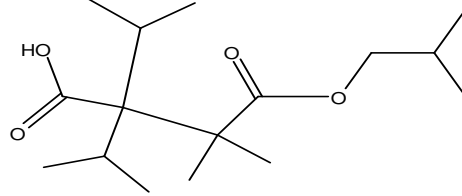
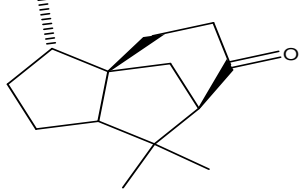
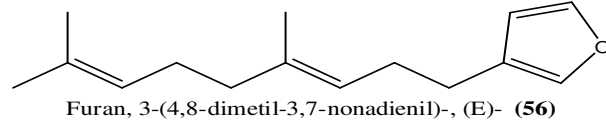
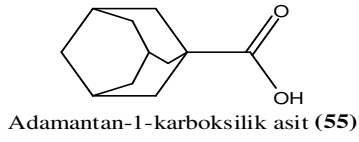
Metal şelatlama aktiviteleri Dinis ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı (Dinis, Maderia, Almeida, 1994). Bu işlem için 2 mM'lik ve 0.05 ml FeCl₂.4H₂O ve 0.35 ml saf su içeren çözelti, değişik konsantrasyonlarını oluşturacak şekilde değişik miktarlarda numune ihtiva eden 0.2 ml'lik çözeltiye ilave edildi. Son hacim 4 ml olacak şekilde destile etanol ilave edildi. Reaksiyon 0.2 ml ve 5 mM'lik ferrozin çözeltisi ilave edilmesiyle başlatıldı. Çözelti vortekste kuvvetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'de absorbansı etanoldan oluşan köre karşı kaydedildi. grafiği çizilerek EC₅₀ değerleri hesaplandı (Şekil 3.6, Tablo 4.2.).

3. BULGULAR

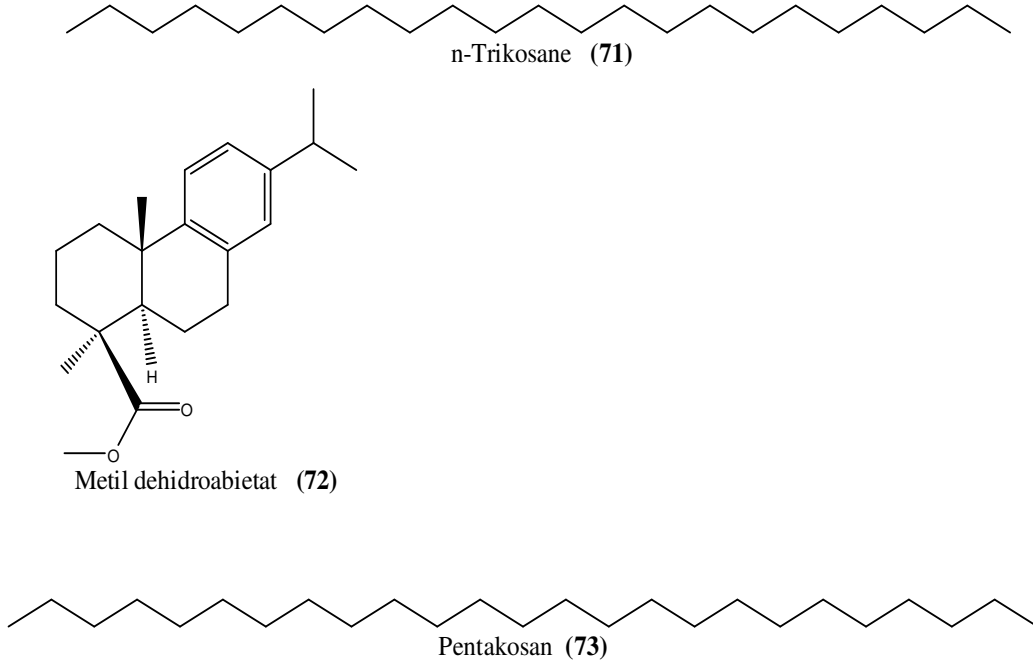
Yapılan çalışmada *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinin uçucu yağ bileşenlerinin tayini için GC/MS cihazı kullanıldı. Bu bitkiden elde edilen toplam 31 adet bileşiğin yapıları aydınlatıldı. Yapısı aydınlatılan bileşikler sırası ile, 1-Okten-3-ol (43), 2-Heptanol,6-metil (44), indan (45), 1H-inden, 2,3-dihidro-5-metil- (46), α -Kubeben (47), 2,4-dekadienal (48), Kopaen (49), 2-Undesenal (50), β -Damaskenon (51), N-Metilbenzamid (52), 5,9-Undekadien-2-on, 6,10-dimetil-, (E)- (53), β -siklositridenaseton (54), Adamantan-1-karboksilik asit (55), Furan, 3-(4,8-dimetil-3,7-nonadienil)-, (E)- (56), 15-nor-Funebran-3-on (57), 2,2,4-trimetil-3-karboksipropil pentanoik asit izobutil ester (58), 1-hekzadisın (59), Undekan, 3-sikloheksil- (60), Galaksolid (61), Perhidrofarnesil aseton (62), fitalik asit, diizobutil ester (63), n-Nonadisın (64), n-hekzadesanoik asit (65), hekzadesanoik asit, etil ester (66), Heneikosan (67), fitalik asit, izoheksil 3-metilbut-3-enil ester (68), 1-Fenantrinkarboksaldehit, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-oktahidro-1,4a-dimetil-7-(1-metiletil)-, [1R-(1 α ,4a β ,10a α)]-(69), 1- Fenantrinkarboksilik asit, 7-etenil-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-dodekahidro-1,4a,7-trimetil-,metilester, [1R-(1 α ,4a β ,4b α ,7 α ,10a α)]- (70), n-Trikosan (71), Metil dihidroabitat (72), Pentakosan (73),'dır. Bu çalışma sonucu yapıları aydınlatılan 31 adet bileşiğin formülleri aşağıda görülmektedir.



Şekil 3.1. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinden elde edilen bileşiklerin kimyasal yapıları



Şekil 3.2. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinden elde edilen bileşiklerin kimyasal yapıları



Şekil 3.3. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinden elde edilen bileşiklerin kimyasal yapıları

Bitkiden izole edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktiviteleri de incelendi. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *Grandiflorus* bitkisine ait uçucu yağın *B. cereus*, *E. coli*, *E.coli* O157:H7 ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlendi. *Sac. cerevisiae* ve *C. albicans* cinsi mayalar üzerinde etkili olduğu halde analizde çalışılan küfler üzerinde antifungal aktivite göstermediği gözlemlendi.

Çalışmanın ikinci kısmı olan sentez basamağında ise literatürde kayıtlı olmayan 3 yeni bileşik sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında, deneysel kısımda verilen NMR, IR, UV-Vis, kütle ve elementel analiz verileri kullanılmıştır. Çalışmada sentezlenen bileşiklerin NMR spektrumları 400 MHz duyarlılıktaki NMR cihazlarında, CDCl_3 içinde çözülerek alınmıştır. ^1H -NMR Varian 400MHz spektrometre, ^{13}C -NMR Varian 100 MHz spektrometre cihazları kullanılmıştır. Spektrumlar fid datası olarak alınıp Mestrec programı kullanılarak etkileşim sabitleri belirlenmiştir. IR spektrumları elmas kristal aparatı kullanılarak alınmış ve bu spektrumlarda ortaya çıkan karakteristik titreşimler değerlendirilmiştir. Ayrıca elementel analizleri Leco CHNS-932 (Michigan,USA) cihazı ile yapılan bu yeni bileşiklerin yapıları,

Agilent-7890B marka gaz kromatografisi cihazı ile Agilent 5975C Series GC/MSD marka kütle spektroskopisi cihazıyla alınan kütle spektrumlarıyla desteklenmiştir. Yeni bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan NMR, elementel analiz, IR ve kütle spektral verileri aşağıda tablolar halinde verilmiştir.

3.1. ((6,6-dimetilbisiklo[3.1.1]hept-2-en-2-il)metil)(2,4-dinitrofenil)sülfan (39):

Erime Noktası: 106-107°C; ¹H -NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 9.02 (d, J = 3.01 Hz, aromatik, 1H), 8.32 (dd, J = 10.21, 3.01 Hz, AB sisteminin A kısmı, aromatik, 1H), 7.61 (d, J = 10.21 Hz, AB sisteminin B kısmı, aromatik, 1H), 5.38 (bs, olefinik, 1H), 3.81 (s, SCH, 2H), 2.66-2.60 (m, metilenik, 2H), 2.50-2.44 (m, CH, 1H), 2.12-2.02 (m, metilenik, 2H), 1.71 (d, J = 11.45 Hz, CH, 1H), 1.35 (s, CH₃, 3H), 0.87 (s, CH₃, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 148.2 (C), 147.3 (C), 145.1 (C), 143.8(C), 127.8 (CH), 126.5 (CH), 121.9 (CH), 115.1 (CH), 51.2, 41.5, 41.3, 40.8, 34.1, 28.5, 26.1, 22.6. IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3082, 2945, 1648, 1585, 1531, 1468, 1354, 1312, 1247, 1144, 1071, 1043, 916, 832. **Elementel Analiz:** Hesaplanan C₁₆H₁₈N₂O₄S: C 57.47, H 5.43, N 8.38; Bulunan: C 57.41, H 5.48, N 8.31.

3.2. (2,4-dinitrofenil)((4-(prop-1-en-2-il)sikloheks-1-enil)metil)sülfan (41):

Erime Noktası: 110-112°C; ¹H -NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 9.15 (d, J = 2.52 Hz, aromatik, 1H), 8.41 (dd, J = 9.03, 3.04 Hz, AB sisteminin A kısmı, aromatik, 1H), 7.65 (d, J = 9.03 Hz, AB sisteminin B kısmı, aromatik, 1H), 5.78 (bs, olefinik, 1H), 4.70 (s, olefinik, 1H), 4.66 (s, olefinik, 1H), 4.14 (s, SCH₂, 2H), 2.57 (tt, J = 10.76, 5.21, 5.21 Hz, metilenik, 2H), 2.31 (m, metilenik, 2H), 2.28 (m, metilenik, 2H), 2.03-1.91 (m, metilenik, 1H), 1.83 (s, CH₃, 3H), ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 147.6 (C), 147.4 (C), 145.9 (C), 144.0 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.4 (CH), 127.3 (CH), 122.7 (CH), 110.1 (CH), 47.9, 44.3, 36.1, 33.6, 32.4, 21.2. IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3111, 2918, 2871, 1886, 1672, 1596, 1512, 1453, 1354, 1071, 1052, 923, 832. **Elementel Analiz:** Hesaplanan C₁₆H₁₈N₂O₄S: C 57.47, H 5.43, N 8.38; Bulunan: C 57.39, H 5.51, N 8.29.

3.3. ((2-kloro-7,7-dimetilbisiklo[2.2.1]heptan-1-il)metil)(2,4-dinitrofenil)sulfan (42):

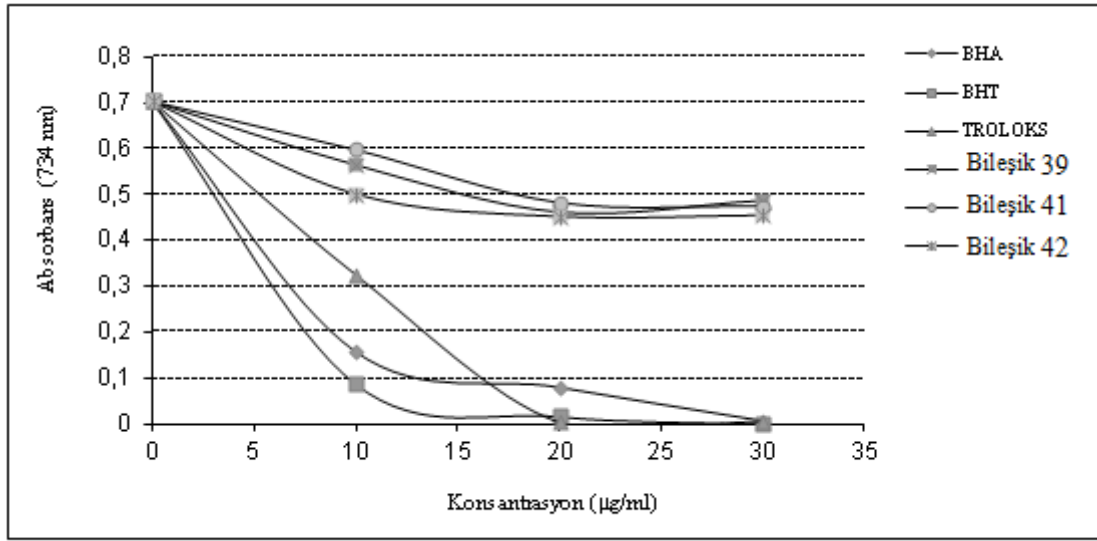
Erime Noktası: 191-193°C; ¹H -NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.91 (d, J = 2.96 Hz, aromatik, 1H), 8.38 (dd, J = 9.52, 2.96 Hz, AB sisteminin A kısmı, aromatik, 1H), 7.42 (d, J = 9.54 Hz, AB sisteminin B kısmı, aromatik, 1H), 4.41 (m, ClCH, 1H), 3.71 (s, SCH₂, 2H), 2.68 (tt, J = 10.76, 5.21, 5.21 Hz, metilenik, 2H), 2.43 (m, metilenik, 2H), 2.21 (m, metilenik, 2H), 2.01-1.85 (m, metilenik, 1H), 1.12 (s, CH₃, 3H), 1.10 (s, CH₃, 3H), ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ 148.2 (C), 146.1 (C), 141.9 (C), 126.5 (CH), 126.3 (CH), 120.8 (CH), 65.3, 56.7, 53.1, 51.2, 46.2, 43.1, 40.2, 39.3, 22.1, 21.2. IR (CH₂Cl₂, cm⁻¹): 3123, 2987, 2858, 1593, 1554, 1453, 1372, 1314, 1281, 1071, 1023, 917, 830. **Elementel Analiz:** Hesaplanan C₁₆H₁₉ClN₂O₄S: C 51.82, H 5.16, N 7.55; Bulunan: C 51.89, H 5.09, N 7.49.

Tablo 3.1. Sentezlenen bileşiklerin verim ve kütle spektrum değerleri (m/z)

Bileşik	Molekül Kütlesi (g/mol)	Spektrum Değerleri	Reaksiyon Verimi
(39)	334.10	334[M] ⁺	% 52
(41)	334.10	335.10[M+1] ⁺	% 35
(42)	370.08	371.08[M+1] ⁺	% 12

Tablo 3.2. Sentezlenen bileşiklerin elementel analiz değerleri

Bileşik	Hesaplanan (Bulunan) Elementel Analiz Sonuçları (%)		
	C	H	N
(39)	57.47 (57.41)	5.43 (5.48)	8.38 (8.31)
(41)	57.47 (57.39)	5.43 (5.51)	8.38 (8.29)
(42)	51.82 (51.89)	5.16 (5.09)	7.55 (7.49)

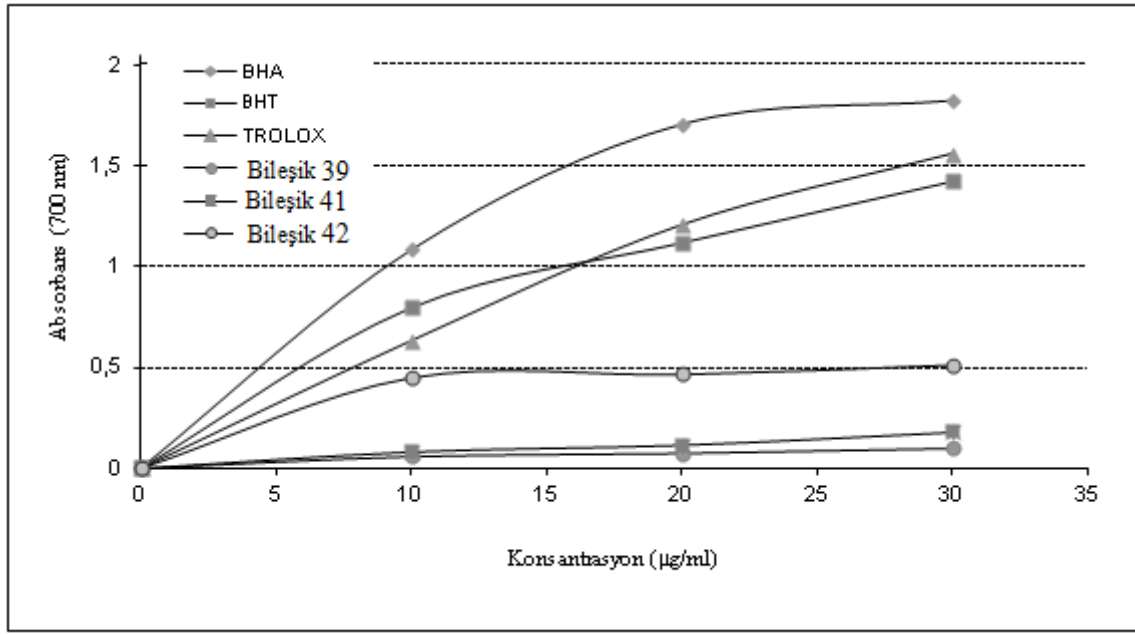


Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin (10-30 g/ml) ABTS⁺⁺ giderme aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırılması

Tablo 3.3. Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin ABTS⁺⁺ giderme aktivitesinde EC₅₀ değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırmaları

Standartlar ve Moleküller	[EC ₅₀] (µg/ml)
BHA	9,66
BHT	8,14
Troloks	11,21
Bileşik 39	42,05
Bileşik 41	41,64
Bileşik 42	37,36

Moleküller ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ABTS⁺⁺ giderme aktivitesi sergilediler: BHT > BHA > Troloks > Bileşik 42 > Bileşik 41 > Bileşik 39

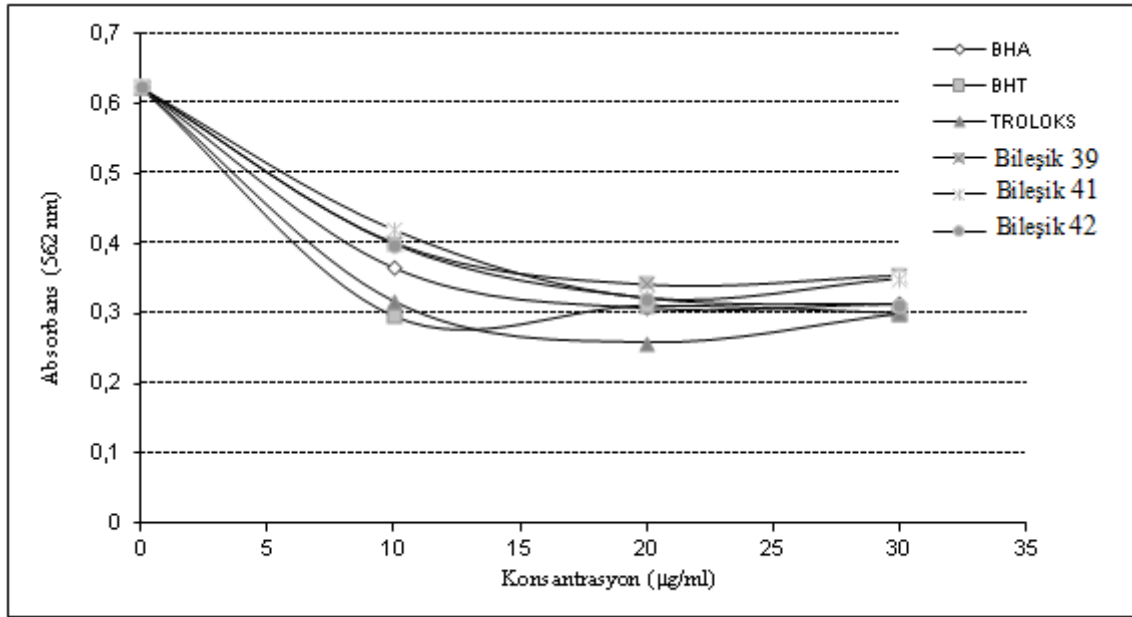


Şekil 3.5. Farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) moleküllerin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kuvvetlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırması

Tablo 3.4. 20 µg/mL konsantrasyonunda moleküllerin ferik iyonlarını (Fe^{3+}) indirgeme kapasitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırmaları

Standartlar ve moleküller	Absorbans (700 nm) (20 µg/ml)
BHA	1,705
BHT	1,121
Troloks	1,205
Bileşik 39	0,075
Bileşik 41	0,115
Bileşik 42	0,469

20 g/ml moleküllerin (Fe^{3+}) indirgeme kapasiteleri karşılaştırıldığında BHA > Troloks > BHT > Bileşik 42 > Bileşik 41 > Bileşik 39 olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.6. Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin (10-30 µg/ml) metal iyonlarını şelatlama aktivitelerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırması

Tablo 3.5. Farklı konsantrasyonlardaki moleküllerin ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama aktivitelerinin EC_{50} değerlerinin birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve troloks ile karşılaştırmaları

Standartlar ve moleküller	[EC_{50}] (µg/ml)
BHA	23,64
BHT	22,58
Troloks	21,12
Bileşik 39	30,86
Bileşik 41	27,71
Bileşik 42	25,15

Moleküller ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ferröz iyonlarını (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi sergilediler: Troloks > BHT > BHA > Bileşik 42 > Bileşik 41 > Bileşik 39.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada *Rhinanthus angustifolius* subsp. *Grandiflorus* bitkisinin GC-MS analizi sonucu 31 adet doğal bileşiğin yapısı aydınlatıldı. Bitkilerin uçucu bileşenlerinin GC spektrumu Ek Şekil 6.1.'de görülmektedir. Yapısı aydınlatılan bileşikler, bu bileşiklerin alıkonma indeksleri (Exp. RI), yüzde oranları (%M), cihaz kütüphanesiyle benzeşme oranları (B) ve literatür RI değerleri (LRI/MS) Tablo 7'de görülmektedir. Bu bileşiklerin yapılarının aydınlatılması, cihazda mevcut olan NIST ve Willey kütüphanelerinde bulunan bileşiklerin kütle spektrum değerleri ve alıkonma zamanları (RT) ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Aydınlatma yapılırken %85 ve üzerinde benzeşme oranı olan bileşikler dikkate alınmıştır. Alıkonma indeksleri (RI) , (C6-C32) karbon sayılı standart hidrokarbonların alıkonma zamanları baz alınarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.1. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *Grandiflorus* bitkisinin uçucu bileşenlerinin GCMS analiz sonuçları

No	Compounds	Retention Time	Peak area [%]	Exp. Det. RI ^a	Literature RI ^b	Identification
1	1-Okten-3-ol	9.75	0.94	944	945	RI [7], MS
2	2-Heptanol, 6-metil-	10.021	0.38	952	950	RI [8], MS
3	indane	12.865	0.30	1026	1027	RI [9], MS
4	1H-indene, 2,3-dihidro-5-metil-	16.333	25.13	1129	1131	RI [9], MS
5	α -Cubebene	25.532	19.27	1309	1310	RI [10], MS
6	2,4-Decadienal	26.148	1.18	1324	1325	RI [11], MS
7	Copaene	27.026	3.12	1344	1344	RI [12], MS
8	2-Undecenal	27.947	0.31	1365	1366	RI [13], MS
9	β -Damascenone	28.975	0.45	1389	1389	RI [14], MS
10	N-Metilbenzamid	29.079	0.63	1391	1390	RI [15], MS
11	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (E)-	31.728	0.54	1455	1456	RI [16], MS
12	β -Cyclocitrylideneacetone	33.193	0.19	1490	1493	RI [17], MS
13	Adamantane-1-carboxylic acid	33.596	1.05	1501	1498	RI [18], MS
14	Furan, 3-(4,8-dimethyl-3,7-nonadienyl)-, (E)-	34.763	1.02	1536	1554	RI [19], MS
15	15-nor-Funebran-3-one	37.177	0.27	1591	1599	RI [29], MS
16	2,2,4-trimethyl-3-	37.541	0.27	1599	1581	RI [20], MS

	Carboxyisopropyl pentanoic acid isobutyl ester					
17	1-Hexadecene	38.025	15.59	1613	1613	RI [21], MS
18	Undecane, 3-cyclohexyl-	41.742	0.59	1717	1723	RI [21], MS
19	Galaxolide	46.143	2.59	1839	1838	RI [30], MS
20	Perhydrofarnesyl acetone	46.403	1.89	1847	1847	RI [22], MS
21	Phthalic acid, diisobutyl ester	47.261	0.36	1873	1873	RI [23], MS
22	n-Nonadecane	48.206	0.37	1900	1900	RI [24], MS
23	n-Hexadecanoic acid	50.339	12.14	1964	1964	RI [25], MS
24	Hexadecanoic acid, ethyl ester	51.293	0.09	1995	1995	RI [26], MS
25	Heneicosane	54.553	1.51	2100	2100	RI [24], MS
26	Phthalic acid, isohexyl 3-methylbut-3-enyl ester	57.501	0.67	2198	2198	RI [32], MS
27	1-Phenanthrenecarboxaldehyde, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, [1R-(1 α ,4 α β ,10 α)]-1-Phenanthrenecarboxylic acid, 7-ethenyl-	59.331	0.54	2262	2263	RI [31], MS
28	1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10a-dodecahydro-1,4a,7-trimethyl-, methyl ester, [1R-(1 α ,4 α β ,4 β a,7 α ,10 α)]-	59.964	3.82	2286	2289	RI [27], MS
29	n-Tricosane	60.376	2.92	2300	2300	RI [27], MS
30	Methyl dehydroabietate	61.502	0.59	2339	2336	RI[27], MS
31	Pentacosane	66.419	1.26	2500	2500	RI[24], MS
Total Area %		99.46				

a: Uygun sıcaklık programı kullanarak tutma indeksini hesaplama n-alkans HP-5MS, 30. m/0.32 mm/0.25 μ m, He, 3. K/min; T_{start}: 60. C; T_{end}: 230. C

b: Literatürde açıklanan tutma indeksi

Elde edilen uçucu yağlar üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite testleri agar-well difüzyon metodu ile Tablo 8’de mikroorganizmalara karşı yapılmıştır. Bitkinin uçucu yağı elde edilen metanol ekstraktına göre daha fazla mikroorganizma üzerinde etki göstermiştir. Bitkiden elde edilen uçucu yağ en fazla *E.coli* O157:H7 bakterisi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu gram pozitif bakteri üzerinde düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğu gözlemlenmiştir. Aynı mikroorganizma üzerinde metanol ekstraktının hiçbir

inhibitif göstermediği tespit edilmiştir. Bitkiden elde edilen uçucu yağ sırasıyla *B. cereus*, *E. coli*, *E.coli O157:H7* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktiviteye ve *Sac. cerevisiae* ve *C. albicans* cinsi mayalar üzerinde ise antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde çalışma sonunda *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinin metanol ekstraktının ise *B. cereus* ve *E. coli* bakterileri üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *Grandiflorus* bitkisinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivite sonuçları

Bakteriler	Uçucu Yağ			
	%1	%2	%5	%10
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	12,01±0,10	10,24±0,10	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-
<i>Ent. cloacae</i>	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	10,64±0,10	8,19±0,15	-	-
<i>E.coli O157:H7</i>	13,13±0,10	10,20±0,10	8,56±0,10	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>L.monocytogenes</i>	-	-	-	-
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	-
<i>Pseu. aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Sal. typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	8,14±0,10	-	-	-
Maya				
<i>Sac. cerevisiae</i>	5,01±0,15	-	-	-
<i>C. albicans</i>	7,19±0,10	-	-	-
<i>A.niger</i>	-	-	-	-
<i>A.flavus</i>	-	-	-	-
<i>Penicillium</i>	-	-	-	-

Bir çift bağ içeren β -Pinen (**18**), bir monoterpen olup gerilimli bir bileşiktir. Dolayısıyla, bu bileşik 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür (**26**) ile katılma tepkimeleri sonucunda kükürt içeren monoterpen türevleri verecektir. Bu monoterpen türevleri büyük oranda aynı zamanda da birer sikloheksan türevleri olacaktır. Bundan dolayı, β -Pinen (**18**) ile 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür (**26**)'nın oda sıcaklığında reaksiyonu yapıldı. Reaksiyon karışımı silika-jel kolon yapıldı ve üç ürün izole edildi.

İzole edilen 3 ürünün NMR spektrumları Ek.Şekil 6.2-6.7.'de bulunmaktadır. Bu üç ürünün yapıları birbirinden farklıdır. Çünkü bunların birinde hiç olefinik çift bağ yokken, birinde tek diğerinde de iki olefinik çift bağın olduğu onların NMR spektrumlarından anlaşıldı. Tek olefinik çift bağ içeren bileşikteki olefinik hidrojen 5.38 ppm'de geniş singlet olarak rezonans olmaktadır. ^{13}C NMR spektrumunda gözlenen toplam 16 tane C pikinin 4 tanesi kuarterner karbonlara ait, 4 tanesi aromatik CH ve 8 tanesi de metilenik karbonlara ait piklerdir. Ayrıca, bu molekül bir tane RS (RS = 2,4-dinitrobenzensülfenil) grubu içermekte ve molekülde hiç klorür içermemektedir. Bu molekül **39** olabilir. Ayrıca GC-MS ile alınan kütle spektrumlarında $334[\text{M}]^+$ da moleküler iyon pikinin gözlenmiş olması (Tablo 3.1.) ve bileşiğe ait elementel analiz sonuçlarının uyumu yeni bileşiğin önerilen yapısını desteklemektedir (Tablo 3.2.).

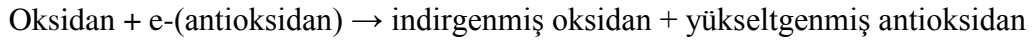
İki olefinik çift bağ içeren moleküldeki olefinik hidrojenler 5.78 ppm geniş singlet ve 4.70 ve 4.66 ppm'lerde iki farklı singlet olarak rezonans olmaktadır. Ayrıca, bu bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda (EK Şekil 6.4.) iki adet olefinik kuarterner ve bir CH ve birinde CH_2 karbonunun olduğunu göstermektedir. Bu molekülün bir adet de RS grubu içerdiği ve RS'nin bağlı olduğu karbondan da bir hidrojenin olduğu da anlaşılmaktadır. Bu ürün **41** olabilir. Bunun yanı sıra bu bileşiğin GC-MS ile alınan kütle spektrumlarında $335[\text{M}+1]^+$ da moleküler iyon pikinin gözlenmiş olması ve bileşiğe ait elementel analiz sonuçlarının teorik değerlerle uyumu yeni bileşiğin yapısını desteklemektedir (Tablo 3.2.).

NMR spektrumlarına göre (EK Şekil 6.6.) hiç olefinik çift bağ içermeyen ürünün RS ve Cl grupları içerdiğini göstermektedir. Ayrıca bu molekülün kuarterner karbonlara bağlı 2 adet metil grupları (1.12 ve 1.10 ppm'lerde) ve Cl'un bağlı olduğu karbonlarda da birer hidrojenin de olduğu anlaşıldı. Bu ürün de **42** olabilir. Bileşik **42**'nin ^1H -NMR spektrumunda klor'un bağlı oldukları karbondan bağlı hidrojenler 4.41 ppm multipl olarak rezonans olurken kükürtün bağlı olduğu karbondan bağlı hidrojenler 3.71 ppm'de singlet olarak rezonans olmaktadır. ^{13}C NMR spektrumunda gözlenen toplam 16 tane C pikinin 3

tanesi kuvarterner karbonlara ait, 3 tanesi aromatik CH ve 10 tanesi de metilenik karbonlara ait piklerdir. Yine bileşiğin GC-MS ile alınan kütle spektrumlarında 371[M+1]⁺ da moleküler iyon pikinin gözlenmiş olması (Tablo 3.1.) ve bileşiğe ait elementel analiz sonuçlarının teorik değerlerle uyumu yeni bileşiğin yapısını desteklemektedir (Tablo 3.2.).

Elde edilen yeni ürünlerin antioksidan ve radikal giderici özellikleri gıda mühendisliği laboratuvarlarında çalışıldı. DPPH[•], ABTS^{•+} ve DMPD^{•+} radikallerinin kullanımına dayanan metotlar, saf maddelerin, yiyecek, içecek ve bitkisel ekstraların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için sıklıkla kullanılır. Ayrıca DPPH[•], ABTS^{•+} ve DMPD^{•+}+giderme metotları hızlı, basit, seçici ve tekrarlanabilir prosedürler olmalarından dolayı saf maddelerin, ekstre veya izole bileşiklerin aktivitesini belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Özçelik, Lee, Min, 2003) . Bu metotların esası spektrofotometrik elektron transferine dayanır.

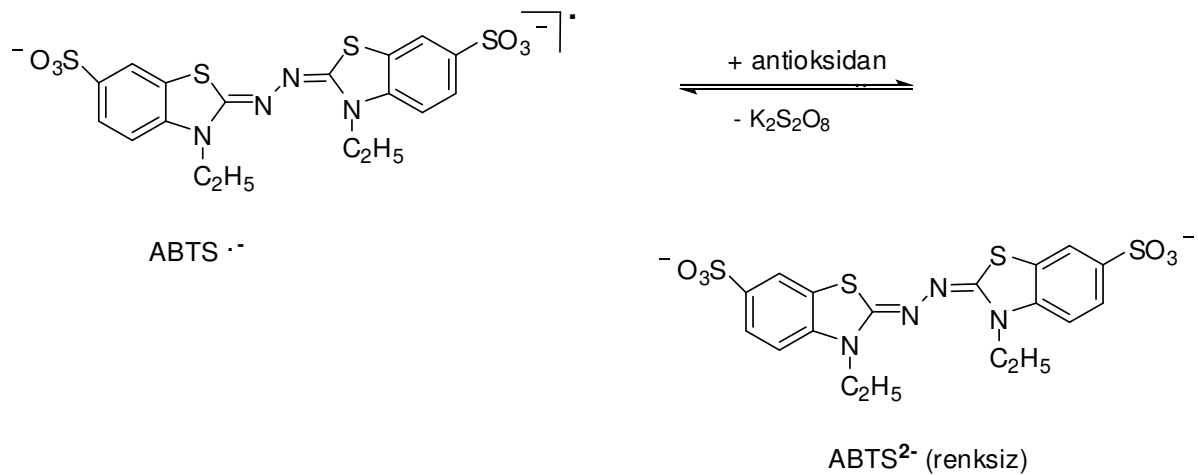
Spektrofotometrik elektron transferine dayanan metotlar; bir reaksiyon karışımında iki bileşen içerir. Bunlar antioksidan ve oksidandır. Oksidan antioksidandan bir elektron alır ve bu oksidanda renk değişimine neden olur. Renk değişiminin derecesi antioksidan derişimiyle orantılıdır (Huang, Ou, Prior, 2005).



Bu metotlardan biri olan ABTS radikali giderme metoduna göre öncelikle ABTS radikali oluşturmak gerekmektedir. Burada tanımlanan ABTS oluşumu için geliştirilen teknik, ABTS ve potasyum persülfat (K₂S₂O₈) arasındaki reaksiyon sonucu mavi yeşil ABTS kromoforunun doğrudan oluşumu ve oluşan bu radikal katyonun spektrofotometrik olarak 734 nm de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır.

ABTS radikalleri DPPH radikallerinden daha reaktiftirler ve bir H atom transferini gerektiren DPPH ile reaksiyonları farklıdır. ABTS radikalleri bir elektron transferini içerir (Kaviarasan,Naik,Anuradha,Gangabhagirathi,Priyadarsini, 2006).

Aşağıda ABTS radikali giderme reaksiyonu açıkça verilmiştir.



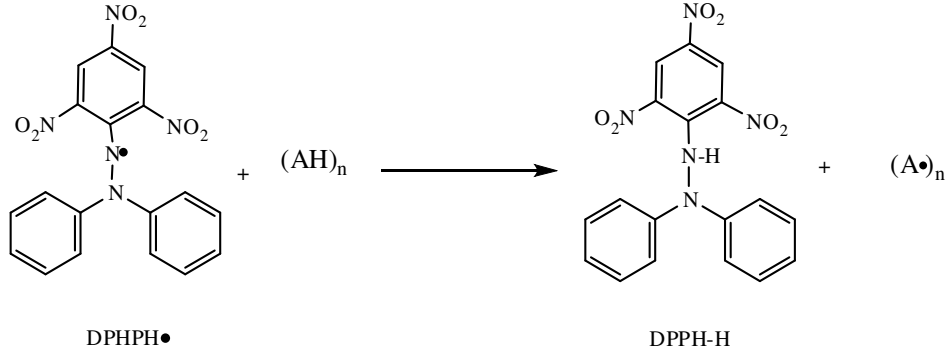
Şekil 4.1. Potasyum persülfat oksidasyonu ile ABTS^{2-} den oksidan $\text{ABTS}^{\bullet+}$ nin oluşması (Huang, Ou, Prior, 2005).

Çalışmamızda ise ABTS radikali giderme metoduna göre; ABTS radikali sentezlenen hedef molekülde yaklaşabileceği tek bölge olan para konumunda ki N atomuna bağlı O atomundan elektron kopararak kendisi radikal özelliğini kaybeder ve NO_2 üzerindeki radikal ise delokalize olur.

Şekil 4.1'deki sonuçlara bakıldığında çalışma kapsamında kullanılan bütün maddelerin ABTS radikallerini giderdiği gözlenmektedir. ABTS radikallerini giderme tayininde de maddelerin EC_{50} değerleri 8-43 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişmektedir. BHA, BHT, ABTS radikali giderme aktivitelerine ait EC_{50} birbirine yakın değerlere sahiptir. Troloksun gidermesi ise biraz daha düşüktür. Çalışmamızda 3. molekül en yüksek ABTS radikali giderme aktivitesine sahiptir.

Yapılacak çalışmalarda ABTS radikalinin önceden oluşturulması gerekirken DPPH radikali için böyle bir durum söz konusu değildir. DPPH radikali mor renkli olup, 517 nm'de maksimum absorbans vermektedir (Prakash, 2001). DPPH radikali, antioksidan maddenin hidrojeni ile birleşerek, tek elektronu indirgenmiş DPPH-H'i oluşturmaktadır (Şekil 4.2).

ABTS radikali hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılır.



Şekil 4.2. Bir antioksidan tarafından DPPH radikalinin giderilmesi

Deneyde kullanılan 3 bileşikte de hidrojen verebilme yeteneğine sahip tek grup kükürt atomuna komşu olan $-\text{CH}_2-$ dir. Fakat Şekil 4.2 de görüldüğü üzere DPPH radikali hacimli bir moleküldür. Aynı şekilde kullanılan moleküllerde bahsedilen bölge $\text{R}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}$ (R =fenil türevi) sterik engelli olduğu için moleküle etkileşemediği düşünülmektedir. Bu durum Huang ve arkadaşlarının (2005) çalışmasında da belirtilmiştir. Çalışmada DPPH radikale sterik ulaşabilme reaksiyonun başlıca belirleyicisi olduğu ve küçük moleküllerin radikale daha kolay ulaşabildiklerinden yüksek antioksidan kapasite değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Huang, Ou, Prior, 2005).

Deneysel çalışmalarda kullanılan üçüncü bir radikal giderme metodu ise DMPD^{*+} giderme aktivitesidir. DMPD^{*+} giderme analizinin temeli, asidik pH ve uygun bir oksidan çözeltinin varlığında DMPD 'nin kararlı ve renkli bir radikal katyonu (DMPD^{*+}) oluşturması esasına dayanır. DMPD^{*+} 505 nm'de maksimum absorbanı gösterir.

Bu metottaki bir problem DMPD nin sadece sulu çözeltide çözünmesi ve hidrofobik antioksidanlar için kullanılmamasıdır (Gülçin, 2012). Deneysel olarak kullanılan moleküller organik çözücülerde çözündüğünden bu metotla çalışmadan sonuç alınamamıştır.

İndirgeme kapasitesi bir bileşiğin antioksidan aktivite sergilemesinde önemli bir faktördür (Meir,Kanner,Akiri,Hadas, 1995). Ancak herhangi bir saf maddenin antioksidan özelliği farklı mekanizmalar üzerinden yürüyebilir. Örneğin, oksidasyonun geçiş metalleri tarafından hızlandırıldığı bir sistemde, antioksidan bileşiğin indirgeme gücü antioksidan

özellik yönünden önemli değildir. Ama bileşiğin sadece metal şelatlama özelliğinin olması bile böyle bir sistemde oksidasyonu durduracak veya hızını yavaşlatacaktır.

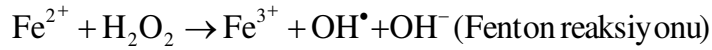
Özetle antioksidan bileşikler antioksidan aktivitelerini geçiş metal iyonlarını bağlama, peroksitleri parçalama, hidrojen abstraksiyonunu engelleme, radikal giderme gibi değişik mekanizmalar ile ortaya koyabilirler (Diplock, 1997; Mavi, 2005).

Antioksidanlar indirgeyici olabilme özelliğinden yola çıkarak çalışmamızda Fe^{+3} indirgeme metodu kullanılmıştır. Kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir (Gülçin, 2006). Antioksidan madde gibi indirgeyici ajanların varlığında Fe^{3+} /ferriksiyanit kompleksi Fe^{2+} /ferriksiyanit kompleksi olan ferröz formuna indirgenir. Oluşan bu kompleks ilave edilen $FeCl_3$ ile Perl's Prussian mavisi $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ kompleks oluşturarak 700 nm'de maksimum absorbands verir (Chung, Chao, Chang, Lin, Chou, 2002).

Moleküllerin ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesi grafiği çizildikten sonra (Şekil 3.2) herbir standart ve moleküller için 20 $\mu g/ml$ 'ye karşılık gelen absorbands değerleri Tablo 3.4.'de verilerek birbirleriyle mukayese edildi.

20 $\mu g/ml$ moleküllerin (Fe^{3+}) indirgeme kapasiteleri karşılaştırıldığında BHA > Troloks > BHT > Bileşik 42 > Bileşik 41 > Bileşik 39 olduğu gözlemlendi.

Ferröz (Fe^{+2}) iyonu gibi iyonik türler, organizmada ROS üretimini kolaylaştırdığı için, demir şelatlama kapasitesi oldukça önemlidir. Metal iyonları şelatlama aktivitesi metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarını engellemek veya geciktirmek için sıklıkla kullanılan önemli bir antioksidan metottur. Demir organizmalar için esansiyel bir mineraldir, fakat aşırısı hücre hasarına sebep olabilir. Geçiş metalleri arasında demir yüksek aktivitesinden dolayı lipitleri oksitleyen en önemli oksitleyici metal olarak bilinir. Metal iyonları arasında, ferröz iyonları (Fe^{2+}), bilinen en önemli prooksidan iyonlardır. Fenton tipi reaksiyonlarda peroksitlerin ortamda bulunmaları esnasında ferrik iyonlar (Fe^{3+}) da meydana gelebilir, fakat ferröz iyonları (Fe^{2+}), ferrik iyonlarından (Fe^{3+}) on kata daha fazla reaktiftirler (Miller, 1996). Bu reaksiyonlar sonucu peroksitlerden daha reaktif olan OH radikalleri de oluşabilmektedir (Köksal, Gülçin, Öztürk, Bursal, 2009; Halliwell, Gutteridge, 1984).

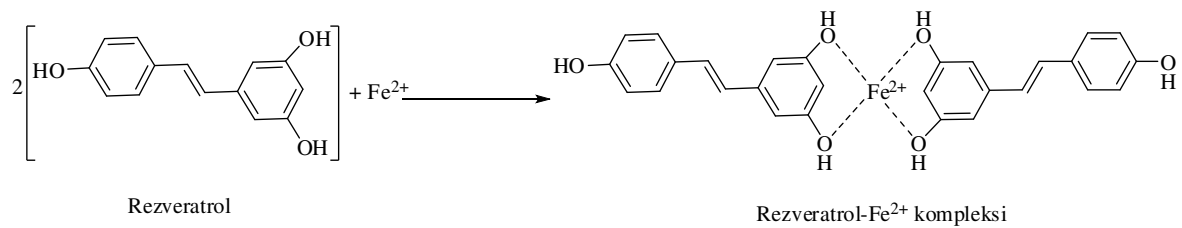


Metal şelatlama kapasitesi lipit peroksidasyonunda katalizlenen geçiş metali konsantrasyonunu azalttığından dolayı önemlidir. Başka bir ifadeyle ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama kapasitesi ferröz iyonları (Fe^{2+}) konsantrasyonlarını minimuma indirme ve dolayısıyla oksidatif hasara sebep olan serbest radikal oluşumu inhibisyonu ile yakından ilgilidir (Öztürk, Gülçin, 2013; Gülçin, Köksal, Elmastaş, 2007).

Ferrozin, ferröz iyonları (Fe^{2+}) gibi iki değerlikli metal iyonları ile kantitatif miktarda bile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm’de maksimum absorbanans sergilemektedir. Metal şelatlayıcı ajanların varlığında ferrozin-metal kompleksi oluşumu bloke olur. Dolayısıyla metal şelatlama aktivitesinde 562 nm’de absorbansta meydana gelen azalma metal şelatasyonunun bir göstergesidir.

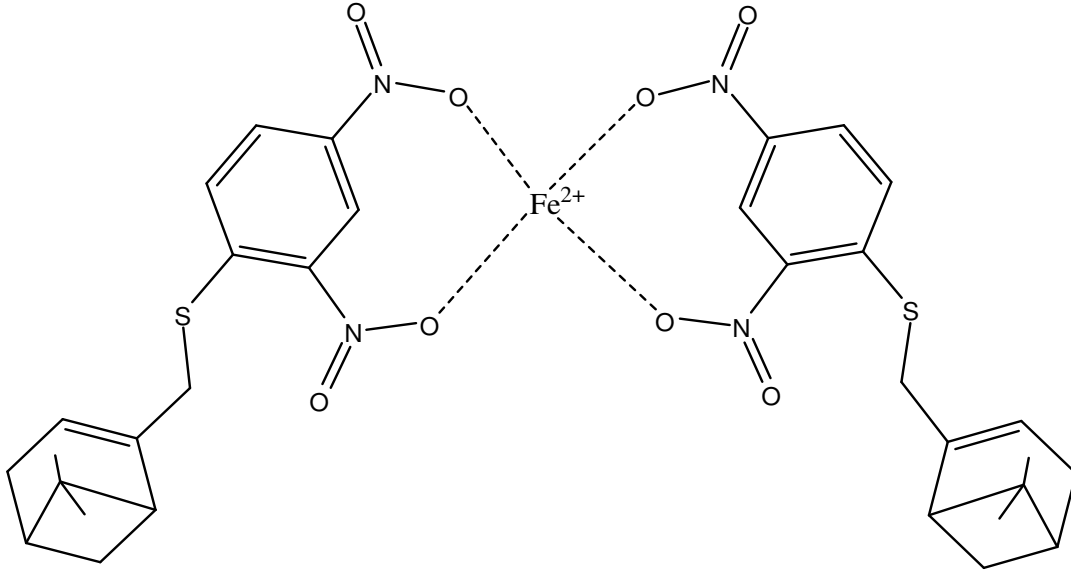
Bununla beraber, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{H}_2\text{PO}_3$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{NR}_2$, $-\text{S}-$ ve $-\text{O}-$ fonksiyonel guruplardan iki veya daha fazlasına sahip olan moleküllerin metalleri kolaylıkla şeklatlayabilecekleri bilinmektedir. Bu gurupların bulunması antioksidan molekülün metal şelatlamada yapı-fonksiyon konfügrasyonunun lehinedir (Öztürk, 2009)

Son zamanlarda yapılan diğer bir çalışmada ise üzüm ve üzüm ürünlerde bol miktarda bulunan trifenolik bir bileşik olan rezveratrolün ferröz iyonları (Fe^{2+}) şelatlama aktivitesi için mümkün olan mekanizma aydınlatılmaya çalışılmıştır (Gülçin, 2010). İki rezveratrol molekülünün ihtiva ettiği her iki difenolik aromatik halkalar arasında bir adet ferröz iyonunun (Fe^{2+}) şelatladığı gözlenmiştir.

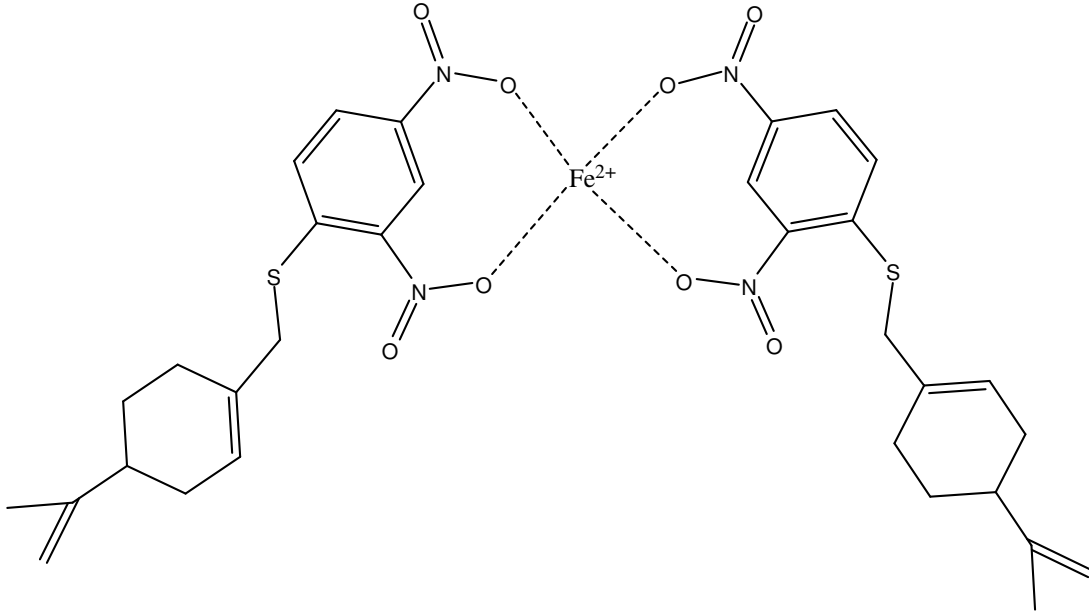


Şekil 4.3. İki molekül rezveratrolun iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Rezveratrol- Fe^{2+} kompleksi oluşurması

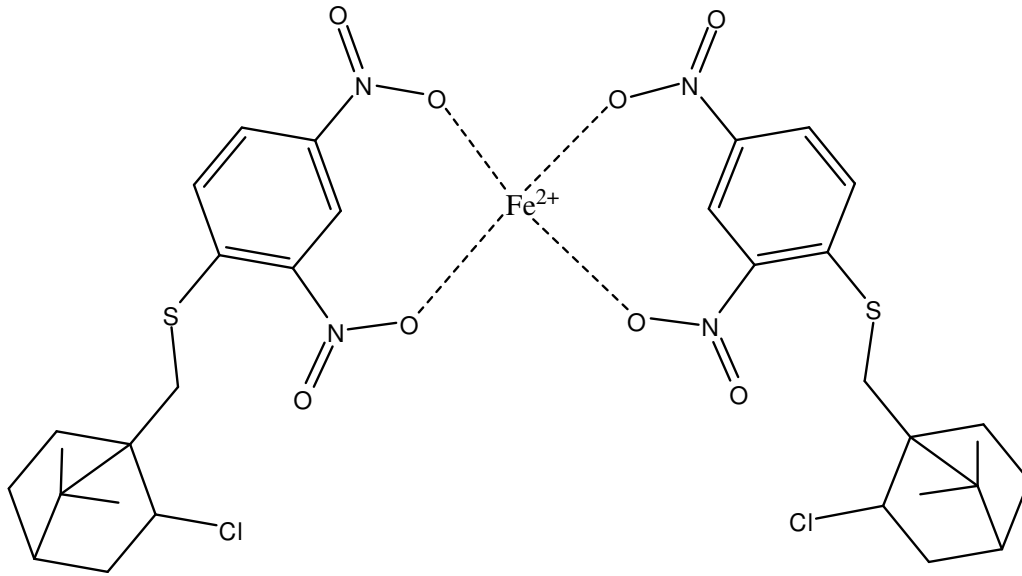
Aynı şekilde moleküllerin muhtemel bağlanma şekilleri ise Şekil 4.4. Şekil 4.5. ve Şekil 4.6’da gösterilmiştir. Bu moleküllerin üçünde rezveratrole benzer bir mekanizma ile metal iyonlarını bağladığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4. Bileşik 39’un iki tanesinin iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Molekül2- Fe^{2+} kompleksi oluşturması



Şekil 4.5. Bileşik 41’in iki tanesinin iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Molekül3- Fe^{2+} kompleksi oluşturması



Şekil 4.6. Bileşik 42'nin iki tanesinin iki adet ferröz iyonu (Fe^{2+}) ile bağlanarak Molekül1- Fe^{2+} kompleksi oluşturması

Metal şelatlama aktivitelerinin EC_{50} değerleri mukayese edildiğinde BHA ve BHT nin şelatlama kapasitelerinin birbirine yakın olduğu Bileşik 47'nin ise en yüksek EC_{50} değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu değer kullanılan standart antioksidanlara göre kıyaslandığında Bileşik 42'nin çok iyi bir metal şelatlama kapasitesi sergilediği gözlenmiştir. Bileşik 39 ve Bileşik 41'in metal şelatlama kapasitelerinin de etkin derecede olduğu verilen tablodan gözlenmektedir (Tablo 3.5.).

Bu sonuçlara bakıldığında çalışmamızda kullanılan ve bir terpen türevi olan β -pinenden sentezlenmiş olan 3 molekülünde antioksidan etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Yaptığımız bu araştırmada *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinin subuharı destilasyonu ile elde edilen uçucu yağından 31 adet doğal bileşiğin yapısı GC-MS yöntemiyle aydınlatıldı. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinden elde edilen uçucu yağların GCMS analizi sonucu 31 adet bileşik doğal halde, alıkonma zamanları ve kütle spektrumları, cihazda bulunan NIST ve Willey kütüphanelerindeki bileşiklerle karşılaştırılarak aydınlatıldı.

Rhinanthus angustifolius subsp. *grandiflorus* bitkisine ait uçucu yağın *B. cereus*, *E. coli*, *E.coli O157:H7* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı aktivite gösterirken, 8 mikroorganizmaya, ve 3 mantara karşı aktivite göstermediği yapılan testler sonucunda gözlemlenmiştir.

Çalışmanın sentez basamağı olan β -pinen (18)'e 2,4-dinitrobenzensülfenil klorür (26)'nın katılması sonucu 3 farklı düzenlenme ürünü elde edildi. Saflaştırma sonucu elde edilen ürünlerin yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı. Gerilimli dörtlü halkaya sahip β -pinen (18)'in katılma reaksiyonunda düzenlenmeye maruz kaldığı anlaşıldı. Birer terpenoid olan ürünlerin anti oksidant antioksidan etkiye sahip olduğu anlaşıldı.

5. KAYNAKLAR

- Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Asekun, O.T.; Olusegun, E.; and Adebola, O., 2007. The volatile constituents of the leaves and flowers of *Kigelia africana* Benth. *Flavour Fragr. J.*, 22, 21-23.
- Assony, S.J., Kharasch N., 1954. The dimerization of diphenylacetylene to a triphenylazulene. *Chem. Ind(London)*, 1388.
- Asuming, W.A.; Beauchamp, P.S.; Descalzo, J.T.; Dev, B.C.; Dev, V.; Frost, S.; and Ma, C.W., 2005. Essential oil composition of four *Lomatium* Raf. species and their chemotaxonomy. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33, 17-26.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. ve Debevere, J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*, *F. Microb.*, 21, 33-42.
- Baytop, T. 1999, *Türkiyede Bitkilerle Tedavi*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 187.
- Benkli, K., 1990. α -Pinen'den α -Terpineol Eldesi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi.
- Bingöl, G., 1976. Lipidler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:41, 77 s, Ankara.
- Blois MS., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 26, 1199-1200.
- Bonaiti, C. Irlinger, F. Spinnler, H.E. and Engel, E., 2005. An iterative sensory procedure to select odor-active associations in complex consortia of microorganisms: application to the construction of a cheese model. *J. Dairy Sci.*, 88, 1671-1684.
- Bravo, A. and Hotchkiss, J.H., 1993. Identification of volatile compounds resulting from the thermal oxidation of polyethylene. *J. Appl. Polym. Sci.*, 47, 1741-1748.
- Ceylan, A., 1987. Tıbbi Bitkiler II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 481, İzmir.
- Champagnat, P. Figueredo, G. Chalchat, J.-C. and Bessiere, J.-M., 2006. Essential oil composition of *Vetiveria nigritana* from Mali, *J. Essent. Oil Res.*, 6, 647-649.

- Chiron, F., Chalchat, C.J., and Garry, P.R., 1997. Photochemical hydroperoxidation of terpenes I. Synthesis and characterization of α -pinene, β -pinene and limonene hydroperoxides. *Photochem. and Photobio.*, 111, 75-86.
- Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., and Chou S.T., (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem* 50, 2454–2458.
- Çelik, E. ve Çelik G. Y., 2007. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5, 2, 1-6.
- Davis, P.H., 1988. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 5, 67-69.
- Dinis T.C.P., Maderia V.M.C., and Almeida L.M., 1994 Action of Fenolic Derivates (acetaminophen, salicylate and 5 aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315, 161-169.
- Diplock A.T., (1997). Will the good fairies please prove us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Radical Research*, 27, 511-532.
- Ekim, T. ve Teucrium L. (Labiate), In: P. H. Davis, 1982. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 7, 53-57.
- Eminagaoglu O. Tepe B. Yumrutas O. Akpulat H.A. Daferera D. Polissiou M. ve Sokmen A, 2007. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten, *Food Chem.*, 100, 339-343.
- Erdemoğlu, N., Küpeli, E. ve Yeşilada, E., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J. Ethnopharmacol*, 89, 123-129.
- Fesenden, R., Fesenden, J., Logue, M., 2001. *Organik Kimya*, Brooks-Cole Publish. Comp. Press., USA.
- Finar I.L., 1975. *Organik Chemistry (Stereochemistry and the chemistry of natural products)*, Vol. 3, Fifth Ed., ELBS Longman.
- Finar I.L., 1975. *Organik Chemistry (Stereochemistry and the chemistry of natural products)*, Vol. 3, Fifth Ed., ELBS Longman.
- Fogliano, V., Verde V., Randazzo G., and Ritieni A., 1999. Method for Measuring Antioxidant Activity and its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040.

- Gas Chromatographic - mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. *Trees*, 22, 531-542.
- Gülçin İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.*, 86, 345-391.
- Gülçin, İ., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitin. *Life Sciences*, 78, 803-811.
- Gülçin İ., Köksal, E., Elmas, M., Aboul-Enein, ve HY. 2007. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C.KOCH var. *joannis*. *Research Journal of Biological Sciences*, 2, 372-382.
- Gülçin İ. 2010. Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innov. Food Sci. Emerg.*, 11, 210-218.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C., 2000. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 11.
- Hogg, D.R., Kharasch N., 1956. Derivatives of Sulfenic Acids. XXV. The Kinetics of the Reaction of 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl Chloride with Cyclohexene. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 2728-2731.
- Halliwell B., and Gutteridge J.MC., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1-4.
- Hardcastle, I., Rowlands, M.G., Barber, A.M., 1999. Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene - measurement of enzymatic activity in 96-well format using Topcount microplate scintillation counting technology. *Biochemical Pharmacology*, 57, 801-809.
- Havlik, A.J., Kharasch N., 1956. Derivatives of Sulfenic Acids. XXIV. Stereochemical Studies of Certain β -Chloroalkyl Aryl Sulfides. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1207.
- Huang D.J., Ou B.X., ve Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem*, 53, 1841-56.
- Ilinca M. Imbrea, Alma L. Nicolini and F. Imbrea, 2012. Valorising Medicinal and aromatic plants from the central area of the Anninei mountains (Caras-severin county). *Research Journal of Agricultural Science*, 44 (2), 178.
- Isidorov, V.A. Lech, P. Zolciak, A. Rusak, N. and Szczepaniak L, 2008. Gas Chromatographic - mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. *Trees*, 22, 531-542.

- Isidorov, V.A. Lech, P. Zolciak, A. Rusak, N. Szczepaniak, L., Konig, W.A. Joulain, D. Hochmuth, D.H., and GC/MS Library:2006. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. retrieved from <http://www.massfinder.com/mfterpenoids.htm>
- Kaviarasan S, Naik GH, Gangabthagirathi R, Anuradha CV, and Priyadarsini In KI. 2006. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. Food Chemistry, 103, 31-37.
- Kharasch N., Havlik, A.J., 1953. Derivatives of Sulfenic Acids. XI. Reactions of Sulfenyl Halides with the cis- and trans-2-Butenes. J. Am. Chem. Soc., 75, 3734-3737.
- Kharasch N., Assony, S.J., 1953. Derivatives of Sulfenic Acids. IX. Reaction of 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl Chloride with Some Symmetrical Alkynes. J. Am. Chem. Soc., 75, 1081-1082.
- Kim, S.B., Shim, C.S., Wada, T., Inove, Y., 2001. Highly diastereoselective photoaddition of methanol to limonene. Tetrahedron Lett., 42, 4341.
- King, M.-F. Hamilton, B.L. Matthews, M.A. Rule, D.C. J. Agric, and Field, R.A., 1993. Isolation and identification of volatiles and condensable material in raw beef with supercritical carbon dioxide extraction. Food Chem., 41, 11, 1974-1981.
- Konig, W.A. Joulain, D. Hochmuth, D.H., and GC/MS Library: 2006. Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. retrieved from <http://www.massfinder.com/mfterpenoids.htm>.
- Köksal E., Gülçin, İ., Öztürk Sarıkaya, S.B., ve Bursal E. 2009. On the in vitro antioxidant activity of silymarin. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 24, 395-405.
- Machiels, D., Van Ruth, S.M., Posthumus, M.A., and Istasse, L. 2003. Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats.
- Malgorzata Kozieradzka-Kiszkurno, And Jerzy Bohdanowicz, 2013., DOI: 10.2478/abcsb-2013-00012 Developmental and cytochemical studies of the endosperm chalazal haustorium of *rhinanthus serotinus* (Scrophulariaceae) Joanna Świerczynska*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 55/1, 99–106.
- Marongiu, B. Porcedda, S. Porta, G.D. and Reverchon, E., 2001. Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata* subsp. *insularis* essential oils by supercritical CO₂. Flavour Fragr. J. 16, 384-388.
- Mavi A., 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.52-53.
- Meir S., Kanner J., Akiri B., Hadas S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. Journal Agricultural Food Chemistry, 43, 1813-1819.

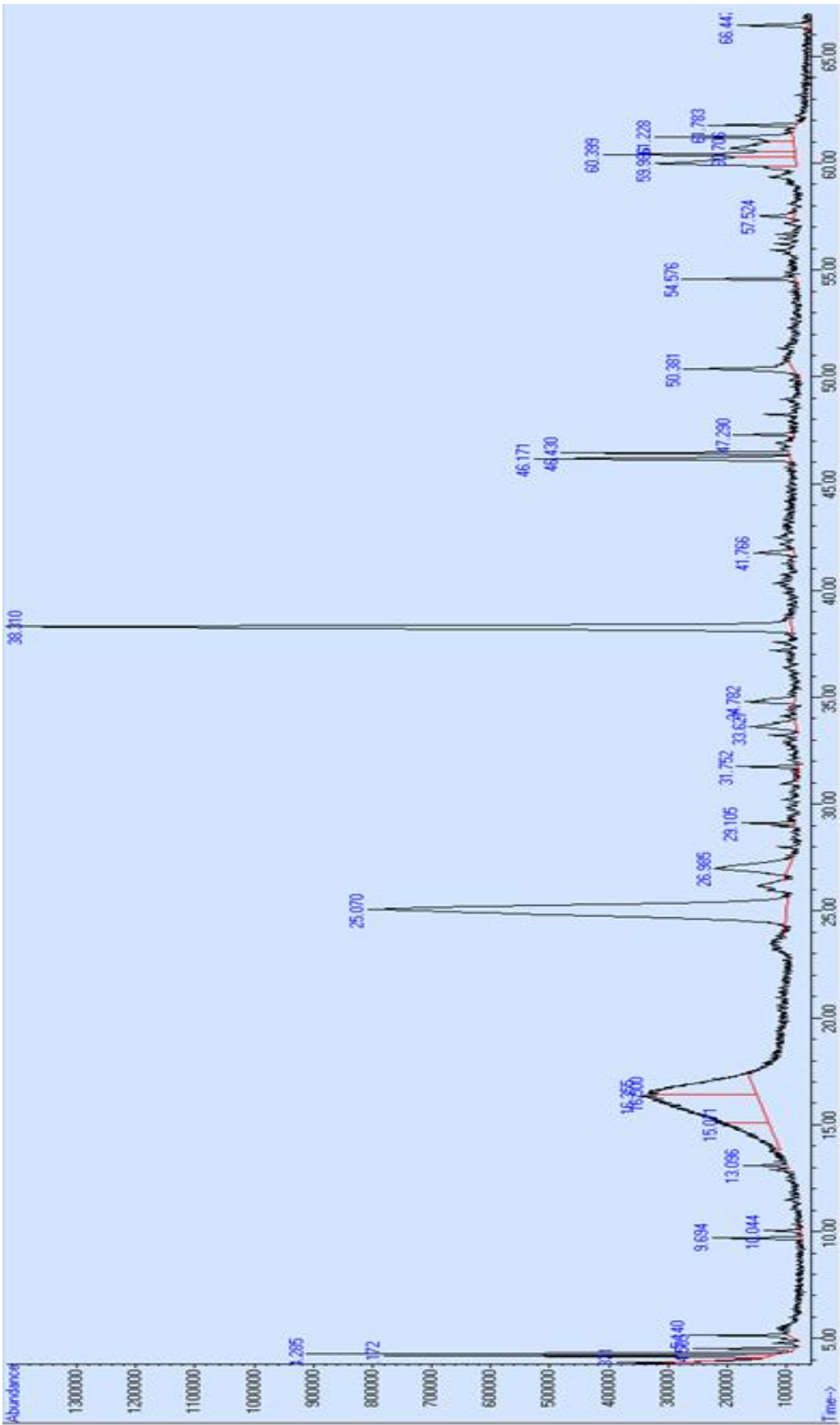
- Miller, DD., (1996). Mineral. Food Chemistry, Fennema, O.R. (Ed.), Dekker: New York, p 618-649.
- Moreno, P.R.H. Lima, M.E.L. Sobral, M. Young, M.C.M. Cordeiro, I. Apel, M.A.A. Limberger, R.P. and Henriques, A.T.,2007. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. Sci. Agr.; (Piracicaba Praz.) 64, 4, 428-432.
- Orr, W.L., Kharasch N., 1953. Derivatives of Sulfenic Acids. XIII. The Reaction of 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl Chloride with Styrene. J. Am. Chem. Soc., 75, 6030-6035.
- Orr, W.L., Kharasch N., 1956. Derivatives of Sulfenic Acids. XXIII. The Effects of para-Substituents in Styrene on the Kinetics and Mechanism of the Reaction with 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl Chloride. J. Am. Chem. Soc., 78, 1201-1206.
- OYAIKU, M.,1986. Studies on Product of Browning Reaction Prepared from Glucose Amine, Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.
- Özcelik, B., Lee, JH., ve Min, DB. 2003. Effects of light, oxygen and pH on the DPPH method to evaluate antioxidants. Journal of Food Sciences, 68, 487-490.
- Öztürk Sarıkaya S.B.,ve Gülçin İ., 2013. Radical Scavenging and Antioxidant Capacity of Serotonin. Current Bioactive Compounds , 9, 143-152.
- Öztürk Sarıkaya S.B., 2009. Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (HCAI ve HCAII) üzerine etkisinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.122.
- Perez, C., Agnese, A.M. ve Cabrera, J.L.,1999. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests, J. Ethnopharmacol, 66, 91-96.
- Prakash, A., 2001. Antioxidant Activity. Medallion Laboratories Analytical Progress, 19, 1-4.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., and Rice-Evans C., 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, Free Radical Bioology and Medicine, 26, 1231-1237.
- Slobodkin, N.R., Kharasch N., 1960. Derivatives of Sulfenic Acids. XXXIX. The Reaction of 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl Chloride with cis-and trans- Stilbene. J. Am. Chem. Soc., 82, 5837-5839.
- Song, C. Lai, W.-C. Madhusudan Reddy, K. and Wei, B., 2003. Temperature-programmed retention indices for GC and GC-MS of hydrocarbon fuels and simulated distillation GC of heavy oils in Analytical advances for hydrocarbon research. Hsu,C.S., ed(s), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 147-193.

- Toroğlu, S. ve Çenet, M.,2006. Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metodlar. KSU.Journal of Science and Engineering, 9, 2, 12-20.
- Tzakou, O. Bazos, I. and Yannitsaros, A, 2007. Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. from Greece. Flavour Fragr. J. 22, 358-362.
- URL-1. <http://www.buzzle.com/articles/aromatherapy-essential-oils.html> Essential Oils. 04. 04. 2008.
- URL-2. http://www.webnaturel.com/index.asp?alt_cat_id=102&cat_id=4&ayrintiid=1853 Holistik Aromaterapi. 04.04.2008.
- URL-3. http://www.tempodergisi.com.tr/saglik_cinsellik/00687 Bir Damla Yağdan Bin Şifa. 04.04.2008.
- URL-4. <http://www.buzzle.com/articles/aromatherapy-essential-oils-methods-extraction-aromatic.html> Aromatherapy Essential Oils - Methods of Extraction of Aromatic Essential Oils. 04. 04. 2008.
- URL-5. <http://www.naturesgift.com/extraction.htm> Carbon Dioxide Extraction. 09.04.08
- URL-6 6.<http://www.selfgrowth.com/articles/MistyRaeCech1.html> CO₂ and SCO₂. 09.04.08.
- Vagionas, K. Ngassapa, O. Runyoro, D. Graikou, K. Gortzi, O. and Chinou, I., 2007. Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania, Food Chem., 105, 1711-1717.
- Wang, Y. Finn, C. Qian, and M.C., 2005. Impact of Growing Environment on Chickasaw Blackberry (*Rubus* L.) Aroma Evaluated by Gas Chromatography Olfactometry Dilution Analysis. J. Agric. Food Chem.,53, 3563-3571.
- Wu, S.; Zorn, H.; Krings, U.; and Berger, R.G., 2005. Characteristic Volatiles from Young and Aged Fruiting Bodies of Wild *Polyporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Fr., J. Agric. Food Chem., 53, 4524-4528.
- Xian Q.; Chen H. Zou H. and Yin D., 2006. Chemical composition of essential oils of two submerged macrophytes, *Ceratophyllum demersum* L. and *Vallisneria spiralis* L., Flavour Fragr. J., 21, 524-526.
- Xian, Q.-M. Chen, H.-D. and Zou, H.-H., 2006. Allelopathic activity of volatile substance from submerged macrophytes on *Microcystin aeruginosa*. Acta Ecologica Sinica, 26, 11, 3549-3554.
- Zaikin, V.G., 2008. Personal Communication: Retention indices measured during the period to 2009, 2009.

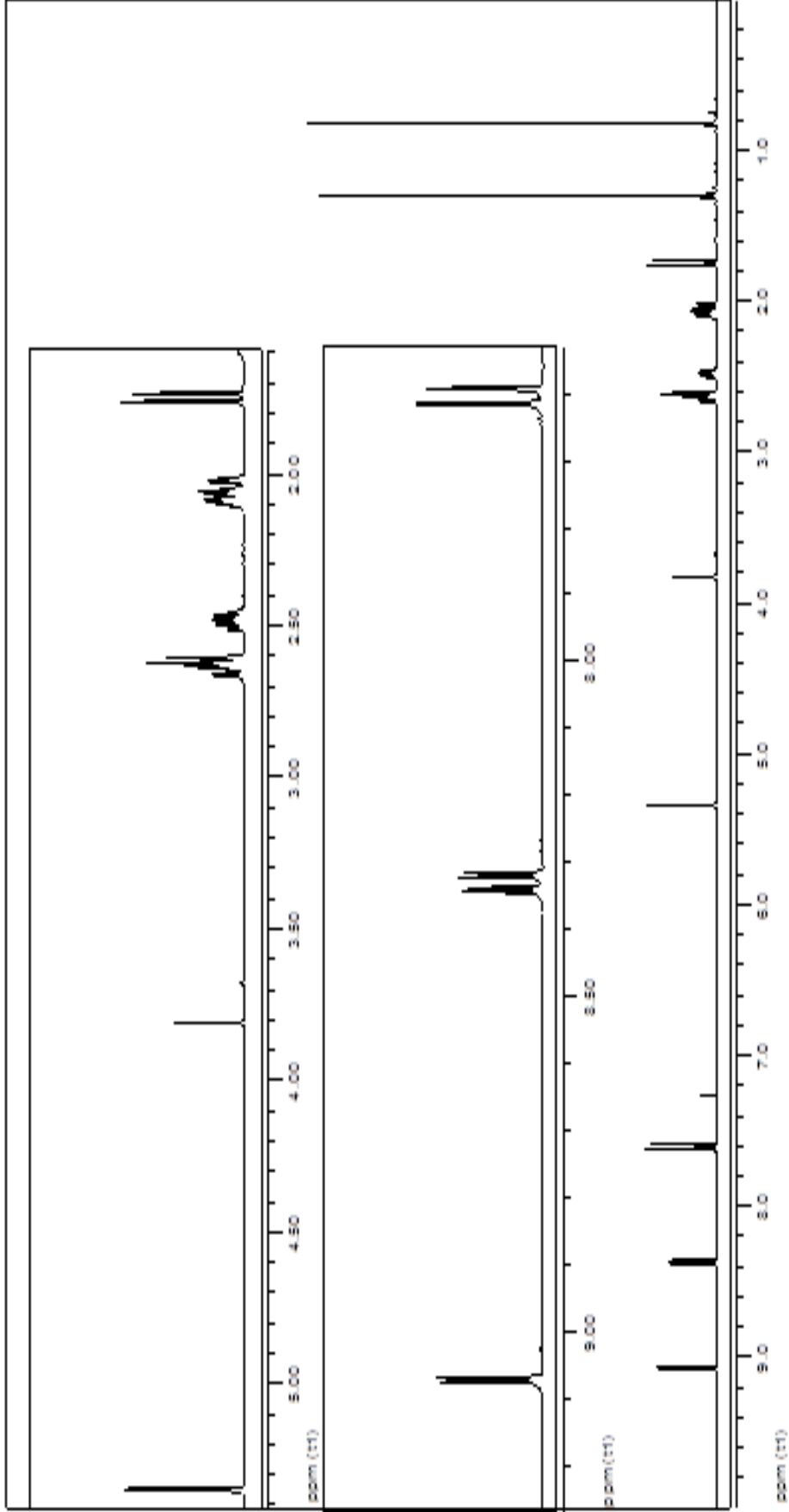
- Zhao, C.-X. Liang, Y.-Z. Fang, H.-Z. and Li, X.-N., 2005. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils, *J. Chromatogr. A*, 1096, 76-85.
- Zhao C.X. Li, X.N. Liang Y.Z. Fang H.Z. Huang L.F. and Guo F.Q., 2006. Comparative analysis of chemical components of essential oils from different samples of *Rhododendron* with the help of chemometrics methods, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 82, 218-228.

EKLER

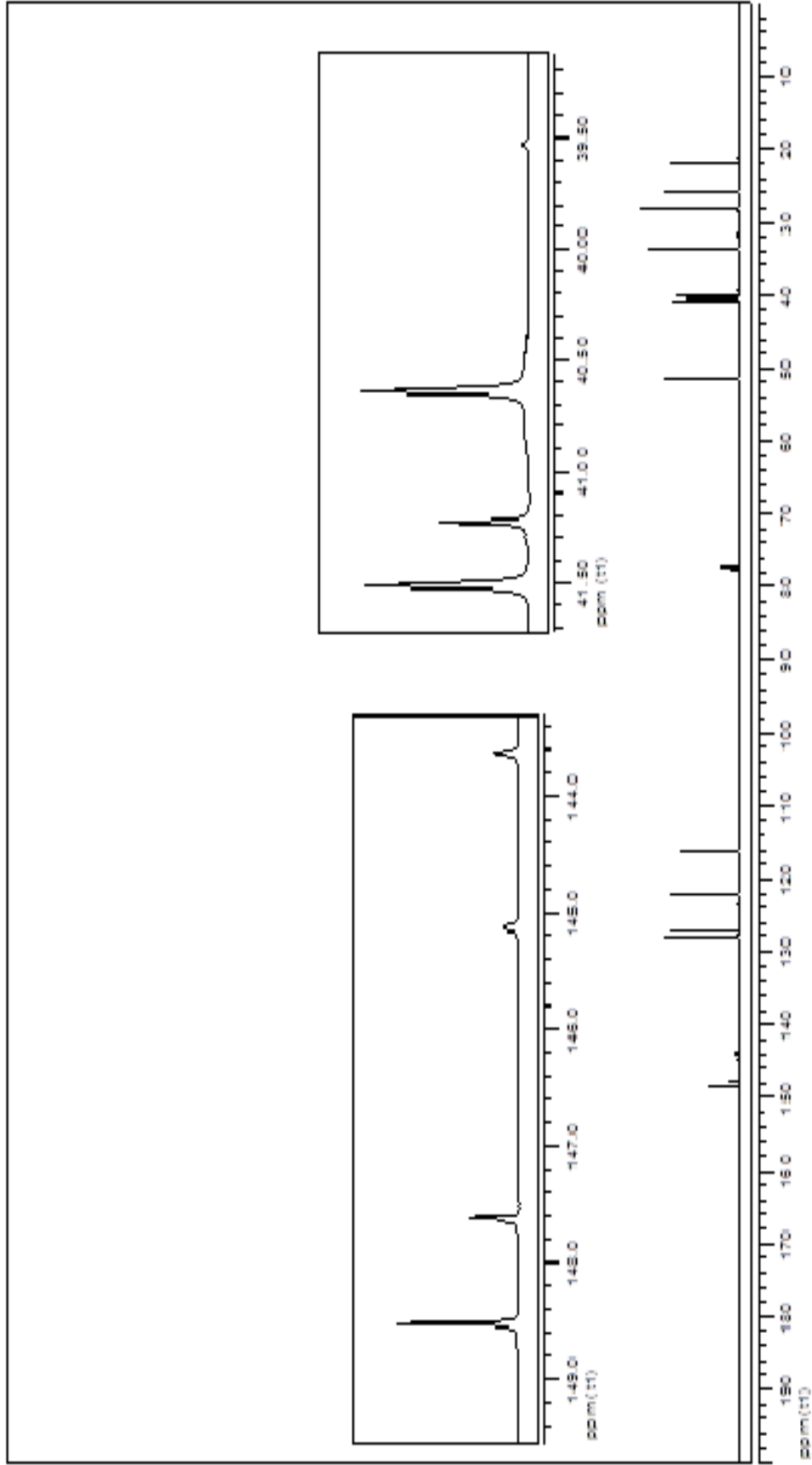
6. EKLER



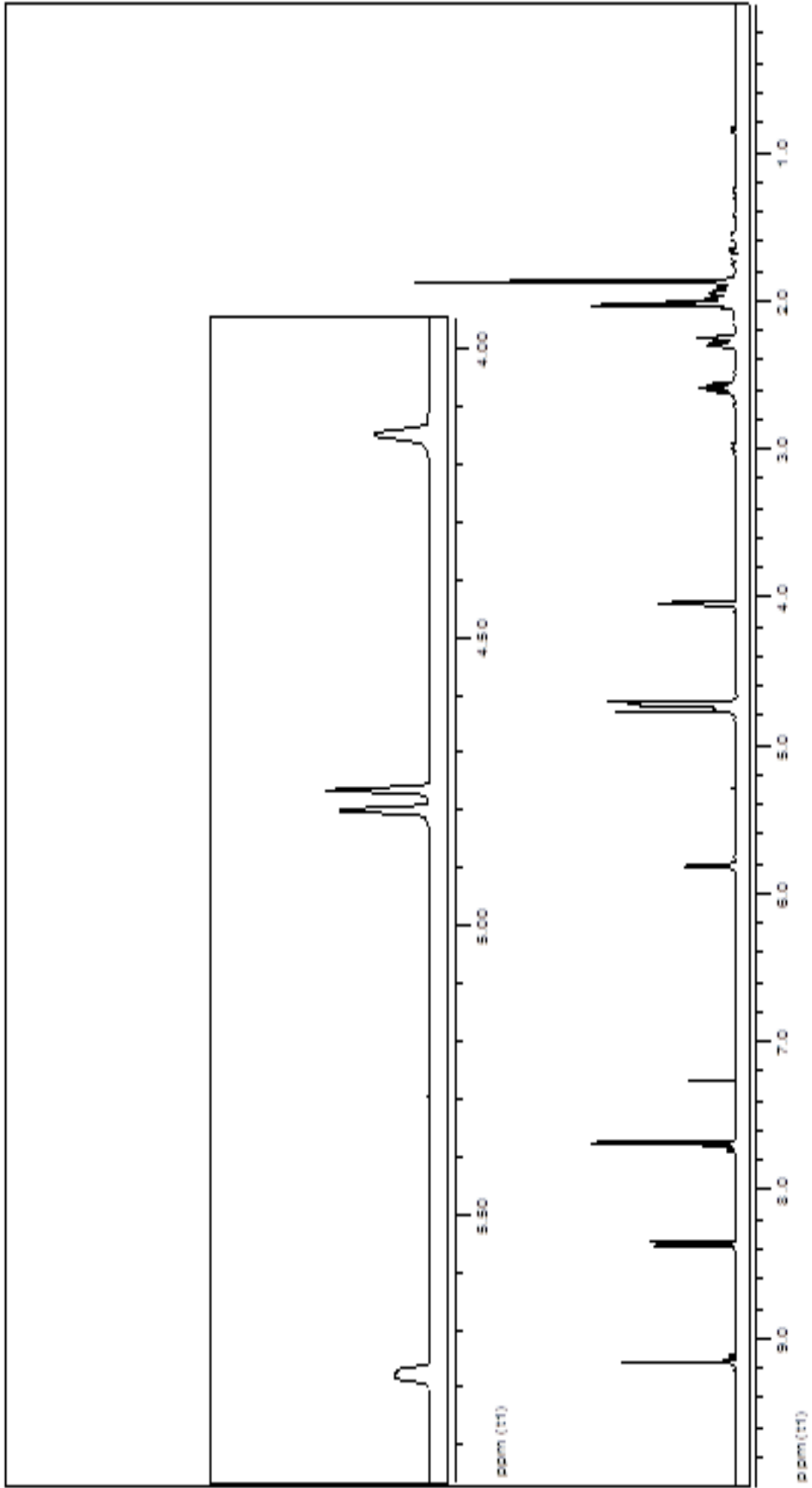
EK Şekil 1. *Rhinanthus angustifolius* subsp. *grandiflorus* bitkisinin GC-MS Spektrumu



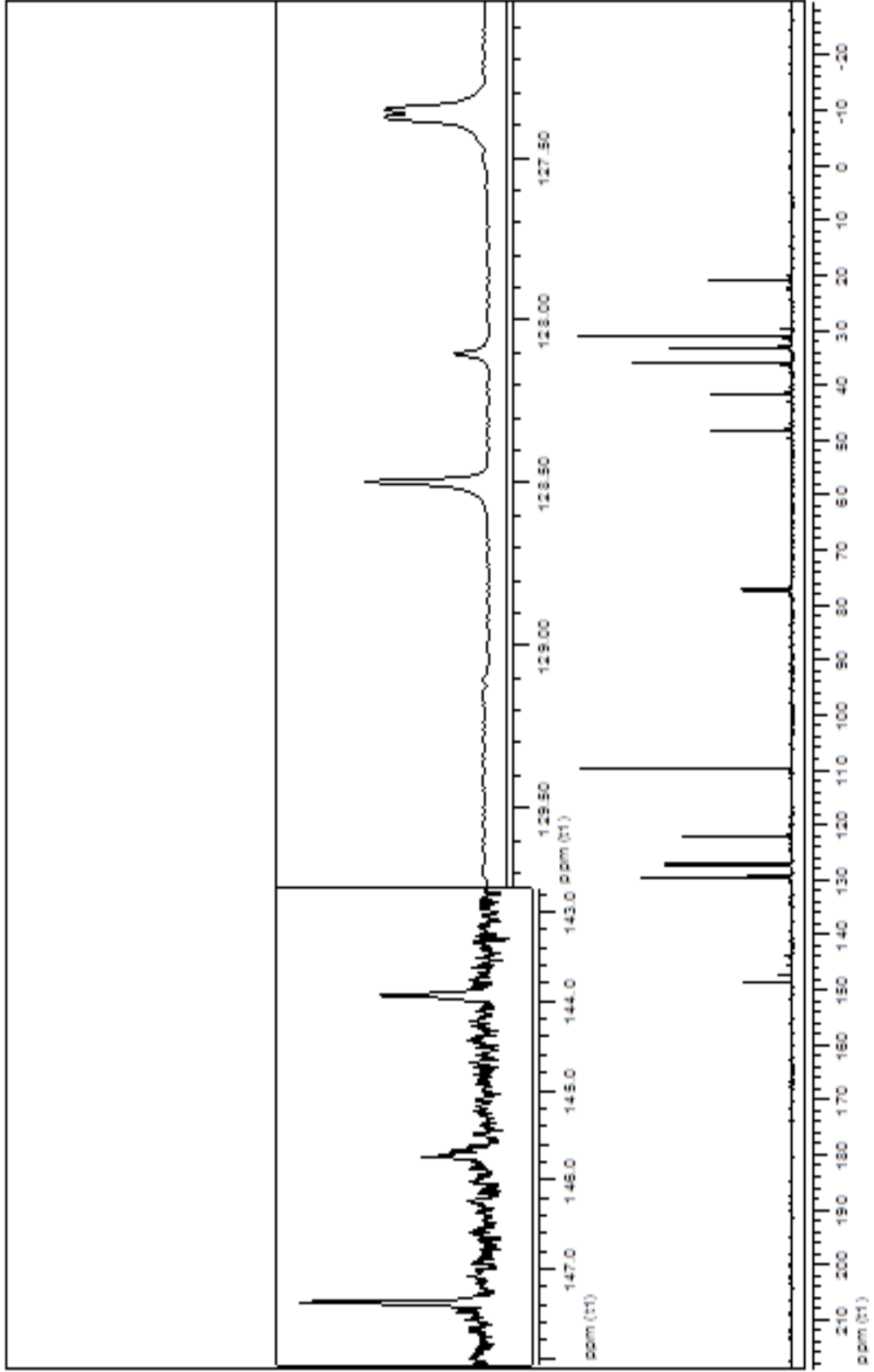
EK Şekil 2. Bileşik 39'un ^1H MNR Spektrumu



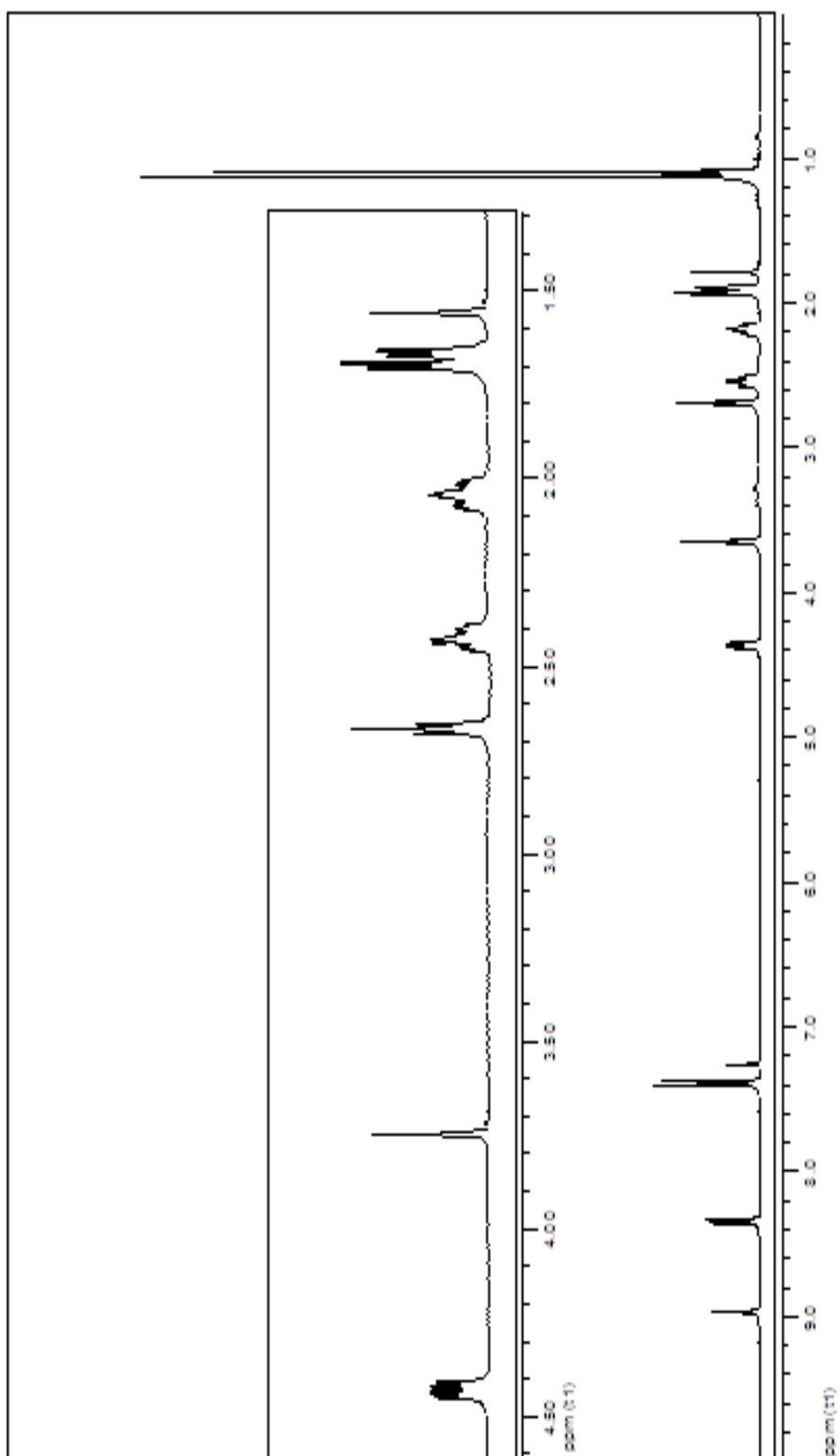
EK Şekil 3. Bileşik 39'un ^{13}C NMR Spektrumu



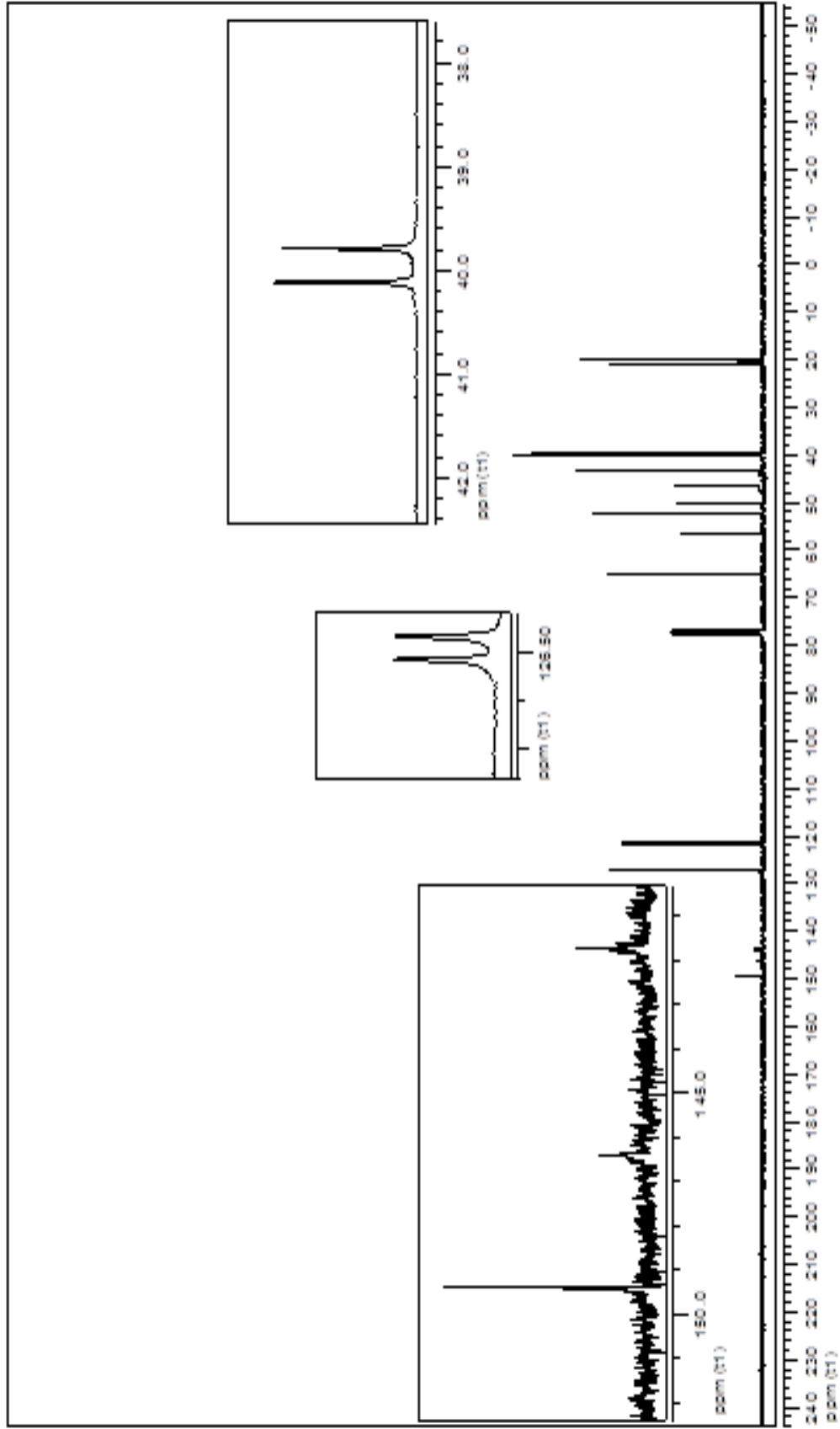
EK Şekil 4. Bileşik 41'in ^1H MNR Spektrumu



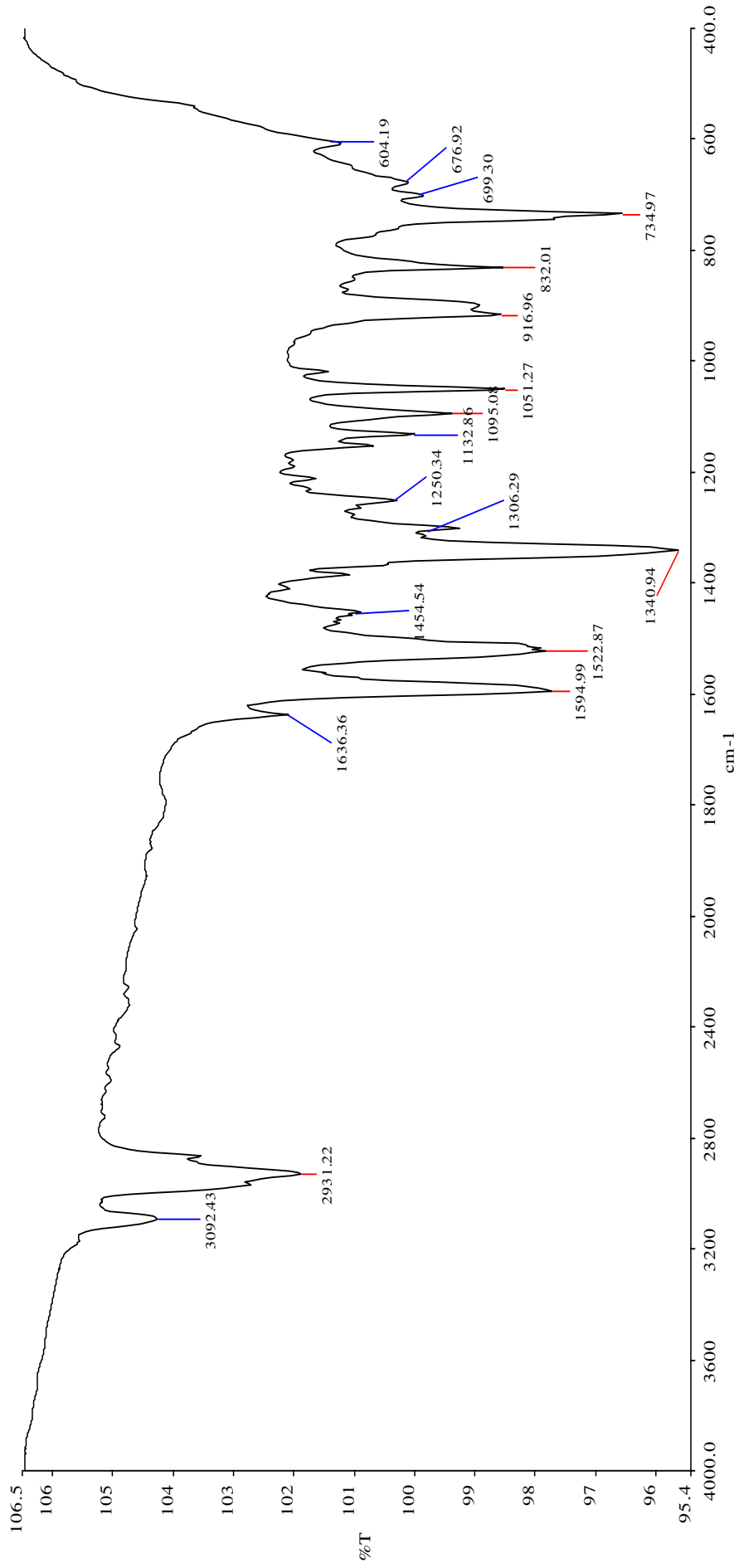
EK Şekil 5. Bileşik 41'in ^{13}C NMR Spektrumu



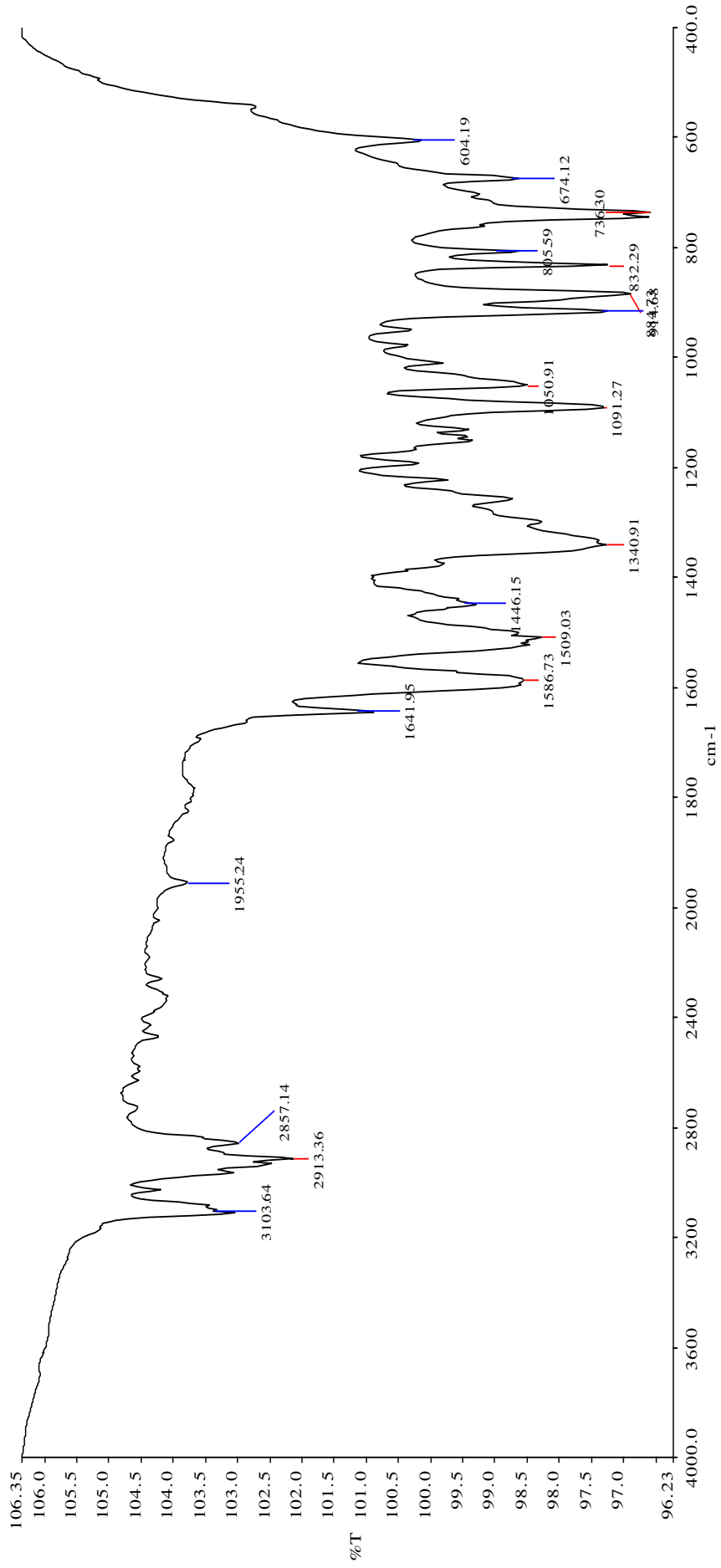
EK Şekil 6. Bileşik 42'nin ^1H MNR Spektrumu



EK Şekil 7. Bileşik 42'nin ^{13}C NMR Spektrumu



EK Şekil 8. Bileşik 39'un IR Spektrumu



EK Şekil 9. Bileşik 41'in IR



ÖZGEÇMİŞ

Sinan ÖZTÜRK 20.04.1988 yılında Gümüşhane' nin Torul ilçesinde doğdu. Eğitim ve öğretimine Gümüşhane Aysin Rafet Ataç İ.Ö.O.'da başladı. Orta öğrenimini Gümüşhane Lisesi'nde 2005 yılında tamamladı. 2006 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü kazandı ve 2010 yılında bu bölümden mezun oldu. 2012 yılında Yüksek Lisans öğrencisi olarak Gümüşhane Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Ormancılık ve Çevre Bilimleri Anabilim Dalı' nda başladı ve 2015 yılında tamamladı. 2012 yılında Gümüşhane Çimento Fabrikası' nda işe başladı ve şu anda bu fabrikadaki görevine devam etmektedir.