

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***HELLEBORUS VESICARIUS* (RANUNCULACEAE) BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ
UÇUCU YAĞLARIN TAYİNİ VE FARKLI EKSTRELERİNİN
ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTELERİ**

Tarık KARABULUT

KİMYA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA

2014

.....danışmanlığında,.....'ın
hazırladığı “.....” konulu bu çalışma/...../
tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Harran Üniversitesi Fen
Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Unvan Adı SOYADI

Üye : Unvan Adı SOYADI

Üye : Unvan Adı SOYADI

**Bu Tezin Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre
Düzenlendiğini Onaylarım**

Prof. Dr.

Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: 12122

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HELLEBORUS VESICARIUS (RANUNCULACEAE) BİTKİSİNİN İÇERDİĞİ UÇUCU YAĞLARIN TAYİNİ VE FARKLI EKSTRELERİNİN ANTİMİKROBİYEL AKTİVİTELERİ

Tarık KARABULUT

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR
Yıl:2014, Sayfa:56

Bu çalışmada *Helleborus vesicarius* (ranunculaceae) bitkisi kimyasal ve mikrobiyolojik olmak üzere iki alanda incelendi. Türü belirlendikten sonra *Helleborus vesicarius* (ranunculaceae) bitkisi güneş ışığından uzak kurutuldu ve sonra öğütüldü. Daha sonra bitki bileşenleri metanol ile ekstrakte edilerek ham metanol ekstresi hazırlandı. Daha sonra bir dizi seçici katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyon kullanılarak ham metanol ekstresi polaritesine göre sırasıyla heksan, diklorometan, bütanol ve su fraksiyonlarına ayrıldı. Bu ekstrelerden uçucu ve esansiyel yağ asitlerinin zengin olduğu Heksan ekstresi metillenerek GC-MS analizi yapıldı ve elde edilen sonuçlar faydalı yağ asitleri açısından irdelendi.

Ayrıca tüm ekstrelerin (metanol, heksan, diklorometan, bütanol ve su) *Salmonella thyphimurium* CCM 5445, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 0157H7 gram-negatif bakterilerine ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* DSM 13590 gram-pozitif bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri ve *Candida albicans* ATCC 10239 mayasına karşı antifungal aktiviteleri agar-disk difüzyon ve minimum inhibisyon konsantrasyonu tayin yöntemleriyle referans ilaçlarla karşılaştırılarak ve incelendi.

ANAHTAR KELİMELEER: *Helleborus vesicarius* (Ranunculaceae), Uçucu yağlar, Antimikrobiyel aktivite, Doğal Bileşikler, Biyolojik Aktivite.

ABSTRACT

MSc Thesis

Tarık KARABULUT
Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assistant Professor Zafer UYAR
Year: 2014, Page: 56

In this study, *Helleborus vesicarius* (ranunculaceae) plant was evaluated in two areas including chemical and microbiological. After identified taxanomically, *Helleborus vesicarius* (ranunculaceae) plant was dried away from sunlight and then finely ground. Then the crude methanol extract was prepared by extraction of the plant components with methanol. Then crude methanol extract was separated into hexane, dichloromethane, butanol, and water fractions respectively based on increasing polarity using a series of selective solid-liquid and liquid-liquid extractions. Out of all extracts, Hexane extract, which is rich in essential fatty acids and volatile fatty acids, was methylated and its GC-MS analysis was performed and the results obtained were evaluated in terms of beneficial fatty acids.

Also antibacterial activity against *Salmonella thyphimurium* CCM 5445, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 0157H7 gram-negative bacteria and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* DSM 13590 gram-pozitive bacteria and antifungal activity against *Candida albicans* ATCC 10239 yeast of all extracts (methanol, hexane, dichloromethane, butanol and water) were examined by agar-disk diffusion assay and minimum inhibitory concentration assay compared with the reference drugs.

KEY WORDS: *Helleborus vesicarius* (Ranunculaceae), Essential oils, Antimicrobial activity, Natural Compounds, Biological Activity.

TEŞEKKÜR

Danışmanım Yrd. Doç. Dr. Zafer UYAR' a sonsuz sabrı, araştırmaya çalışmaya teşviği, yaklaşımı ve bu çalışma dışında dahi hayata dair azim ve kararlılıkta bana ilham olması sebebiyle şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmada bana tavsiyeleri ile desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ ve Doç. Dr. Zülfiye İLTER' e, ayrıca gösterdiği anlayıştan dolayı 4. Sınıf Emniyet Müdürü Rasim UZUN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve dostlukları ile bu çalışmada yanımda olan Fatma TUMBUL, Ayşe YILMAZ ve Ülkü ARSLAN' a tüm yaptıkları için teşekkür ederim.

Nesrin KARABULUT' a canı gönülden desteği, ilgisi ve tükenmeyen sabrından dolayı her daim teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER DİZİNİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
1.1. Botanik Kısım	1
1.2. Kimyasal Kısım	7
1.3. Biyolojik Kısım	10
1.3.1. Antimikrobiyel aktivite çalışmaları	10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1. Genel	18
3.2.Bitki Materyali	18
3.3.Ekstrelerin Hazırlanması	19
3.4.Heksan Ekdtrelerinin GC-MS Analizi	20
3.5.Mikrobiyoloj,Analiz: Antimikrobiyel Aktivite	21
3.5.1.Disk difüzyon yöntemi	22
3.5.2.Minimum inhibitor konsantrasyonu (MİK)	22
4.ARAŞTIRMA BULGULARI veTARTIŞMA	24
4.1.Heksan Ekstresinin GC-MS Analizi	24
4.2.Mikrobiyolojik Analiz: Antimikrobiyel Aktivite	41
4.2.1.Disk difüzyon testi analizi	42
5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER DİZİNİ

BuOH	Bütanol
CH ₂ Cl ₂	Diklorometan
DMSO	Dimetil sülfoksit
KOH	Potasyum hidroksit
MeOH	Metanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. <i>Helleborus vesicarius</i> (Ranunculaceae) bitkisinin Türkiye’de yetiştiği bölgeler.....	6
Şekil 1.3a. Bakterilerin Sınıflandırılması	11
Şekil 1.3b. Enfeksiyon hastalıklarının sebep olduğu ölüm sayıları.....	13
Şekil 4.1a. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinin Heksen ekstresinin GC-MS spektrumu.....	24
Şekil 4.1b. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Linolenik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu	31
Şekil 4.1c. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Palmitik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu	32
Şekil 4.1d. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Linoleik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu	33
Şekil 4.1e. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Fitol’ün yapısı ve GC-MS spektrumu	34
Şekil 4.1f. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Stearik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu	35
Şekil 4.1g. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Myristik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu	36
Şekil 4.1h. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan 7,10,13-Heksadekatrienoik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu.....	37
Şekil 4.1i. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Parinarik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu	38
Şekil 4. 1j <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan cis-13-Eikosenoik Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu.....	39
Şekil 4.1k. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Dokosanoik (Behenik) Asit’in yapısı ve GC-MS spektrumu	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.3. Kurutulmuş <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinin ekstraksiyon şeması.	19
Çizelge 4.1a. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizine göre içerdiği doğal bileşikler. (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı için sonuçlar metoksi (-OCH ₃) kısmı yani metilester kısmı uzaklaştırılmış halde verilmiştir.)	25
Çizelge 4.1b. <i>Helleborus vesicarius</i> bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizine göre % 96'lık kısmını oluşturan ana bileşenler	27
Çizelge 4.2.a <i>Helleborus vesicarius</i> ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyel aktiviteleri (İnhibisyon Bölge Çapları olarak)	42
Çizelge 4.2b. <i>Helleborus vesicarius</i> ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyel aktiviteleri (Aktivite İndeksi olarak).....	43
Çizelge 4.2c. <i>Helleborus vesicarius</i> ekstrelerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu	44

1. GİRİŞ

1.1. Botanik Kısım

Ranunculaceae familyası Ranunculales takımına bağlı olan bir bitki familyasıdır. Halk arasında adı düğün çiçeğigiller olarak bilinir. Ranunculaceae familyası çok yıllık otsu bitkilerden oluşur. Bu familya *Actaea*, *Adonis*, *Anemone*, *Agulegia*, *Barneoutia*, *Caltha*, *Coptis*, *Dichocarpum*, *Enemion*, *Glaucidium*, *Helleborus*, *Leptopyrum*, *Nigella*, *Pulsatilla* cinsleri başlıca olmak üzere 50 den fazla bitki cinsi içermektedir (Pigg ve DeVore, 2005). Bu türlerin bazıları endemik olup bazıları da küresel bir yayılım gösterip dünyanın birçok yerinde yetişmektedir. Genel olarak yayılım gösterdikleri bölgeler kuzey ve güney yarım kürede ılıman ve serin bölgelerdir. Ranunculaceae familyası birkaç dikkat çekici bitki türüne sahip olmakla beraber, genel anlamda ekonomik açıdan çok önemli bir familya değildir. Ticari olarak genellikle süs bitkisi olarak kullanılan türleri mevcuttur. Bu amaçla kullanılan süs bitkilerine örnek olarak *Anemon*, Haseki Küpesi, *Cimifuga*, *Clematis*, *Hezaren*, *Helleborus*, *Nigella*, *Ranunuculus*, *Thalictrum* ve *Trollius* bitkileri gösterilebilir.

Ranunculaceae familyasının bazı türleri zehirli bireylere sahiptir. Örneğin *Aconitum* (Kurtboğan) ve *Delphinium* (Saray Çiçeği) bitkileri içerdikleri alkoloitlerden dolayı çok zehirlidirler. *Aconitum* (Kurtboğan) antik çağlarda sakat ve yaşlı erkeklerin ölüm cezalarında kullanılmış olan zehirli otsu bir bitkidir. *Delphinium* (Saray Çiçeği) veterinerlikte vücut parazitlerini öldürmekte kullanılan tohumları çok zehirli otsu bir bitkidir (Pigg ve DeVore, 2005).

*Delphinium**Aconitum***Resim 1.1a.** Ranunculaceae familyasından örnek iki bitki

Helleborus cinsi Ranunculaceae familyasına ait önemli bir sınıftır. Bu cins, düğün çiçeğigiller olarak da bilinen Ranunculaceae familyasının, kardiyak glikozit içeren zehirli bitkilere sahip önemli bir cinsidir. *Helleborus* türleri doğuda Akdeniz bölgesini de içine almak üzere orta Avrupa'da, batıda İngiltere, İspanya ve Portekiz de olmak üzere Avrupa'da yetişir. *Helleborus* türleri Avrupa kıtasının doğusu, orta kısmı ve güneyinden Kafkasya sınırlarına kadar yayılmış olarak bulunurlar. *Helleborus* cinsi Türkiye'de ise Türkiye'nin kuzey kıyıları ile yine Türkiye'nin Güneydoğu kısımları boyunca kendisini gösterir. *Helleborus* türlerinin bilinen yaklaşık olarak 20 türü bulunmaktadır. *Helleborus* cinsine ait bitkilerin çiçekleri 5 yapraklıdır. *Helleborus*'un bu çiçek yapraklarının küçük fincana benzer şekilde bitki çiçeğinin göbeğinin etrafını çevreledikleri görülür (Anonim, 2012). Çiçek yaprakları dökülmeden aylarca kalabilir. *Helleborus niger* tarihte manolya gibi çok eski tarihlerden bu yana yetiştirilen bir bahçe bitkisidir.



Helleborus niger (Noel Gülü)



Helleborus purpurascens (Mor çöpleme)

Resim 1.1b. *Helleborus* cinsinden örnek iki bitki

Helleborus bitkileri yapraklarını döken her türlü ağaçların diplerinde ve gölgeli olan kuzeye bakan kuytu yerlerde yetişmektedirler. Kış mevsiminin aylarında fazla kar ve yağmur yağışı gerçekleşerek bitkiyi etkileyecek olursa buna bağlı olarak bitkinin yapraklarında kararma meydana gelmektedir. Avrasya da doğmuş olan *Helleborus* çiçeği kireçli, killi ve hatta balçık topraklarda daha iyi gelişir. *Helleborus* türlerindeki çiçeklenme Şubat ve Mart aylarında görülür. Bu cinse ait bitkiler ishal, hemoroit, kalp yetmezliği, melankoli, adet bozuklukları, sarılık, karaciğer rahatsızlıkları, gut hastalığı ve ülser gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca idrar söktürücü etkileri de bulunmaktadır. *Helleborus*'un bilinen türleri aşağıda verilmiştir (Anonim, 2012).

- ❧ *Helleborus viridis* (Yeşil çöpleme)
- ❧ *Helleborus niger* (Noel gülü)
- ❧ *Helleborus orientalis* (Çöplemecik)
- ❧ *Helleborus vesicarius* (Patlak otu)
- ❧ *Helleborus foetidus* (Kokuşuk çöpleme)
- ❧ *Helleborus purpurascens* (Mor çöpleme)

- ❧ *Helleborus thibetanus* (Tibet çöplemesi)
- ❧ *Helleborus odoratus* (Kokulu çöpleme)
- ❧ *Helleborus argutifolius* (Korsika çöplemesi)
- ❧ *Helleborus abruzzicus*
- ❧ *Helleborus atrorubens* (Kırmızı çöpleme)
- ❧ *Helleborus bocconeii*,
- ❧ *Helleborus foetidus*,
- ❧ *Helleborus hercegovinus*,
- ❧ *Helleborus liguricus*,
- ❧ *Helleborus lividus*,
- ❧ *Helleborus multifidus*,
- ❧ *Helleborus torquatus*

Helleborus cinsine ait bitkilerin çiçeklerini görmek için dallarını kaldırmak gerekmektedir. Soğuk ve ayaz gecelerin son bulması ve güneşin doğuşu ile birlikte sabahın ilk saatlerinde bu cinse ait bitkilerin dalları toprağa daha da yaklaşmaktadır. Bitkiler güneşi gördüğü andan itibaren çiçekleri yüzlerini yukarıya gün ışığına doğru çevirmektedir.

Helleborus cinsi bitkileri yutulduğunda baş dönmesi, sersemlik, susuzluk, kulak çınlaması, kusma ve boğulma hissi görülmekte ve zehirli olmalarından dolayı ölüme sebebiyet verebilmektedir. Bu cins bir çok üyesi zehirli olmasına rağmen ortaçağdan itibaren bir çok zehirli bitki gibi alternatif tıpta kullanılmıştır. Karaciğer hastalıklarında ve bağırsak solucanlarının düşürülmesinde işe yaradığı görülmüştür. Galya'lılar bitki köklerinden elde ettikleri zehir ile oklarının uçlarını sıvazlayarak düşmanlarını öldürmekte kullanırlarmış. Yeşil ve siyah renkli olan *Helleborus* cinslerinde bulunan kardiyak glikozitler yılan zehirine çok yakın özellik göstermektedir (Tanker ve Bingöl, 1984).

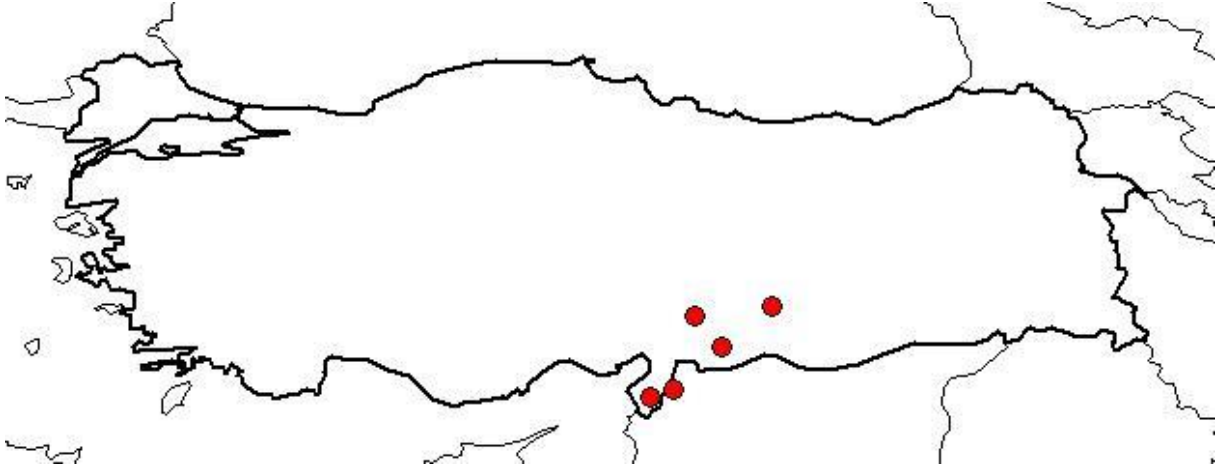


Resim 1.1c. *Helleborus orientalis* (Çöplemecik)

Helleborus cinsinin Türkiye'de doğal olarak yetişen iki türü bulunmaktadır. Bunlardan biri olan *Helleborus orientalis* (Çöplemecik) bitkisi, Türkiye’de Kuzey Anadolu’da Bolu, Kastamonu gibi illerde geniş bir yayılma alanına sahiptir. Bu bitki ormanlık alanlarda yetişmektedir. Özellikle kış mevsiminin ortasında yaprakları dökülmeden kalabilen bitkinin ancak aşırı soğuk havalarda yapraklarının karardığı ve yırtıldığı görülmektedir. Uzun süren kış mevsiminden sonra bitkinin çiçeklenme dönemi ortalama olarak 8-10 hafta sürmektedir. Bitkinin yaprakları, sapları ve kökleri zehirlidir. Genellikle ormanlık alanların altlarında yetişmektedir. Bitki halk arasında Bohça otu, Kara çöpleme, Boynuz otu, Danakıran ve Danabağırtan gibi bir çok isimle anılmaktadır. *Helleborus orientalis* bitkisi Anadolu’nun kuzeyinde büyükbaş hayvanların bronşit hastalıklarının ve benzeri göğüs hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca hayvanların derilerinde bulunan parazitlere karşı kullanıldığı da bilinmektedir.

Türkiye de yetişen diğer *Helleborus* türü olan *Helleborus vesicarius* bitkisi çok yıllık otsu bir bitki olup bahar mevsiminde Mayıs ayı civarlarında çiçeklenir. Bitki 550-1300 m yükseklik arasında çalılıklarda ve yamaçlarda yetişir. Güneydoğu ve Güney Anadolu bölgesine endemik olan bu bitki Türkiye’de küçük bir dağlık alanda yetişir. Toroslarda yetişen bu bitki halk arasında “Patlak Otu” olarak bilinmektedir (Anonim, 2014). *Helleborus vesicarius* bitkisi Güney Anadolu, Nur Dağları, Kahramanmaraş, Gaziantep çevresinde yetişir. *Helleborus vesicarius* özellikle Türkiye’nin güneyinde Kahramanmaraş ilimiz sınırlarında ve Suriye sınırından

Amanos dağlarında, Türkiye'nin güneyi ile kuzey Suriye arasındaki sınır payından başlamak üzere küçük bir alanda yetişir (Davis ve Cullen, 1965).



Şekil 1.1. *Helleborus vesicarius* (Ranunculaceae) bitkisinin Türkiye’de yetiştiği bölgeler.



Resim 1.1d. *Helleborus vesicarius* (Patlak Otu)

Helleborus vesicarius bitkisi gövdesinin yapraklı ve meyvelerinin şişkin olması nedeniyle diğer *Helleborus* türlerinden ayırt edilir. Bitkinin sapları ile birlikte uzunluğu 60 cm yüksekliğe ulaşmaktadır (Anonim, 2012). *Helleborus vesicarius* Akdeniz iklimine sahiptir. Bu nedenle kışın bitkiyi etkileyecek bir buzlanma yoktur. Alkali topraklı zeminlerde yamaç yerlerde yetişir. Bitkinin kendi kökleri etli olduğundan dolayı nemi koruma ve hapsedme özelliğine sahiptir. Bu nedenle sonbaharda başlayan yağışlarla birlikte tekrar büyümeye başlar.

Bitkinin açık yeşil yaprakları üç parçaya bölünmüştür. Ocak ve Mart ayları arasında bitkide görünen yeşil renkli çiçekler, çan şeklindedir. Çiçeklerin kenarı kırmızı veya kahverengi olabilir. Bitkinin çiçekleri her taç yaprağının yarısı kadar uzunlukta bitkinin ucuna doğru ve renkleri mordur. *Helleborus vesicarius* içerdiği kardiyak glikozitler nedeniyle zehirli bir bitki türüdür. Fakat günümüzde birçok bitki çok toksik olmalarına rağmen kontrollü kullanıldıklarında tedavide yararlı olabilmektedir.

Helleborus vesicarius'un tohumları rüzgârlı havalarda etrafa dağılırlar. Bitki yaz aylarında uyku halindedir. Bitkinin büyüme ve olgunlaşma süreci sonbahar mevsiminde Kasım ayında başlamaktadır. Bitkinin çiçeklenmesi Şubat, Mart ve Nisan aylarında başlar. Bitki ile ilgili yeterli ve kayda değer çalışmalar yapılmamış olması da bu bitkinin gizemli ve dikkat çekici hale gelmesine sebep olmaktadır. Günümüzde gelişmekte olan ve her geçen gün değeri artmakta olan alternatif tıp alanını düşündüğümüzde bu bitki ile ilgili çalışma bulunmaması bitkinin bu açıdan ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

1.2. Kimyasal Kısım

Uçucu yağ asitleri

Yağlar, kimyasal yapısı gliseritten oluşan bitkisel ve hayvansal ürünlerin hepsine ortak verilen isimdir. Kimya ve biyokimyada, yağ asidi, genelde uzun, alifatik kuyruklu bir karboksilik asittir. Yağ asitleri, zincirlerinde en az 4 en fazla 24 karbon atomu bulunan organik asitlerdir. Molekül yapılarında çift bağların varlığına göre doymuş ya da doymamış yağ asitleri olarak ikiye ayrılırlar.

Normal basınçta düşük kaynama veya buharlaşma sıcaklığına sahip olan, özellikle içkembe içeriğinde veya silajda bulunan organik asitlere uçucu yağ asitleri adı verilir. Bunlara enerji metabolizmasında kullanılan ve düşük sıcaklıkta az ısı ile uçabilen propiyonik, bütirik ve sirke asidi gibi organik asitler örnektir. Yağ asitleri insan vücudu için çok önemlidir. İnsan metabolizmasının omega-3 yağ asidine gereksinimi daha anne karnında başlar, çocukluk, ergenlik, yetişkinlik ve yaşlılık boyunca bu ihtiyaç devam eder (Valentine ve ark., 2004).

Doymuş yağ asitleri: Doymuş yağ asitlerinin zincirlerinde çift bağlar veya başka fonksiyonel gruplar bulunmaz. "Doymuş" terimi hidrojenle ilişkili olarak kullanılır. Karboksilik asit [-COOH] grubundaki karbon dışındaki diğer karbonların olabildiğince çok hidrojenle bağ kurmuş olduğu anlamını taşır. Hayvanların yağ dokuları büyük miktarda uzun zincirli doymuş yağ asitleri içerir. IUPAC adlandırma sisteminde yağ asitlerinin isimleri "-oik asit" ekiyle biter. Yaygın adlandırma sisteminde kullanılan ek ise "-ik asit"tir. Doymuş yağ asitlerine, Butirik, Laurik (dodecanoic acid), Miristik (tetradekanoik asit), Palmitik (heksadekanoik asit), Stearik (octadecanoic acid), Araşidik (eicosanoic acid) asitleri örnek verilebilir.

Doymamış yağ asitleri: Doymamış yağ asitleri benzer şekillidir, ancak zincir üzerinde bir veya daha fazla alken grubu vardır. Bir alken grubunda, bir "-CH₂-CH₂-" bağ yerine "-CH=CH-", yani birbirine çift bağla bağlanmış iki karbon vardır. Bir alken grubunun iki yanında ona bağlı olan karbon atomları ya cis ya da trans konumunda olabilir. Doymamış yağ asitlerine, Alfa-linolenik asit, Dokosaheksaenoik asit, Eikosapentaenoik asit, Linoleik asit, Oleik asit, Erüsik asitleri örnek verebiliriz. Alfa-linolenik, dokosaheksaenoik, ve eikosapentaenoik asitler omega-3 yağ asitlerindendir. Linoleik asit ve araşidonik asit omega-6 yağ asitlerindendir. Oleik ve erusik asit omega-9 yağ asitlerindendir. Doymamış yağ asitlerinden olan ve vitamin F adı da verilen linoleik, Linolenik ve arahidonik asit esansiyel yağ asitleri olarak bilinir. Bu yağ asitleri hayvan organizması tarafından sentez edilemedikleri için gıdalar ile dışarıdan alınmaları şarttır.

Doymamış yağ asitleri çoğunlukla omega-3 ve omega-6 yağ asitleri formundadır. Omega 3 (alfa-linolenik asit), Omega 6 (linoleik asit) ve Omega 9

(oleik asit)'dan oluşan omega yağ asitlerinin beyin gelişimi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, koroner kalp hastalıklarının önlenmesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır. Yetersizliklerinde insanlarda ciltte kuruma gibi bazı deri hastalıkları, astım, artrit, büyümede gerileme, şeker ve kanserin bazı türlerinin yanında öğrenme eksikliği de görülmektedir (Watkins, 1991). Omega-3 yağ asitlerinin, kırmızı hücrelerin dayanıklılığını arttırdığı, kanın viskozitesinde azalmaya yol açtığı ve böylece kılcal damarlarla beslenen dokulara oksijen teminini kolaylaştırdığı da bilinmektedir. Ayrıca bu yağ asitleri hipertansiyona da iyi gelirler (Leaf ve Weber, 1988). Omega-3 hakkında kalp-damar hastalıklarına, allerjive iyi geldiğine, bağışıklık sistemini güçlendirdiğine, sinirsel bozuklukları önlediğine yönelik çalışmalarda bulunmaktadır. Bunlara ilaveten omega-3 yağ asitlerinin prostaglandinlerin sentezinde görev almaları ve beyin ile retinanın normal gelişmesi için gerekli olmalarının yanı sıra kardiyovasküler bozukluklar ile ilişkili hastalıkların insidansında azalttığı (Farrell, 1992), vücuttaki bağışıklık fonksiyonlarının kaybını geciktirici rol oynadığı da rapor edilmiştir (Lewis ve ark., 2000).

Esansiyel yağ asitleri doğal kan inceltici özelliğe sahip olup, kalp krizine yol açabilen kan pıhtılaşmasını önleyebilmektedirler. Bu yağ asitleri, artrit ve otoimmün hastalıklarının semptomlarını hafifleten doğal iltihap giderici bileşikler de içermektedirler. Esansiyel yağ asitleri vücuda yeteri kadar alınmazsa kepek, egzema, çatlak tırnaklar, mat ve kırılğan saçlar gibi deri sorunları ortaya çıkar. Prostaglandinler hormon benzeri maddeler olup enzimatik olarak yağ asitlerinden üretilirler ve vücuttaki, iltihaplanma, ağrı, şişkinlik, tansiyon, kalp, böbrekler, sindirim sistemi ve vücut sıcaklığının düzenlenesi gibi birçok faaliyeti düzenlemekten sorumludurlar. İnsanlar omega-3, omega-6, omega-9 gibi yağ asitleri yönünden zengin gıdalarla beslenmelidirler. Doymamış yağ asitleri bakımından zengin besinler tüketildiğinde, kan plazmalarında HDL artışına bağlı olarak kolesterol miktarında düşüş görülmektedir. Ayrıca kalp-damar hastalıklarından kaynaklanan ölüm oranlarında gözlenen belirgin artışlardan dolayı insanlar bu hastalıkların önemli bir nedeni olarak bilinen hayvansal yağlardansa daha sağlıklı beslenmek için doymamış yağ asitleri ihtiva eden gıdalara yönelmelidir (Eseceli ve ark.2006).

1.3. Biyolojik Kısım

1.3.1. Antimikrobiyel aktivite çalışmaları

Mikroorganizmaların çeşitli türleri bulunmaktadır. Mikroorganizmaların yaşadıkları yerler atmosfer tabakaları ve yer küredir. Mikroorganizmalar denizlerde, okyanusların derinliklerinde, atmosferin birçok tabakasında, yer kürenin oldukça dip kısımlarında, gelişmiş canlıların deri ve bağırsaklarında ve ekosistemin her bölgesinde yaşamlarına devam etmektedirler. Yaşam alanlarına dikkat edildiğinde, boyutları mikroskobik olan bu tür canlılar yaşamımızın her alanında yaşayabilmektedirler (Christner ve ark., 2008).

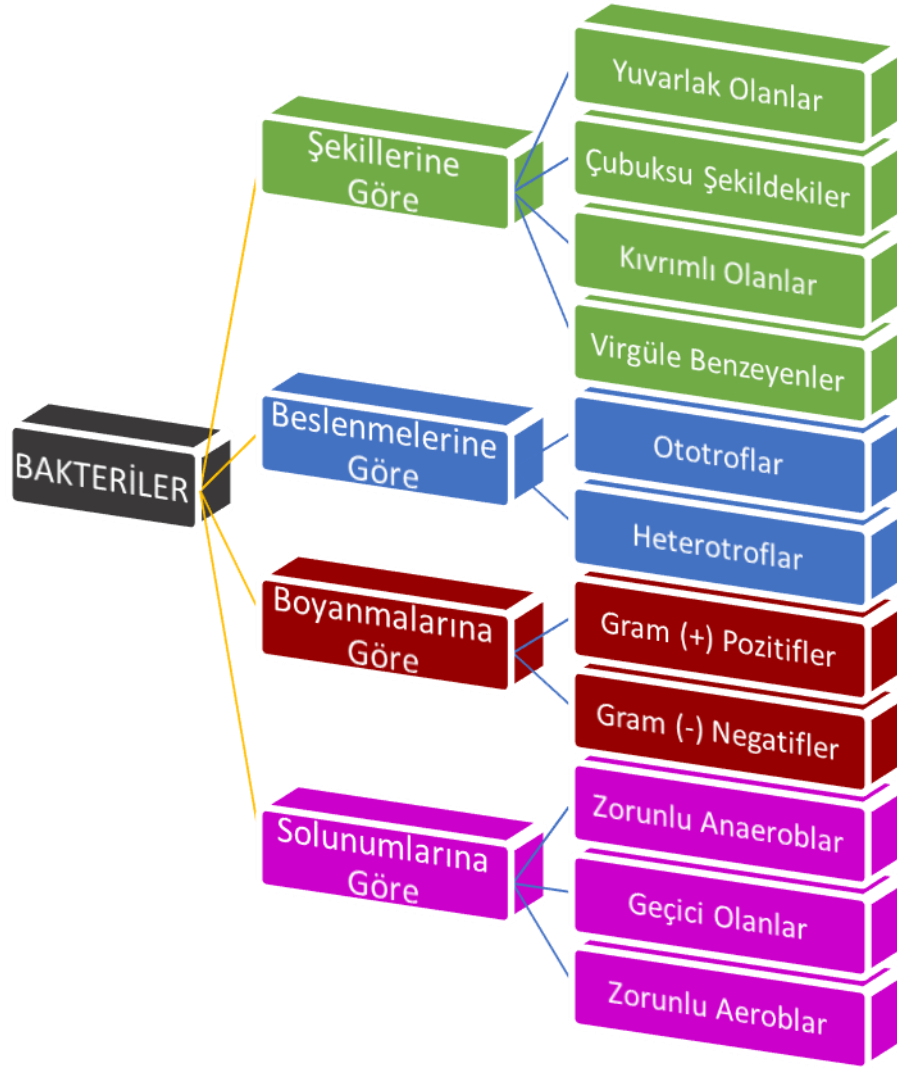
Mikroorganizmalar, hücre büyüklüklerine, hücresel yapılarına ve yaşama özelliklerine göre 4 ana sınıfa ayrılırlar:

1. Bakteriler
2. Mantarlar
3. Virüsler
4. Parazitler

Mantarlarla ilgilenen bilim dalına mikoloji, bakterilerle çalışan bilim dalına bakteriyoloji virüslerle ilgilenen bilim dalına viroloji, parazitlerle ilgilenen bilim dalına parazitoloji ve bağışıklık ile çalışan bilim dalına immünoloji adı verilir.

Bakteriler prokaryotik mikroorganizmaların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Genel olarak birkaç mikrometre uzunluğunda olan bakteriler küreden çubuksu ve sarmal şekle olmak üzere birçok şekle sahiptir. Bakteriler toprakta, suda, asidik sıcak kaplıca sularında, radyoaktif atıklarda (Fredrickson ve ark., 2004) yer kabuğunun derin katmanlarında bulunurlar. Bakteriler bitki ve hayvanlarla simbiyotik ya da parazitik yaşam sürerler. Bakterilerin insanlı uzay araçlarında bile ürediği bilinmektedir (Anonim, 2007). 1 gram toprakta yaklaşık olarak 40 milyon bakteri hücresi ve 1 mililitre tatlı suda yaklaşık olarak 1 milyon bakteri hücresi bulunmaktadır. Yeryüzünde yaklaşık olarak 5×10^{30} bakteri bulunmaktadır (Whitman ve ark., 1998) ve bu miktar dünyadaki tüm bitki ve hayvanların oluşturduğu biyokütleden daha fazladır (Hogan, 2010).

Bakteriler çeşitli özellikleri bakımından sınıflandırılırlar. Bu özellikleri; şekilleri, solunumları, beslenmeleri ve boyanmaları olarak sayılabilir.



Şekil 1.3a. Bakterilerin Sınıflandırılması

Bu sınıflandırmalar arasında özellikle Gram pozitif ve Gram negatifliklerine göre sınıflandırma en yaygın sınıflandırma olup, bilimsel araştırmalarda bakterileri kategorize etme açısından sıkça kullanılmaktadır. Gram boyası ile boyandığında mavi-mor renk veren bakterilere gram (+), kırmızı-turuncu renk veren bakterilere ise gram (-) bakteriler denir. Bakterilerin hücre çeperinin özelliklerinden dolayı farklı renkler ortaya çıkmaktadır. Gram (+) bakteriler kalın ve peptidoglikandan oluşmuş tek katmanlı bir çepere sahipken, gram (-) bakterilerde ise ilk tabaka karbonhidrat ve proteinlerden, ikinci tabaka ise yine peptidoglikandan oluşmak üzere iki ince katmanlı hücre çeperi bulunmaktadır (Gram, 1884; Hugenholtz, 2002).

Mantar ise genel olarak maya ve küf gibi mikroorganizmaları içeren büyük bir ökaryotik organizma grubunu teşkil eder. Mantar krallığı bitkilerden, hayvanlardan, bakterilerden ve protistlerden farklı olarak sınıflandırılan bir canlı grubudur. En büyük farklardan birisi mantar hücreleri bakterilerin hücre duvarından ve bitkilerin selüloz içeren hücre çeperinden farklı olarak kitin içeren bir hücre duvarına sahiptir. Dünya çapında oldukça bol bulunan mantarlar küçük yapılarından ve toprak ve ölü maddedeki gizli yaşamlarından dolayı ve bitki ve hayvanların ortakyaşarı olarak pek göze çarpmaz. Fakat mantar (göbelek) ya da küf olarak çoğaldığı zaman oldukça göze çarpan bir form alır. Organik maddelerin bozunmasında ve besin döngüsü ve değişiminde mantarlar çok önemli rollere sahiptir. İnsanlar çok uzun zamandır mantarları direkt mantar (göbelek) yiyeceği olarak, ekmek için hamur ekşitmesinde, yoğurt, şarap, soya sosu gibi yiyecek ve içeceklerin oluşmasında kullanılmaktadır. Mantarlar 1940’lardan beri antibiyotik üretiminde ve son zamanlarda da endüstriyel ve deterjan içerisinde kullanılan birçok enzimin üretiminde kullanılmaktadır. Tüm bu faydaların yanı sıra mantarlar sağlık açısından oldukça tehlike de arz edebilmektedirler. Mantarlar üretilmiş tüm maddelerin ve inşa edilmiş binaların yapısına zarar vererek bozunmasına sebep olabilir. Ayrıca insan ve hayvanlara karşı oldukça zararlı patojenler de olabilirler. Fungal hastalıklardan dolayı ekin ve ürünlerin kaybı insan yiyecek kaynakları ve özellikle yerel ekonomiler üzerine ciddi zararlı etkileri olabilir.

Türü ne olursa olsun bazı mikroorganizmalar ekosistemde yaşamın devamı için gerekli iken bazı mikroorganizmalar da patojenik olup çok tehlikeli hastalıklara hatta insan, hayvan ve bitkilerin ölümlerine neden olmaktadır (Anonim, 2002). Kızamık,

çocuk felci, kolera, grip, uçuk, Hepatit B, Aids, Verem gibi birçok hastalığın sebebi mikroplardır. Hastalığa sebep olan zararlı mikroorganizmalar, virüs ve bazı bakterilerdir. Mikroorganizmalar çeşitli yollarla insan vücuduna girerler. Tükettiğimiz gıda ve yiyeceklerle ağız yoluyla, burundan solunum yolu ile havadan, su yolu ile deri yaralanmasında kan ile kirli ortamlarda göz ve kulak yolu ile ayrıca böcekler, pire, veba, sıvrisinek, sıtma, karasinek gibi mikrop taşıyıcılar sebebiyle insan vücuduna girerek yukarıda saydığımız birçok hastalığa sebep olurlar.

Dünya sağlık örgütünün dünya çapındaki ölümler ve sebepleri üzerine yaptığı “Dünya Sağlık Raporu” isimli araştırmada (2004) bulaşıcı ve parazitik hastalık kaynaklı ölümlerin tüm ölüm oranları arasında % 23'lük çok önemli bir yer tuttuğunu ortaya koymuştur. Şekil 1.3b’de bu enfeksiyonlar ve sebep oldukları ölüm oranı sayı ve yüzde olarak verilmektedir.



Şekil 1.3b. Enfeksiyon hastalıklarının sebep olduğu ölüm sayıları.

Bakterilerin sebep olduğu bazı hastalıklar aşağıda verilmiştir.

- ❧ Orta Kulak İltihabı
- ❧ Çocuk Felci
- ❧ Suçiçeği
- ❧ Kabakulak
- ❧ Soğuk Algınlığı
- ❧ SARS (Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği)
- ❧ Kuduz
- ❧ Aids
- ❧ Zatüre
- ❧ Menenjit
- ❧ Kızamık

Mantarların sebep olduğu bulaşıcı olan ve çok çabuk yayılabilen hastalıklarda aşağıda verilmiştir.

- ❧ El Mantarı
- ❧ Ayak Mantarı
- ❧ Vücut Mantarı
- ❧ Ağız Mantarı
- ❧ Kasık Mantarı
- ❧ Saç ve Kılılı Deri Mantarı
- ❧ Cinsel Uzun Mantarı
- ❧ Tırnak Mantarı.

Günümüz dünyasında bu zararlı mikroorganizmalara karşı verilen savaşta özellikle bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdikleri direnç, insan sağlığı açısından en büyük tehlikelerden birini oluşturmaktadır. Bundan dolayı yeni antibiyotiklerin yanında, bakterilerin antibiyotiklerin etkisini azaltan veya yok eden enzimlerini baskılayabilecek bileşikler bulmak için bilim dünyası yeni çalışmalar yapmaktadır. Son yıllarda ilaçların etkinlikleri bakterilerin geliştirdiği direnç sebebiyle azalmıştır. Antibakteriyel çalışmaların artması bu nedenle son derece önemlidir. Geçmişte tedavi edilebilen bir çok hastalık ve enfeksiyon günümüz dünyasında ölümlere sebep olmaktadır. Drug Resistance (ilaç direnci) ya da diğer adıyla antimikrobiyel direnç; bakteri, parazit, virüs ve mantarlar'dan kaynaklanan hastalıkların etkili bir biçimde tedavisini tehdit etmektedir. Dünya sağlık örgütü “Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014” isimli raporda 21. yüzyılda sıradan hastalıkların ve küçük yaralanmaların bile ölümlerle sonuçlanabileceğinin artık bir hayalden öte gerçekleşebilecek bir olasılık olduğunu bildirmektedir (Anonim 2014). Rapor çok açık bir şekilde dünyanın bazı bölgelerinde sıradan bakterilerin bile geliştirdiği dirençlerin çok tehlikeli boyutlara ulaştığını bildirmektedir. Yanlış antibiyotik kullanımı, kalitesiz ve etkisiz ilaç kullanımı, hayvan yetiştiriciliğinde büyümeyi hızlandıran ilaçlar, hastanelerdeki yetersiz hijyen koşulları gibi nedenler organizmaların ilaç direncini arttırmaktadır. Mikroorganizmalar bir antimikrobiyel ajana maruz kaldıklarında daha hassas organizmalar ölürken, daha dirençli olanlar yaşarlar. Canlı kalanlar daha sonra üreyerek sadece kendi gibi dirençli organizmaları meydana getirirler. Globalleşen dünyada ticaret ve seyahatin hızla artması, dirençli organizmaların dünyanın herhangi bir kısmına hızla yayılmasına neden olmaktadır.

Son yıllarda hastalıkların sayısının artması, kullanılan tıbbi ilaçların tedavi noktasında bekleneni verememesi ve yan etkilerinin gözlemlenmesi doğal ürünlere olan ilginin artmasına sebep olmuştur. Bu nedenle birçok bitki farmakolojik yönden araştırıldığı gibi mikrobiyolojik yönden de farklı şekillerde ve metotlarla incelenmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Doğal bileşiklerle ilgili yapılan çalışmaların tarihçesi aslında çok eski dönemlere dayanmaktadır. Özellikle hastalıkların tedavisinde bitkilerden faydalanma geçmişte Çin ve Hint medeniyetlerinde oldukça yaygındı. Halen bu ülkelerin doğal bileşik araştırmalarında önemli bir yeri vardır. Doğal bileşikler genellikle bitkisel tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Günümüzde “Alternatif Tıp” olarak da bilinen bitkisel tedavi yöntemleri büyük rağbet görmektedir. Modern teknoloji ve farmakolojinin gelişmesi ile beraber sentetik ilaçlar yaygınlaşmış fakat bitkisel kaynaklı ilaçlar önemini korumaya devam etmiştir. Dünya sağlık örgütünün yapmış olduğu bir araştırmaya göre gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80’i başlıca sağlık sorunlarına karşı bitkisel ilaçları kullanmaktadır (Owolabi ve ark., 2007). Bir başka çalışmaya göre Almanya’da her 4 kişiden 3’ünün minör rahatsızlıklarda ya da bozukluklarda ilk tercihinin bitkisel ilaçlar olduğunu dolayısıyla gelişmiş ülkelerde de bitkisel ilaçların aynı oranda güvenildiğini gözler önüne sermektedir (Tuffs, 2002). Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçete ile satılan ilaçların % 25’ini oluşturmaktadır. Sinir hastalıkları, şeker, stres, ülser, verem, yüksek tansiyon, zayıflamak problemi, gastrit, hemoroid, ishal, kalp, kanser, kan kanseri, mide rahatsızlıkları vb. birçok rahatsızlık tedavisinde doğal bileşikler yani halk arasında ki adıyla “Şifalı Bitkiler” kullanılmaktadır. Dünya sağlık teşkilatının 91 ülkenin farmakopelerine (farmakolojik kitaplar) ve tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı yayınlarını dikkate alarak yaptığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 in üzerindedir (Anonim, 1979).

Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de araştırılmaya başlanmıştır (Vonderbank, 1949). Dünyada olduğu gibi ülkemizde de pek çok araştırmacı halk ilaçlarını değişik açıdan inceleyen çalışmalar yapmıştır ve oldukça önemi sonuçlar elde etmişlerdir. Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçların yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması doğal ürünlere olan ilgiyi daha da arttırmıştır.

Yukarıda belirtilen bilgiler ve ihtiyaçlar ışığında yapılan literatür çalışmasında, Türkiye’ye endemik olan *Helleborus vesicarius* (Ranunculaceae)’a ait herhangi bir

doğal bileşik ya da biyolojik aktivite çalışmasına rastlanmadı. Bitki ile ilgili herhangi bir kimyasal veya biyolojik çalışma yapılmış olmaması bu bitkiyi daha ilginç kılmaktadır. Bununla beraber literatürde *Helleborus* cinsinin diğer üyelerine ait yapılan izolasyon ve saflaştırma çalışmalarında önemli bulgular elde edilmiştir. *Helleborus caucasicus*'dan, steroidal bileşikler (Muzashvili ve ark., 2009), steroidal glikozidler (Bassarello ve ark., 2008) ve steroidal sapojenler (Muzashvili ve ark., 2006), *Helleborus orientalis*'den furostanol glikozidler (Mimaki ve ark., 2010), furostanol saponin ve steroidler (Akin ve Anil, 2007), steroidal saponinler (Watanabe ve ark., 2005), bufadienolid ve spirostanol glikozidler (Watanabe ve ark., 2002a; Watanabe ve ark., 2003b), *Helleborus niger*'den indol-asetik asit türevi (Pencik ve ark., 2009), sitokininler (Tarkowski ve ark., 2006), flavonoid glikozitler ve fenolik glikozit türevleri (Vitalini ve ark., 2011), *Helleborus thibetanus*'tan spirostanol sülfonat (Yang ve ark., 2010a; Yang ve ark., 2010b), *Helleborus viridis*'ten saponinler (Stochmal ve ark., 2010), *Helleborus thibetanus Franch*'ten bufadienolidler ve hellebrijenin (Yang ve ark., 2010), *Helleborus foetidus*'dan açıl quersetin glikozid (Prieto ve ark., 2006), *Helleborus viridis* L'den furostanol saponinler and quersetin glikozidler (Braca ve ark., 2004), *Helleborus purpurascens*'den helletiyoninler (Milbradt ve ark., 2003), *Helleborus torquatus*'dan steroid ve bufadienolidler (Meng ve ark., 2001) gibi doğal bileşikler izole edildiği rapor edilmiştir.

İzolasyon ve saflaştırma çalışmalarının yanı sıra literatürde bu bitki cinsinin bazı üyeleri ile yapılan biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda önemli bulgulara rastlanmıştır. Bu türlerin önemli şekilde antioksidan (Moldovan ve ark., 2011; Roman ve ark., 2010), antiproliferatif (hücre büyümesini engelleyici) (Prieto ve ark., 2006), antibakteriyel (Puglisi ve ark., 2009; Rosselli ve ark., 2010), ağrı kesici (Neascu ve ark., 2010; Erdemoğlu ve ark., 2003), otoimmünite engelleyici (immün sistemin kendi dokusunu yok etmesini engelleyici) (Seifarth ve ark., 2011; Horstinann ve ark., 2007), sitotoksik (Rosselli ve ark., 2009; Lindholm ve ark., 2002), apoptosi indükleyici (Jesse ve ark., 2009), bioaktivite (Matur ve ark., 2003a; Matur ve ark., 2004b), iltihap sökücü (Erdemoğlu ve ark., 2003) etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Genel

Ekstraktların hazırlanmasında kullanılan MeOH, Heksan ve CH₂Cl₂ kullanılmadan önce distillendi. BuOH Merck'ten satın alındığı gibi kullanıldı.

Antimikrobiyel aktivite için kullanılan tüm mikroorganizmalar Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden temin edildi. Muller-Hinton agar besi yeri, Muller-Hinton sıvı besi yeri, DMSO, Nutrient agar plakaları, Sabouraud Dextrose Agar plakaları ve 96 kuyucuklu mikro plakalar Merck'ten satın alındı. Steril kâğıt diskler Hi-Media'dan alındı. Standart ilaçlar Ampicilin antibiyotik ve flucytosine antifungal ajan Sigma-Aldrich'ten satın alındı.

Heksan ekstresinin yağ asitlerinin metil esterlerinin analizi, HP-5MS kolon (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) ile kombine edilmiş Agilent 7890A ve Agilent 5975C inert XL MSD (mass selective detector-kütle seçici dedektör) kullanılarak gerçekleştirildi. Taşıyıcı gaz olarak saf helyum gazı (99.999%) 1 mL/dk sabit akış hızında kullanıldı. Fırın sıcaklığı 60 °C'de 5 dk sonrasında 5 °C/dk hızla 220 °C'ye ve orada 5 dakika kalacak şekilde programlandı. 1 µL örnek (heksanda) 20:1 split oranlı split modunda cihaza enjekte edildi. Bileşikler NIST–Wiley veri kütüphanesi sonuçlarına göre tanımlandı.

TLC tabakalarındaki spotlar % 5 lik H₂SO₄ çözeltisi püskürtüldükten sonra tabakalar 180 °C de ısıtılarak belirgin hale getirildi. UV aktif bileşenler için, spotlar ve bantlar UV lamba altında 254 ve 366 nm'de gözlemlendi.

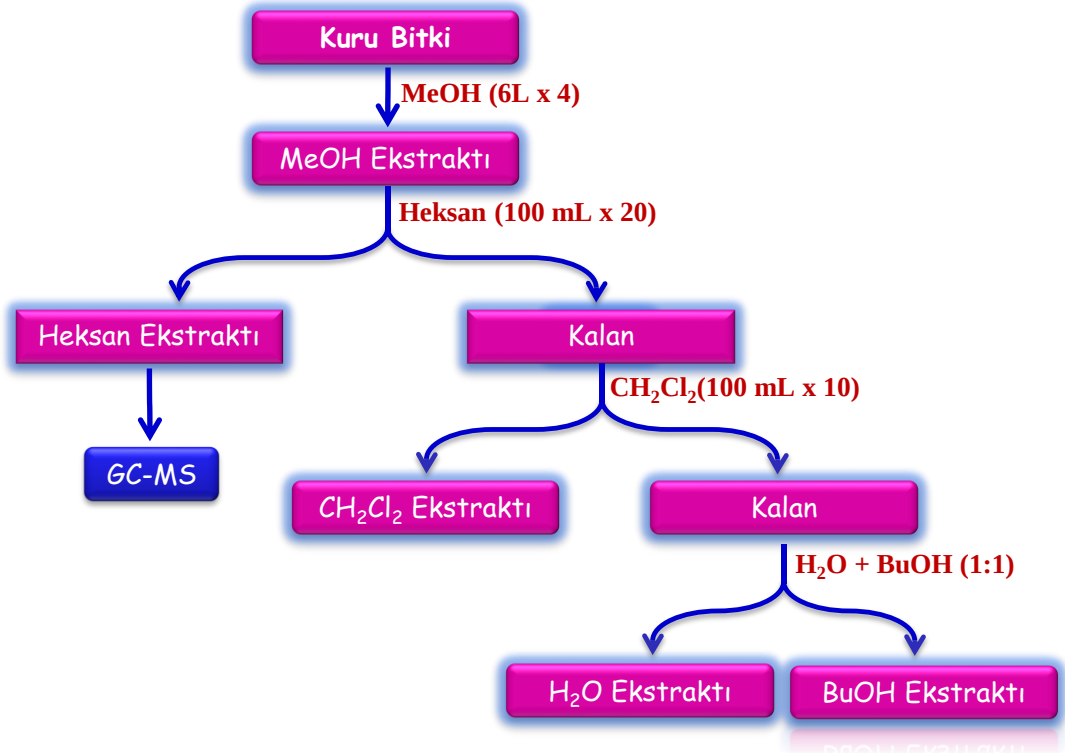
3.2. Bitki Materyali

Bu çalışmadaki, *Helleborus vesicarius* bitkisi Mayıs 2011'de Adıyaman ili Gölbaşı ilçesinde toplandı. Bitkinin botanik özellikleri Doç. Dr. Ömer Faruk KAYA tarafından teşhis edildi ve numune vesikası Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde depolandı.

3.3. Ekstrelerin Hazırlanması

Bu çalışmada, bitkinin toprak üstü kısımları çalışıldı. Güneş ışığından uzak gölgede ve bol havalı, kuru bir ortamda havayla kurutulmuş 1100 gram bitki öğütülerek toz haline getirildi. Toz bitki materyali üzerine 6 litre metanol eklenerek oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ertesi gün bu karışım süzüldü. Süzüntü yaklaşık 40 °C de bir rotary evaporatörle düşük basınç altında çözücüsü uçurularak kuruluğa getirildi. Geriye kalan bitki posası üzerine takip eden 3 gece boyunca tekrar metanol eklenerek bu işlem 3 kez daha tekrarlandı. Elde edilen ekstreler birleştirildi. Bu noktadan sonra bir seçici sıvı-katı ekstraksiyon yöntemi uygulandı.

Çizelge 3.3. Kurutulmuş *Helleborus vesicarius* bitkisinin ekstraksiyon şeması.



Klorofil ve yağlı kısımları uzaklaştırmak için bu kuru ham metanol ekstresi küçük porsiyonlar halinde heksan (20 x 100 ml) ile yıkandı. Heksan ekstreleri de birleştirilerek aynı şekilde rotary evaporatör ile kuruluğa getirilerek Heksan ekstresi elde edilmiş oldu. Heksan ekstresi metillendi ve ekstredeki doymamış yağ asitleri GC-Mass analizi verileri doğrultusunda incelendi. Klorofili ve yağları uzaklaştırıldıktan sonra kalan yağsız kısım, serbest aglikonlar gibi orta polaritedeki bileşikler polar kısımlardan tamamen ayırmak için diklormetan (10 x 100 ml) ile yıkandı. Kalan polar kısım 1:1 / bütanol: su çözücü sistemiyle ekstraksiyon yapıldı. Böylece şeker bileşikler su fazına geçerken ağırlıklı olarak organik bileşiklerden oluşan ikincil metabolitler organik faz olan bütanol içerisinde kaldı. Bir ayırma hunisi ile ayrılan fazlar kuruluğa getirilerek su ve BuOH ekstreleri elde edildi. Biyolojik olarak en aktif olan BuOH inceleme altına alındı. BuOH ekstresi VLC kolona verilmeden önce 50:50 (MeOH:H₂O) çözücü sistemi içerisinde çözündü. Daha sonra madde tüplere alınarak santrifüjlendi. Santrifüjlemeden sonra çözünmeyen kısımlar (MeOH+H₂O' da çöken) ayrıldı. Çözünen kısım ise VLC için kolona verildiğinde elde edilen bu fraksiyonlara ait TLC'ler görülmektedir.

3.4. Heksan Ekstresinin GC-MS Analizi

Yağ karışımı içeren heksan ekstresi Uluslararası Yağ Komisyonu (IOOC) ve IUPAC tarafından yayınlanan trans esterifikasyon prosesi raporlarına göre türevlendirilerek metil esterlerine dönüştürüldü (Paquat ve ark., 1992; Anonim 2001).

Bu prosedüre göre 5 mL'lik bir vidalı kapaklı test tüpü içerisine yaklaşık olarak 0.1 g kuru heksan ekstresi kondu. 2 mL heksan eklenip sallayarak heksan ekstresi çözüldü. Daha sonra oda sıcaklığında 0.2 mL 2M Metanolik KOH eklenip kapağı kapatıldı ve bir teflon bant ile iyice sıkılaştırıldıktan sonra şiddetli bir şekilde 30 saniye sallanarak ekstrakte edildi. Üst faz berraklaşınca kadar fazlar ayrılmaya bırakıldı. Metil esterleri içeren üst kısım dekantasyon ile alındı ve GC-MS ile analiz edildi.

Gaz kromatografi analizi yapılıncaya kadar örnek buzdolabında saklanabilir fakat 12 saatten daha uzun süreyle örneğin depolanması tavsiye edilmez.

3.5. Mikrobiyolojik Analiz: Antimikrobiyel Aktivite

Helleborus vesicarius'dan elde edilen Metanol, Heksan, Diklorometan, Bütanol ve Su ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri “Agar Disk Diffüzyon” ve “Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tespiti” testleri ile tayin edildi. Bu çalışmada antimikrobiyel aktivite tayini için aşağıda gösterilen dört gram-pozitif ve üç gram-negatif bakteri ve antifungal aktivite tayini için ise bir maya kullanıldı. Pozitif kontrol olarak (referans) Disk Diffüzyon Metodunda **Ceftazidime** antibiyotiği ve **Nystatin** mantar ilacı kullanılırken, Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tespiti metodunda **Ampicillin** antibiyotiği ve **Fluctosine** mantar ilacı kullanıldı.

Gram-Negatif Bakteriler:

- ❧ *Salmonella thyphimurium* CCM 5445,
- ❧ *Escherichia coli* ATCC 25922,
- ❧ *Escherichia coli* 0157H7,

Gram-Pozitif Bakteriler:

- ❧ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,
- ❧ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- ❧ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,
- ❧ *Enterococcus faecium* DSM 13590,

Maya:

- ❧ *Candida albicans* ATCC 10239.

3.5.1. Disk difüzyon testi

Helleborus vesicarius bitki ekstrelerinin antimikrobiyel aktiviteleri Bauer ve arkadaşları (1966) ve National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2009) tarafından tanımlanan protokolda çok küçük değişiklikler yapılarak tayin edildi. Özetle, 20 ml Muller Hinton Agar besiyeri 9 cm çaplı petri kaplarına döküldü. Test mikroorganizmaları bu petriler üzerine ekilerek 18-24 saat süreyle aktive edildi. Daha sonra mikroorganizmaların steril Muller-Hinton broth sıvı besiyeri içerisinde süspansiyonu hazırlandı. Steril pamuk çubuklar standardize edilmiş hücre süspansiyonlarının içerisine daldırıldıktan sonra MH agar petrisi üzerinde yayılarak organizmaların homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Petri yüzeyinin kurumasını takiben DMSO içerisinde çözülerek stok solüsyonları (1 mg/mL) hazırlanan bitki ekstrelerinin 25 μ L' si 6 mm çapındaki steril kağıt disklerle emdirildi. 5 dk kurumaya bırakılan steril diskler daha sonra MH agar petrisi üzerine yerleştirildi. Bakteri suşlarının büyümesi için 37 °C'de 24 saat, maya suşunun büyümesi için de 27 °C'de 48 saat inkübe edildi. Antibakteriyal aktivitenin karşılaştırılması için Ampisilin, antifungal aktivitenin karşılaştırılması için de Nistatin referans ilaçları pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise DMSO kullanıldı. 24 saat sonunda test mikroorganizmalarının etrafında oluşmuş olan inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçülerek kaydedildi. Tüm denemeler 3 kere tekrar edildi ve sonuçların ortalaması rapor edildi.

3.5.2. Minimum inhibitor konsantrasyonu (MİK)

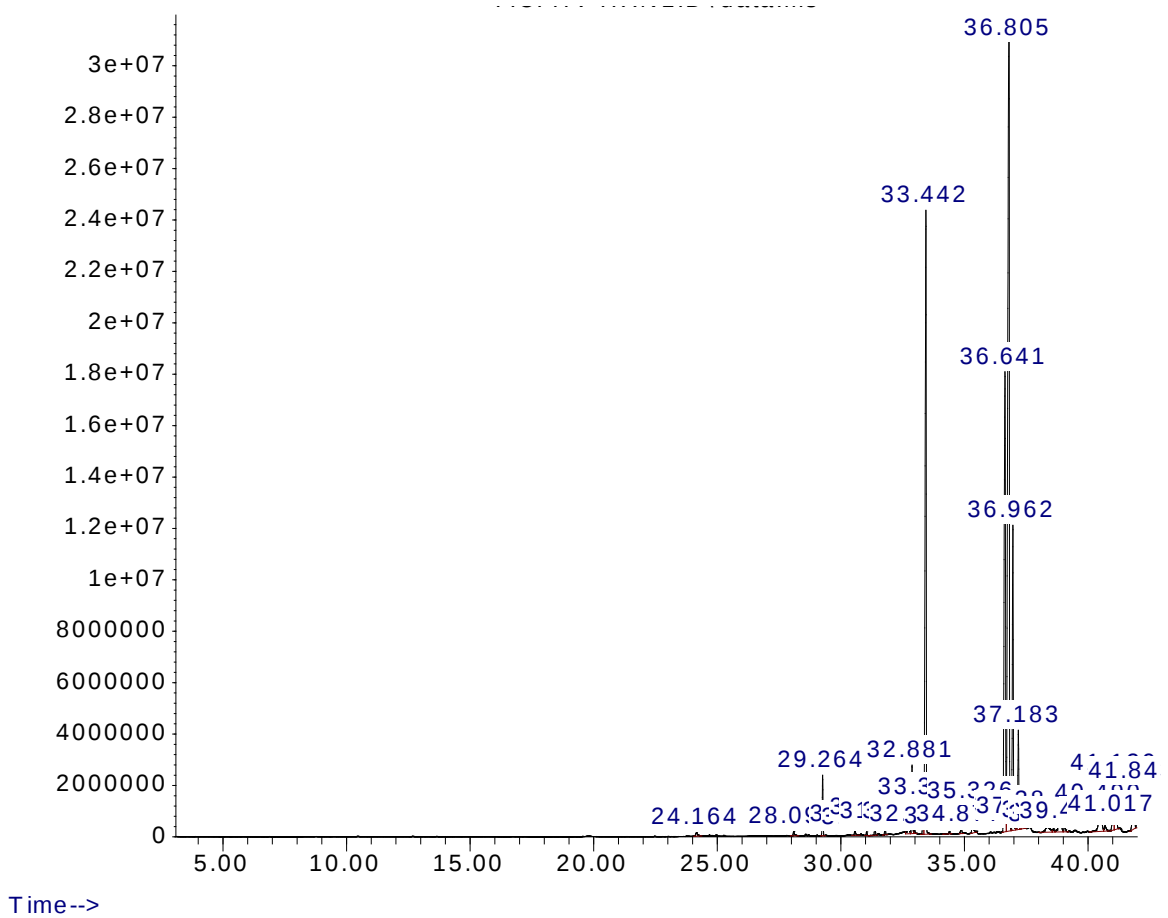
Bitki ekstrelerine ait minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri NCCLS (2003) tarafından tanımlanan sıvı mikrodilüsyon tekniği uygulanarak belirlendi. Öncelikle 96 kuyucuklu mikrolakalara 80 μ l MH sıvı besiyeri eklendi. Daha sonra final hacim 80 μ l olacak şekilde bitki ekstrelerinin 2 kat dilüsyon serisi (1mg/mL, 500 μ g/mL, 250 μ g/mL, 125 μ g/mL, 62.5 μ g/mL, 31.2 μ g/mL, 15.6 μ g/mL, 7.8 μ g/mL, 3.9 μ g/mL, 1.9 μ g/mL, 0.9 μ g/mL, konsantrasyonlarında) 96 kuyucuklu mikrolakalarda hazırlandı. Bu kuyucuklara eşit hacimde MH sıvı besiyeri ilave edildi. Test mikroorganizmaları MH sıvı besiyerinde süspanse edilerek hücre

yoğunlukları OD₆₀₀'de 1.5×10^8 CFU/mL' ye karşılık gelecek şekilde 0.5 McFarland standardına ayarlandı. Süspanse edilmiş mikroorganizma solüsyonlarından 20 µl alınarak farklı konsantrasyonlarda bitki ekstralarını içeren ardışık kuyucuklara ilave edildi. Test edilen her bir örnek için aynı zamanda 80 µl MH sıvı besiyeri ve 80 µl bitki ekstresi içeren bir negatif kontrol de hazırlandı. Ampisilin ve Flusitozin (flucytosine) karşılaştırmada referans antimikrobiyeller olarak kullanıldı. Mikroplakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra MİK değerleri görsel olarak belirlendi. Bitki ekstralarının MİK değerleri, belirlenen koşullar altında test mikroorganizmalarının gözle görülür büyümelerini engelleyen en düşük konsantrasyonları olarak tanımlanmıştır. Tüm denemeler 3 kere tekrar edildi ve sonuçların ortalaması rapor edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Heksan Ekstresinin GC-MS Analizi

Helleborus vesicarius bitkisi Heksan ekstresinin GC-MS spektrumu Şekil 4.1a'da sunulmaktadır. Bu spektrumdan elde edilen analiz sonuçları Tablo 4.1a'da verilmektedir. Bazıları eser miktarda bazıları ise yüksek miktarda olmak üzere toplamda ekstrede 39 tane bileşen tespit edilmiştir. Bu bileşenlerden miktarları yüksek olan bileşikler (major bileşenler) ve oranları tablo 4.1b'de verilmiştir. Burada verilen 10 tane bileşen ekstredeki tüm bileşenlerin miktar olarak % 94'ünü teşkil etmekte olup, bunların 1 tanesi (Phytol) halkalı olmayan bir diterpen alkol olup diğer 9 tanesi ise uçucu yağ asitleridir. Özellikle Linolenic Acid, Palmitic acid, Linoleic Acid ve Phytol bileşikleri toplam bileşen miktarının % 80'ini teşkil etmektedir.



Şekil 4.1a. *Helleborus vesicarius* bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS spektrumu

Çizelge 4.1a. *Helleborus vesicarius* bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizine göre içerdiği doğal bileşikler (Analiz için bileşenlerin metil esterleri hazırlandığı için sonuçlar metoksi (-OCH₃) kısmı yani metilester kısmı uzaklaştırılmış halde verilmiştir.)

Sıra	BİLEŞİK ADI	Ahkonma Süresi (dk)	% Miktar	Moleküler Formül
1	3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-Hexamethyl-3,5,5 Tris (Trimethylsiloxo) Tetra Siloxane	24.153	0.16	C ₁₈ H ₅₂ O ₇ Si ₇
2	Dodecamethylpentasiloxane	24.163	0.18	C ₁₂ H ₃₆ O ₄ Si ₅
3	Dodecanoic Acid	24.687	0.08	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
4	(R)5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4-7a-trimethyl-2-(4H)-benzofuranone	24.952	0.06	C ₁₁ H ₁₆ O ₂
5	Nonanedioic acid	25.263	0.06	C ₉ H ₁₆ O ₄
6	Tetracosamethyl Cyclododecasiloxane	28.091	0.06	C ₂₄ H ₇₂ O ₁₂ Si ₁₂
7	2,5-Bis(Trimethylsiloxo)-Benzoic Acid Trimethylsilyl Ester	28.096	0.15	C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃
8	Tetradecanoic Acid	29.263	2.26	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
9	1,3-Diphenyl-1,3,5,5-Tetramethyl-cyclotrisiloxane	30.566	0.05	C ₁₆ H ₂₂ O ₃ Si ₃
10	Fumaric acid, 3-heptyl undecyl ester	30.571	0.19	C ₂₂ H ₄₀ O ₄
11	(7E)-7-Hexadecenoic acid	30.820	0.08	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
12	(5Z)-5-Dodecenoic acid	31.043	0.09	C ₁₂ H ₂₂ O ₂
13	(9Z)-9-Dodecenoic acid	31.048	0.11	C ₁₂ H ₂₂ O ₂
14	Pentadecanoic acid	31.380	0.45	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
15	6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone,	31.790	0.20	C ₁₈ H ₃₆ O
16	N-(5-Isobutyl-1,3,4-Thiadiazol-2-yl)-4-Methoxybenzenesulfonimidic Acid	32.714	0.43	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O ₃ S ₂
17	Undecane	32.750	0.22	C ₁₁ H ₂₄
18	Hexadecadienoic Acid	32.755	0.23	C ₁₆ H ₂₈ O ₂
19	7,10,13-Hexadecatrienoic acid	32.890	2.16	C ₁₆ H ₂₆ O ₂
20	9-Hexadecenoic acid	32.989	0.10	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
21	Hexadecanoic Acid (Palmitic acid)	33.442	19.79	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
22	cis-10-Heptadecenoic acid	34.878	0.18	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
23	Heptadecanoic Acid	35.324	0.79	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
24	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl methyl ester	35.500	0.07	C ₁₃ H ₁₆ O ₄

Çizelge 4.1a (devamı)

Sıra	BİLEŞİK ADI	Alıkonma Süresi (dk)	% Miktar	Moleküler Formül
25	(9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoic Acid (Linoleic Acid)	36.641	16.92	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
26	9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic Acid)	36.805	35.99	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
27	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl- , [R-[R*,R*-(E)]]- (Phytol)	36.962	7.91	C ₂₀ H ₄₀ O
28	Octadecanoic Acid (Stearic Acid)	37.183	2.61	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
29	Tetracosanoic acid (Lignoceric acid)	37.244	0.27	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
30	Tricosanoic acid (Tricosylic acid)	37.638	0.49	C ₂₃ H ₄₆ O ₂
31	(Z)-6,10-Dimethyl-5,9-undecadien-2-one (Neryl Acetone)	38.349	0.71	C ₁₃ H ₂₂ O
32	1-Isopropyl-2(Methoxymethoxy)-1,3- Butadiene	38.608	0.15	C ₉ H ₁₆ O ₂
33	Icosane	38.878	1.25	C ₂₀ H ₄₂
34	2-Mercapto-4-methoxypyridine-1-oxide	39.060	0.25	C ₆ H ₇ NO ₂ S
35	Docosanoic acid	40.492	1.95	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
36	Cycloeicosane	40.689	0.28	C ₂₀ H ₄₀
37	Heptadecane	41.016	0.56	C ₁₇ H ₃₆
38	Cis-13-Eicosenoic acid	41.130	2.09	C ₂₁ H ₄₀ O ₂
39	Methyl parinarate (9c,11t,13t,15c- 18:4)	41.841	2.13	C ₁₉ H ₃₀ O ₂

Çizelge 4.1b. *Helleborus vesicarius* bitkisinin Heksan ekstresinin GC-MS analizine göre % 96'lık kısmını oluşturan ana bileşenler

BİLEŞİK ADI	Alınma Süresi (dk)	% Miktar	Moleküler Formül	Moleküler Formül (Metillenmiş)	M ⁺
9,12,15-Octadecatrienoic acid (Linolenic Acid)	36.803	35.99	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292
Hexadecanoic Acid (Palmitic Acid)	33.440	19.79	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
(9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoic Acid (Linoleic Acid)	36.642	16.92	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294
2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- (Phytol)	36.963	7.91	C ₂₀ H ₄₀ O	C ₂₀ H ₄₀ O	296
Octadecanoic Acid (Stearic Acid)	37.181	2.61	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298
Tetradecanoic Acid (Myristic Acid)	29.263	2.26	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
7,10,13-Hexadecatrienoic Acid	32.890	2.16	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	264
Parinaric Acid (9c,11t,13t,15c- 18:4)	41.841	2.13	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290
Cis-13-Eicosenoic Acid	41.130	2.09	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324
Docosanoic Acid (Behenic Acid)	40.492	1.95	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354

Heksen ekstresinin toplamda % 94'lük kısmını oluşturan bu 10 bileşenden bir diterpen alkol olan Phytol hariç geri kalan Linolenik Asit, Palmitik Asit, Linoleik Asit, Stearik Asit, Myristik Asit, Heksadekatrienoik Asit, Parinarik Asit, Cis-13-Eikosenoik Asit, Behenik Asit bileşikler temel (esansiyel) yağ asitleridir ve bunlara ait yapılar ve GC-MS spektrumları **Şekil 4.1b- 4.1k** arasında sunulmaktadır. Bu temel yağ asitleri canlı sistemler için çok gerekli olup memeli hücreleri tarafından sentezlenemez ve dolayısıyla dışarıdan alınması gerekmektedir (Huerta ve ark., 2003). Doymamış yağ asitlerinin eksikliğinin insan vücudunda zararlı ve anormal değişimlere neden olduğu uzun süredir bilinmektedir.

Linolenik asit bir omega-3 doymamış bir yağ asidi olup, lipid zinciri 18:3 ($\Delta^{9,12,15}$) yapısına sahiptir. Yapı olarak 9,12,15-Oktadekatrienoik asit olarak

adlandırılırken fizyolojik literatürde 18:3 (n-3) şeklinde adlandırılır. Linolenik asit 18 karbonlu bir zincire ve üç tane çifte bağa sahip bir karboksilik asittir. İlk çifte bağ zincirin n ucu olarak da adlandırılan metil ucundan itibaren üçüncü karbondan itibaren yer almaktadır. Dolayısıyla linolenik asit n-3 yani omega-3 yağ asidi olarak adlandırılır. Linolenik asit insanlar tarafından sadece beslenme ile elde edilebilir çünkü insan hücreleri stearik asidin 12- ve 15- karbonlarında doymamışlığı sağlayacak olan enzime sahip değildirler. Geçmişte bazı çalışmalar aşırı miktarda linolenik asit alımının prostat kanseri riskini arttırdığını savunurken (Ramon ve ark., 2000; Brouwer ve ark., 2004), Koralek ve ark. (2006) oldukça kapsamlı bir çalışmayla aslında alınan toplam linolenik asit miktarı ile prostat kanseri arasında bir ilişki olmadığını göstermişlerdir. Bu konuyla ilgili son olarak da Simon ve ark. (2009) linolenik asit ile prostat kanseri arasında ilişki kurulmasının abartıldığını göstermişlerdir. Linolenik asit tüketiminin az da olsa kalp ve damar hastalıkları oluşumunu engelleyici etkisi olduğuna dair kanıtlar da bulunmaktadır (Reiner ve ark., 2014).

Palmitik asit veya IUPAC adıyla heksadekanoik asit bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda en yaygın bulunan doymuş yağ asididir (Gunstone ve ark., 2007). İsmi çokça bulunduğu palmye ağaçlarından alan palmitik asit 16:0 yapısında bir lipid zincirine sahiptir. İnsan hücrelerinde karbonhidratların aşırı palmitik aside çevrilmektedir. Dolayısıyla palmitik asit hayvansal hücrelerin temel bileşenlerinden birisidir. Yapılan bir çalışmaya göre palmitik asit insan depo yağlarının %21-30'unu oluşturmaktadır (Kingsbury ve ark., 1961) ve bu yağ asidi anne sütünün önemli bir bileşenidir (Jensen ve ark., 1978). Biyolojide bazı proteinler bir palmitol grubu eklenmesi ile modifiye edilirler ve bu prosese palmitolasyon adı verilir. Birçok proteinin membran lokalizasyonunda Palmitolasyon çok önem arz etmektedir. Palmitik asit sabun, kozmetik ve yüzey kayganlaştırıcı olarak kullanım alanlarına sahiptir. Son zamanlarda paliperidon palmitat adı verilen ve şizofren tedavisinde kullanılan bir antipsikotik ilaç yağlı palmitat esteri kullanılarak sentezlenmiştir. Dünya sağlık örgütüne (2003) göre palmitik asit tüketimi kalp damar hastalıkları riskini arttırmaktadır ve bu sebeple trans yağ asitleri ile aynı kategoriye konulmaktadır. Retinil Palmitat bir antioksidan ve vitamin A kaynağı olup, düşük

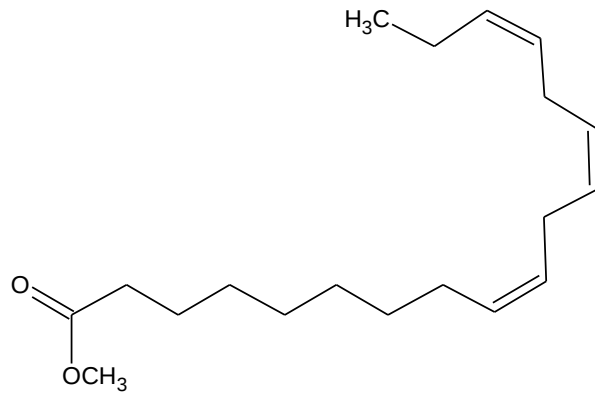
yağlı sütlerde yağın uzaklaştırılması esnasında yağla beraber kaybolan vitamin içeriğini kompanse etmek için eklenir. Palmitat A vitaminin Retinol'un alkol ucuna bağlanarak A vitaminin sütte kararlı olmasını sağlar. Yine fareler üzerinde yapılan bir *in vivo* çalışmada %20 palmitik asit ve % 80 karbonhidrat ile beslenen farelerde insülin salgılanmasını kontrol eden merkezi sinir sisteminde değişiklikler olduğu ve insülin ve leptin'den kaynaklanan iştah artışının baskılandığı gözlemlenmiştir (Benoit ve ark., 2009).

Linoleik asit bir doymamış omega-6 yağ asididir ve oda sıcaklığında renksiz bir sıvıdır. Fizyolojik literatürde, lipid zinciri 18:2 ($\Delta^9, 12$) yapısına sahiptir. Kimyasal olarak, linoleik asit 18 karbon zincirine ve iki cis yapılı çifte bağa sahip bir karboksilik asittir. Bu çifte bağlardan ilki zincirin metil ucundan itibaren 6. Karbonda yer almaktadır ve bu yüzden de omega-6 yağ asidi olarak adlandırılır (Anneken ve ark., 2006). Linoleik asit de insan vücudu tarafından sentezlenemeyen ve dışarıdan besinlerle alınması gereken temel yağ asitlerindendir (Burr ve ark., 1930). Linoleik asit sağlıklı bir yaşam için tüketilmesi gereken temel yağ asitlerindendir. Linoleat (linoleik asidin tuz formu) içermeyen bir beslenme şekli deride hafif pullanma ve saç dökülmesi (Cunnane ve Anderson, 1997) ve farelerde yaraların iyileşmesinin yavaşlaması (Ruthig ve Meckling-Gill, 1999) gibi etkiler doğurabilmektedir. Hamam böcekleri öldükleri zaman Oleik asit ile beraber linoleik asit salgılarlar ve bu diğer hamam böceklerine o bölgeden uzak durmaları sinyalini verir (Anonim, 2009). Cilde faydalarından dolayı linoleik asit son zamanlarda güzellik ürünlerinde oldukça popüler olmaya başladı. Birçok çalışma cilde düzenli uygulandığında linoleik asidin anti-inflamatuar, akne azaltıcı ve nem tutucu özelliklerine işaret etmektedir (Diezel ve ark., 1993; Letawe ve ark., 1998; Darmstadt ve ark., 2002).

Fitol (Pythol), E vitamini ve K1 vitamini sentetik formlarının üretiminde kullanılan halkalı olmayan bir diterpen alkoldür (Daines ve ark., 2003; Netscher, 2007). Geviş getiren hayvanlarda, yenilen bitkilerin bağırsaklarda fermentasyonu esnasında klorofilden Fitol açığa çıkarılır ve sonrasında yağlarla beraber depolanmak üzere Fitanik aside dönüştürülür (Brink ve Wanders, 2006).

Bir otozomal resesif düzensizlik olan Refsum hastalığı dokularda yüksek miktarda fitanik asit birikmesinden kaynaklanmaktadır ve bu hastalık beyincik

ataksisi (beyincik kaynaklı kaslarda uyumsuzluk), retinis pigmentosa (görme kaybı ya da körlüğe neden olan bir göz hastalığı), anosmia (koku alamama) ve işitme kaybı gibi sorunlara sebep olabilmektedir (Wierzbicki 2007). Her ne kadar insan hücreleri klorofilden fitanik asit üretmeseler de, serbest fitol'ü fitanik aside dönüştürebilirler. Bu sebeple Refsum hastalarının fitanik asit ya da fitol alımını durdurmaları gerekir (Wanders ve Komen, 2007). Serbest fitol içeren birçok yiyecek ürünleri bilinmektedir (Brown ve Komen, 1993). Bu kimyasalları doğada birçok canlı savunma amaçlı kullanmaktadır. Sumak piresi gibi bazı böceklerin fitol ve fitanik asit gibi bileşikler avlanmaya karşı caydırıcı kimyasal olarak kullandığı rapor edilmiştir (Venci ve Morton, 1998). Bu bileşikler üzerlerinde yaşadıkları bitkiden kaynaklanmaktadır. Fitol aynı zamanda bir jeokimyasal marker (işaretleyici) olarak ta kullanılır. Fitol muhtemelen biyosferdeki en çok bulunan izoprenoid bileşiktir ve bunun bozunma ürünleri sulak alanlarda biyojeokimyasal bir gösterge olarak kullanılır (Rontani ve Volkman, 2003). Fitol'ün ticari amaçlı kullanım alanları da mevcuttur. Fitol güzel koku endüstrisi yanısıra kozmetiklerde, şampuanlarda, tuvalet sabunlarında, ev temizlik ürünlerinde ve deterjanlarda kullanılır (McGinty ve ark., 2010). Dünya çapındaki kullanımının yaklaşık olarak yıllık 0.1-1.0 metrik ton olduğu tahmin edilmektedir (Anonim, 2004).



Linolenic Acid, Methyl Ester

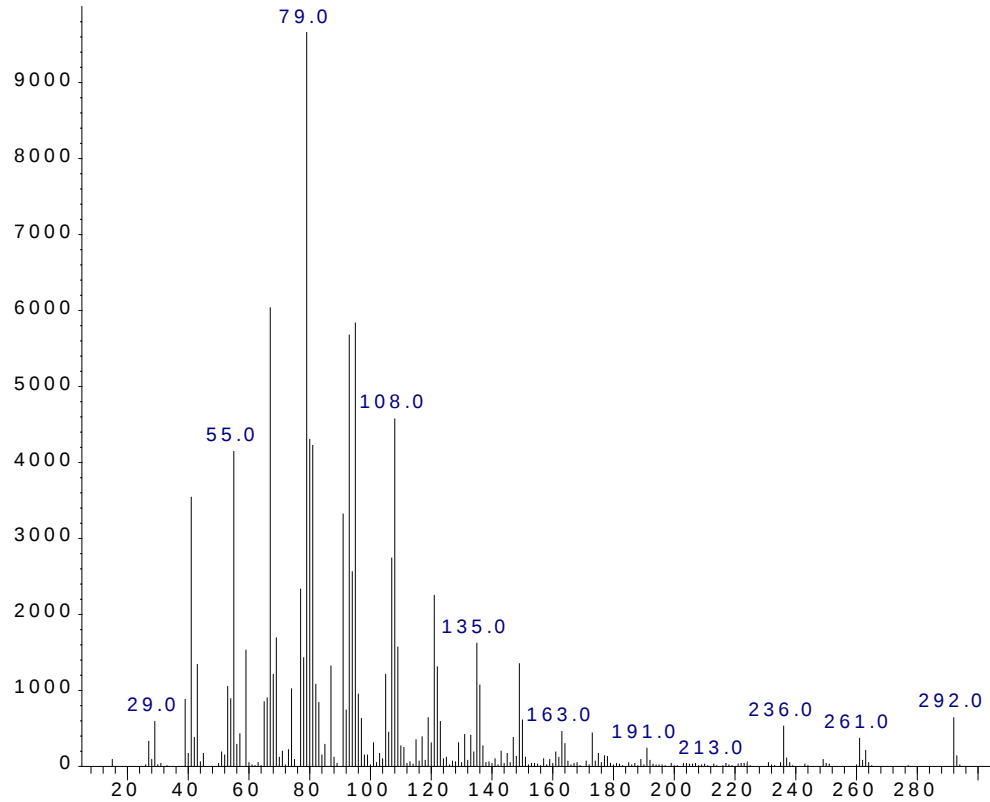
Molecular Formula = $C_{19}H_{32}O_2$

Formula Weight = 292.4562

Average Mass = 292.463542 Da

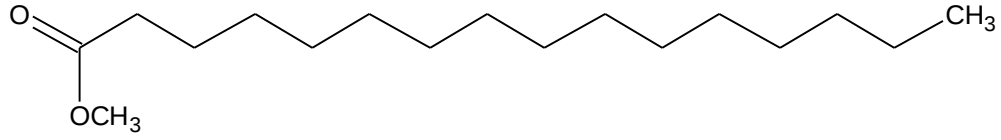
Abundance

atrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)- \$\$ Linolenic acid, methyl ester \$\$ Methyl all-cis-9,12,15-o



m/z-->

Şekil 4.1b. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Linolenik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu



Palmitic Acid, Methyl Ester

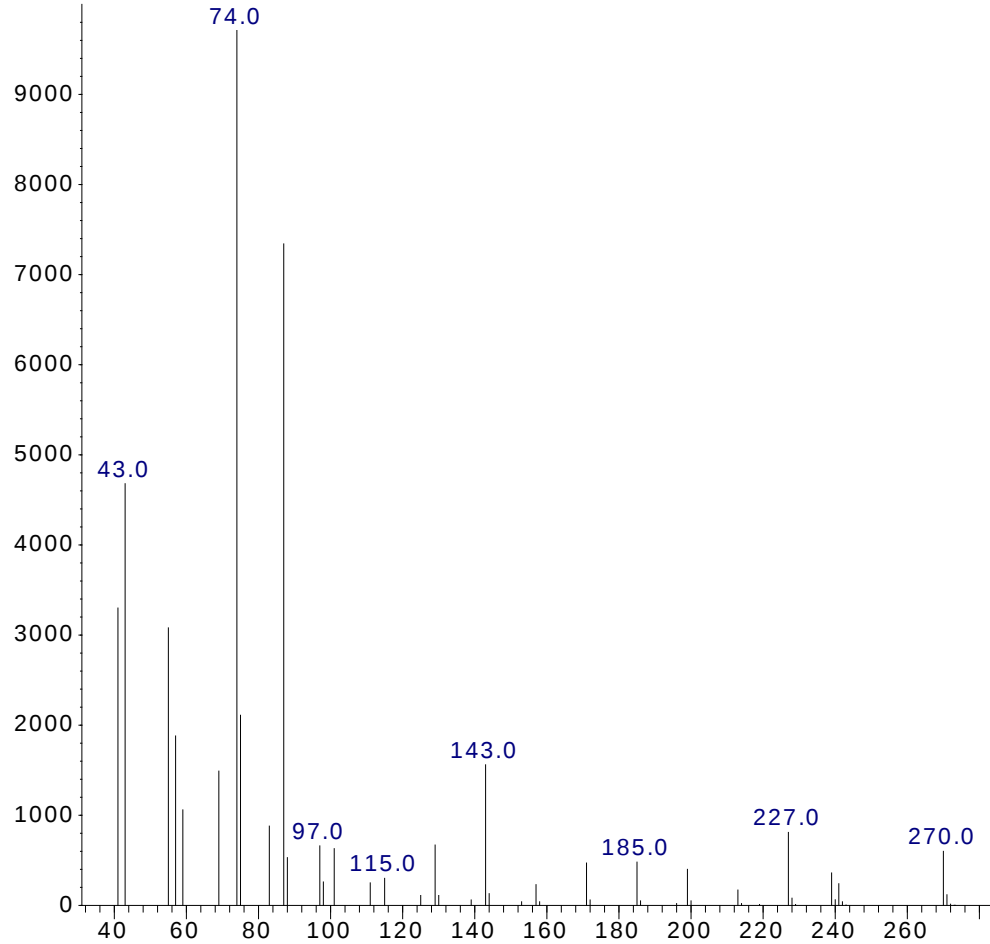
Molecular Formula = $C_{17}H_{34}O_2$

Formula Weight = 270.4507

Average Mass = 270.45742 Da

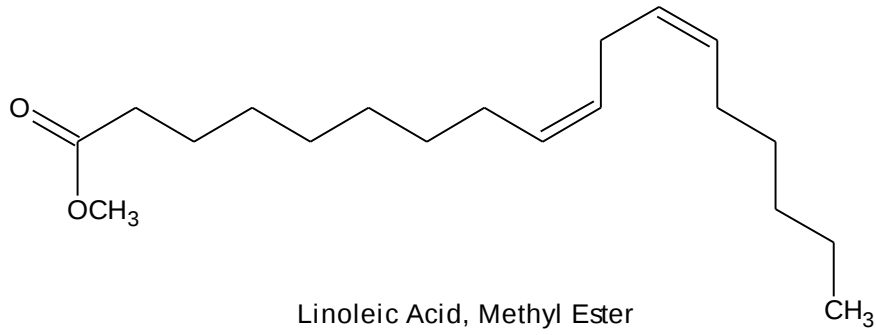
Abundance

CANOIC ACID, METHYL ESTER \$\$ METHYL HEXADECANOATE \$\$ PALMITIC ACID MET



m/z-->

Şekil 4.1c. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Palmitik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu

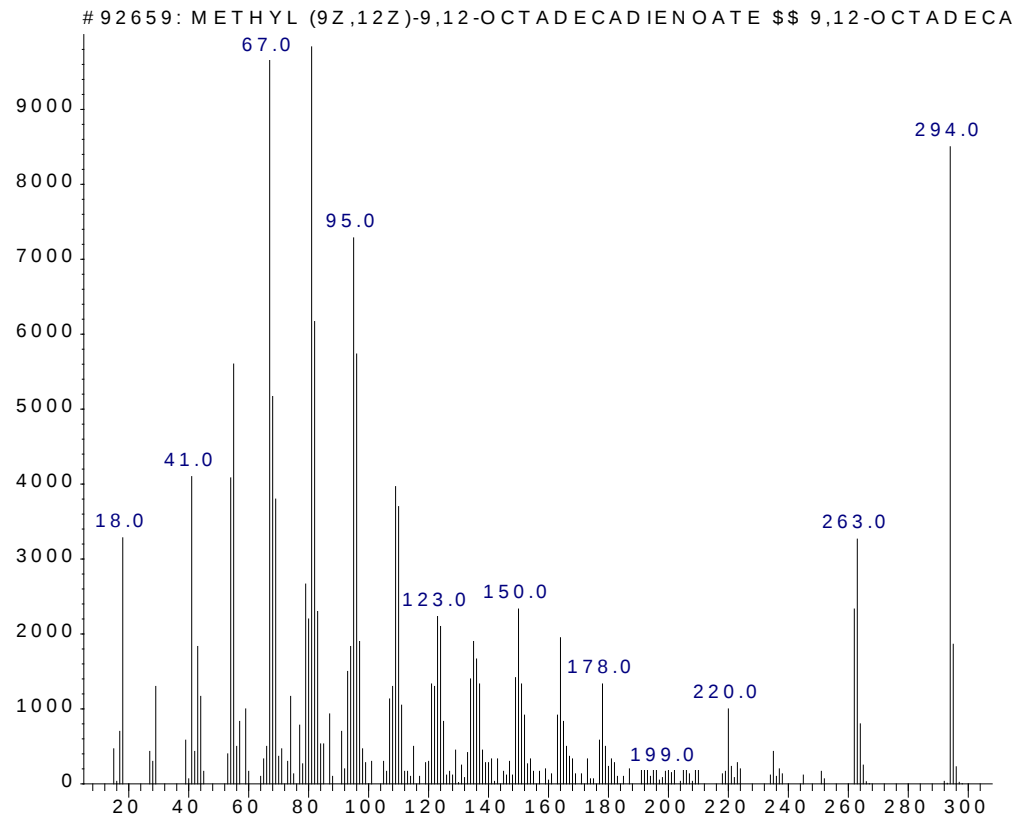


Molecular Formula = $C_{19}H_{34}O_2$

Formula Weight = 294.4721

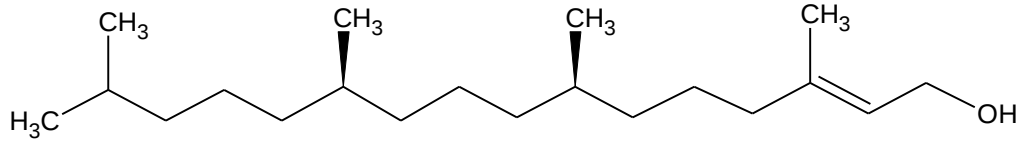
Average Mass = 294.479493 Da

Abundance



m/z-->

Şekil 4.1d. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Linoleik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu



Phytol

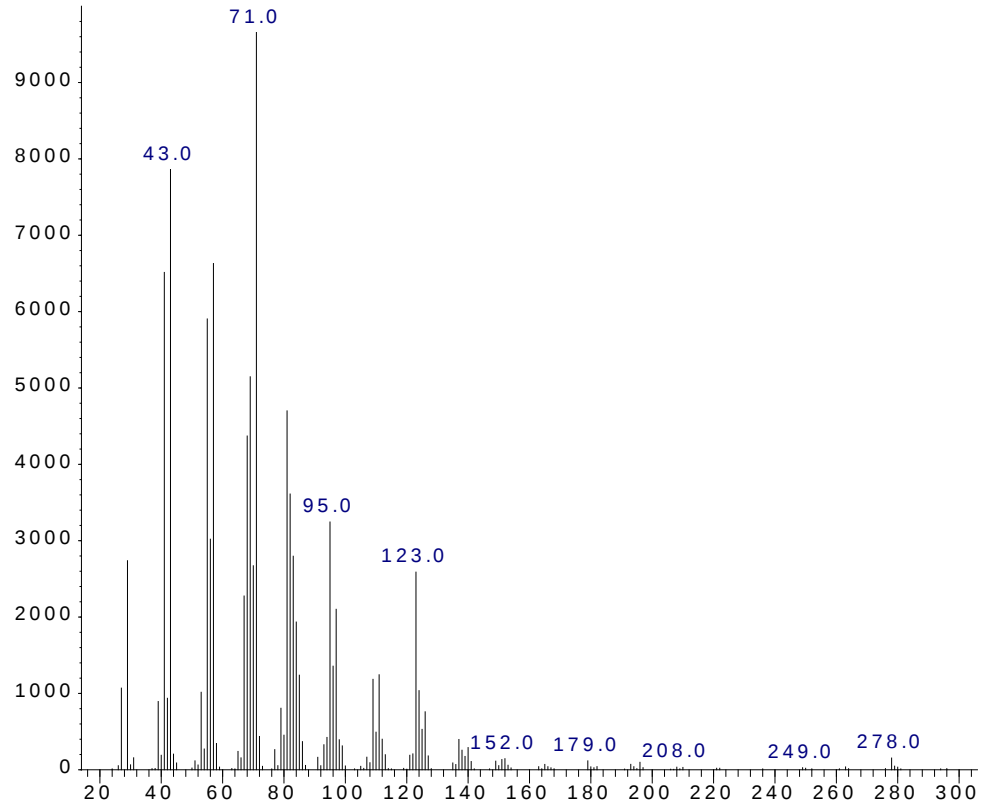
Molecular Formula = $C_{20}H_{40}O$

Formula Weight = 296.531

Average Mass = 296.539081 Da

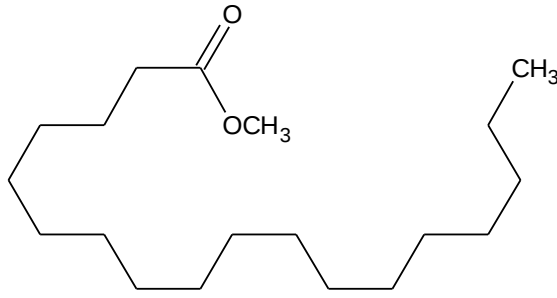
Abundance

2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]- trans-Phytol 3,7,11,15-Tetramethyl-



m/z-->

Şekil 4.1e. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Fitol'ün yapısı ve GC-MS spektrumu



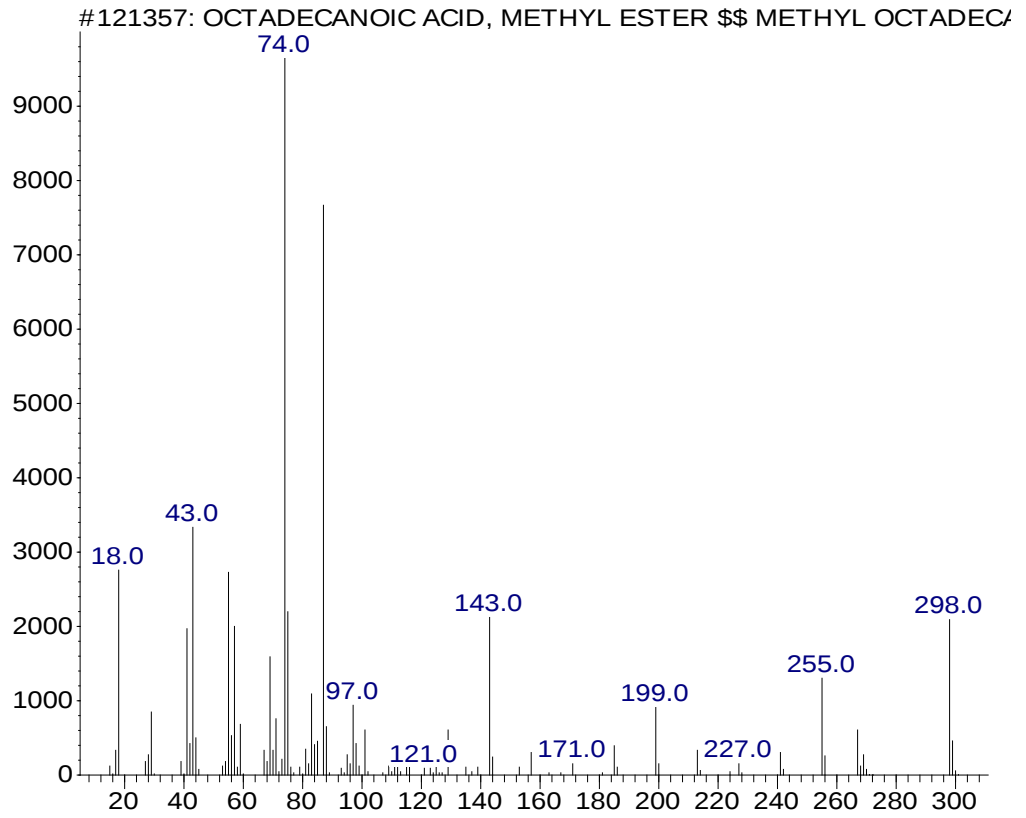
Stearic Acid, Methyl Ester

Molecular Formula = $C_{19}H_{38}O_2$

Formula Weight = 298.5038

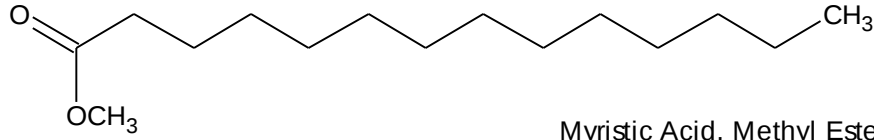
Average Mass = 298.511397 Da

Abundance



m/z-->

Şekil 4.1f. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Stearik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu



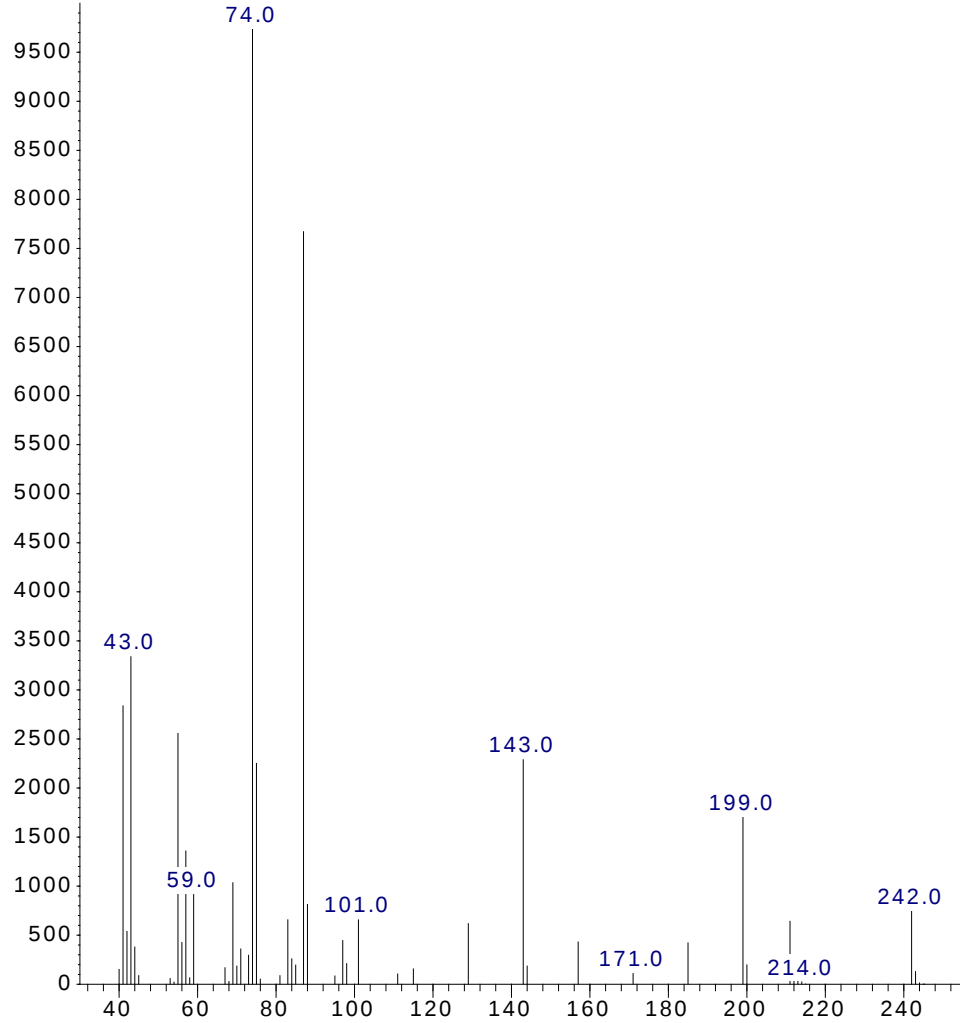
Molecular Formula = $C_{15}H_{30}O_2$

Formula Weight = 242.3975

Average Mass = 242.403442 Da

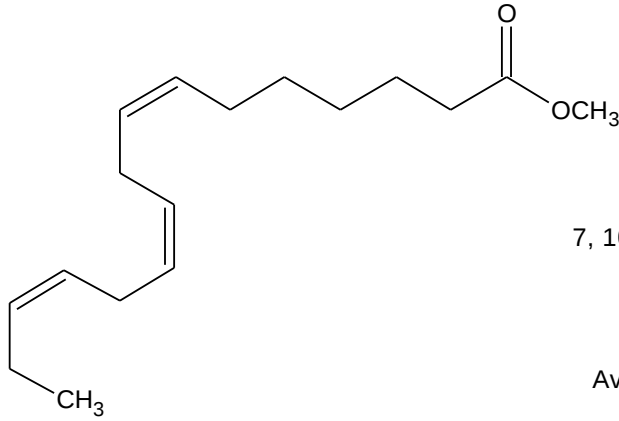
Abundance

MYRISTIC ACID, METHYL ESTER \$\$ METHYL TETRADECANOATE \$\$ MYRISTIC ACID M



m/z-->

Şekil 4.1g. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Myristik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu



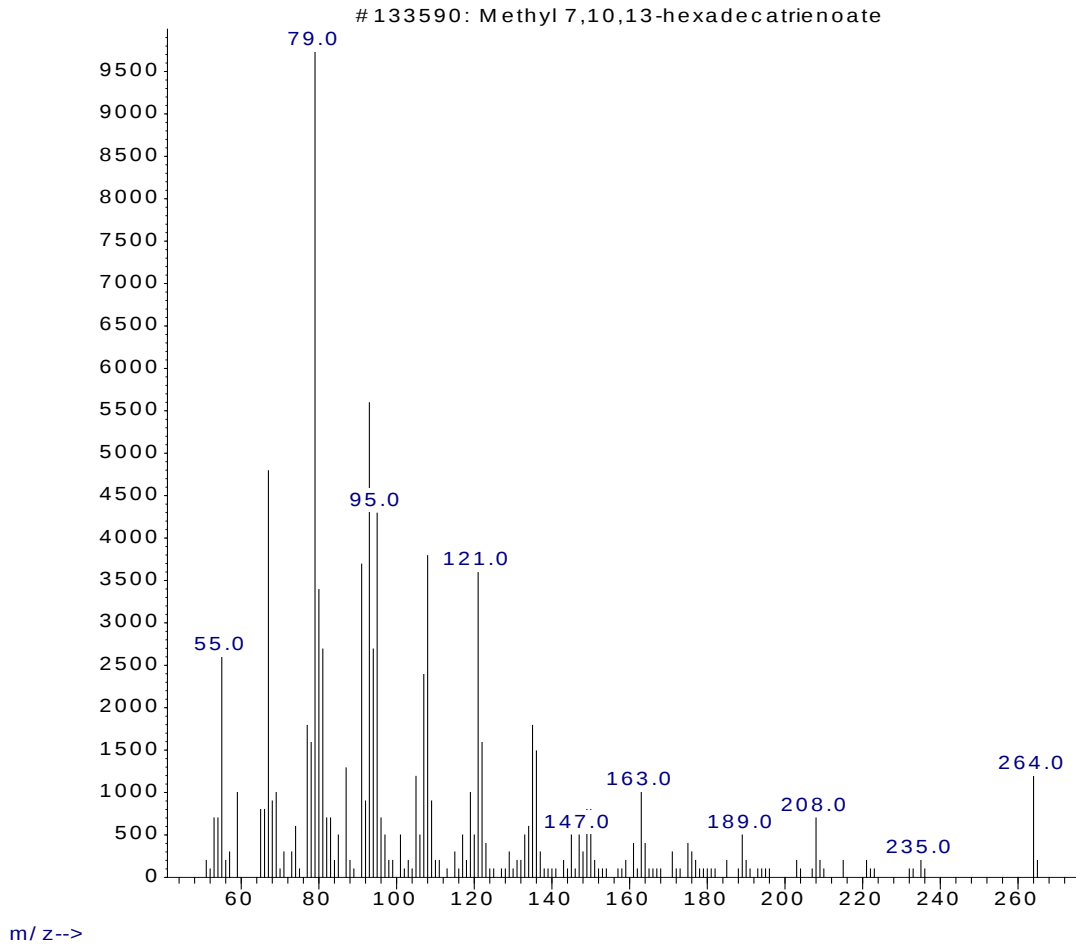
7, 10, 13-Hexadecatrienoic acid, Methyl Ester

Molecular Formula = $C_{17}H_{28}O_2$

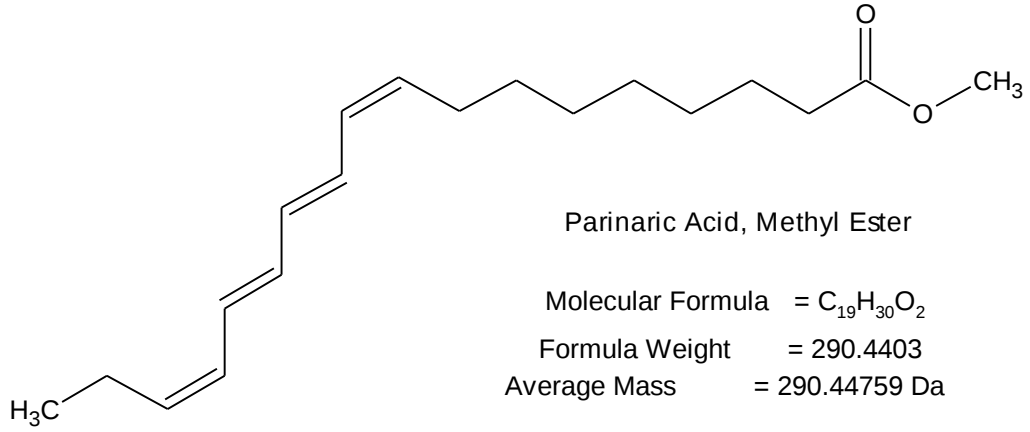
Formula Weight = 264.403

Average Mass = 264.409564 Da

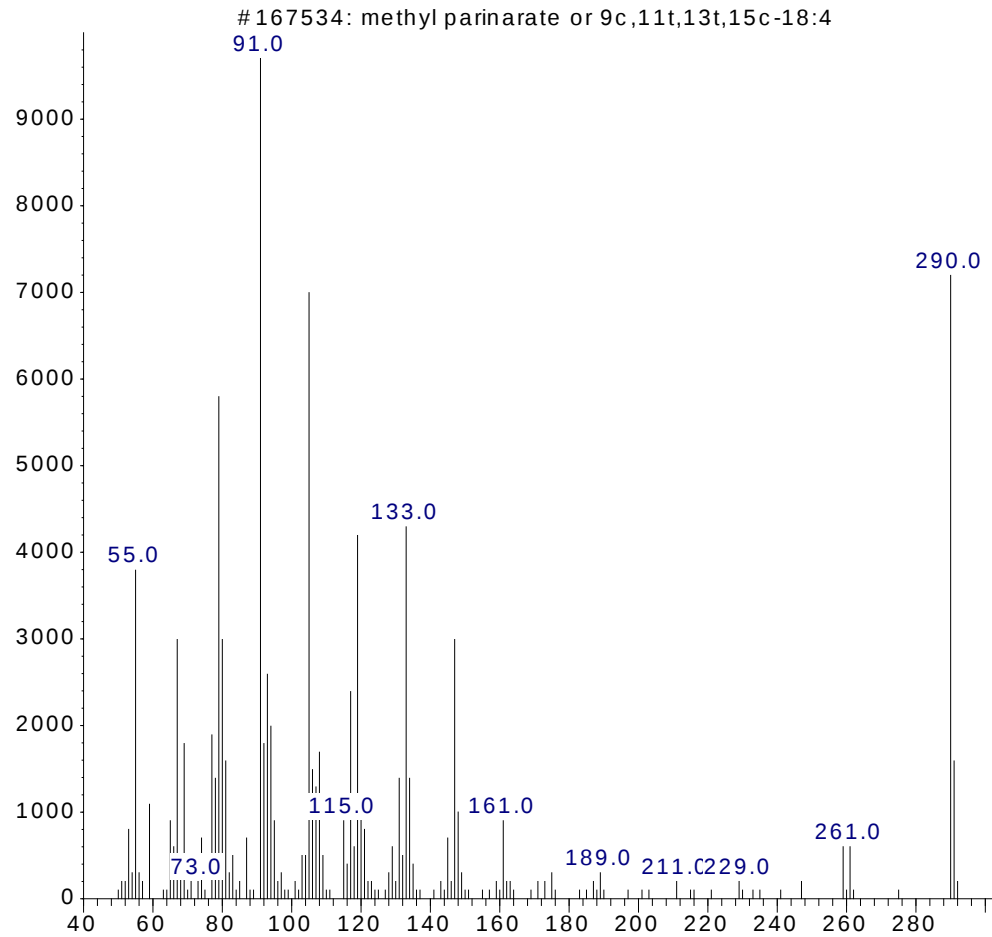
Abundance



Şekil 4.1h. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan 7,10,13-Heksedekatrienoik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu

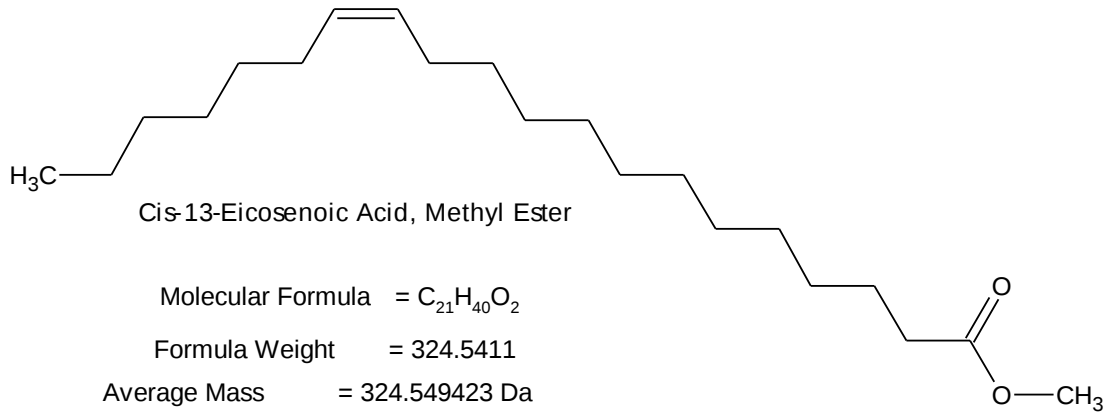


Abundance

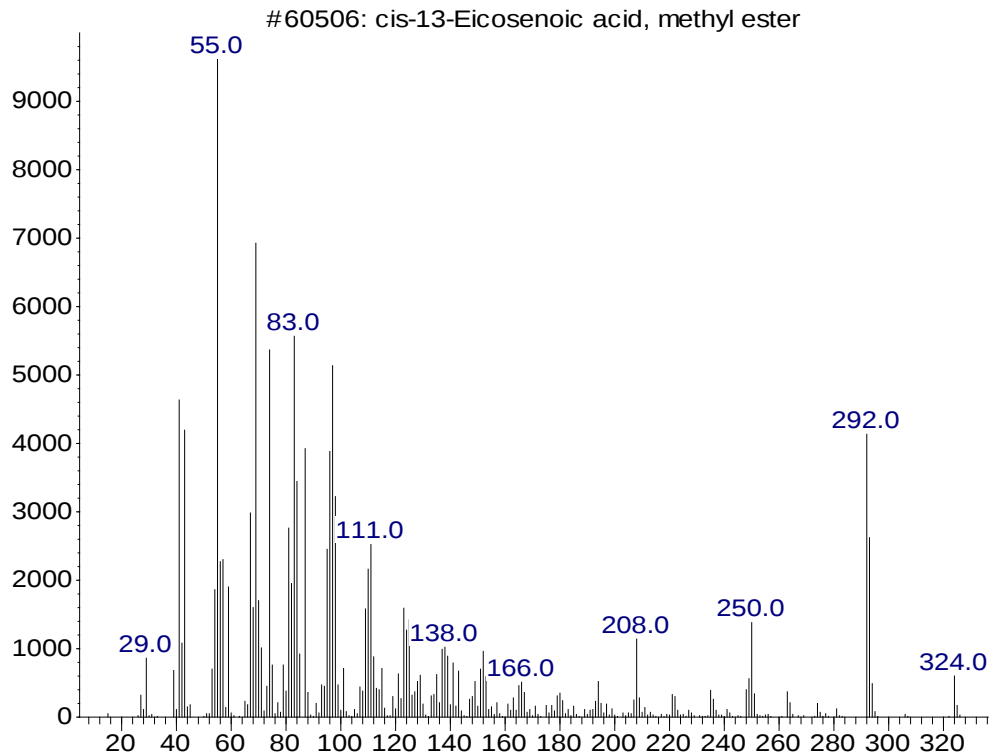


m/z-->

Şekil 4.1i. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Parinarik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu

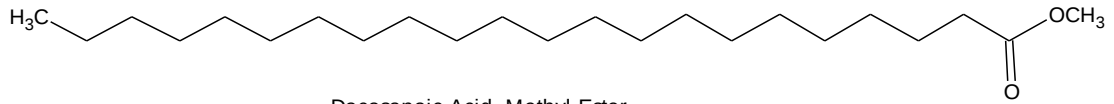


Abundance



m/z-->

Şekil 4.1j. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan cis-13-Eikosenoik Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu



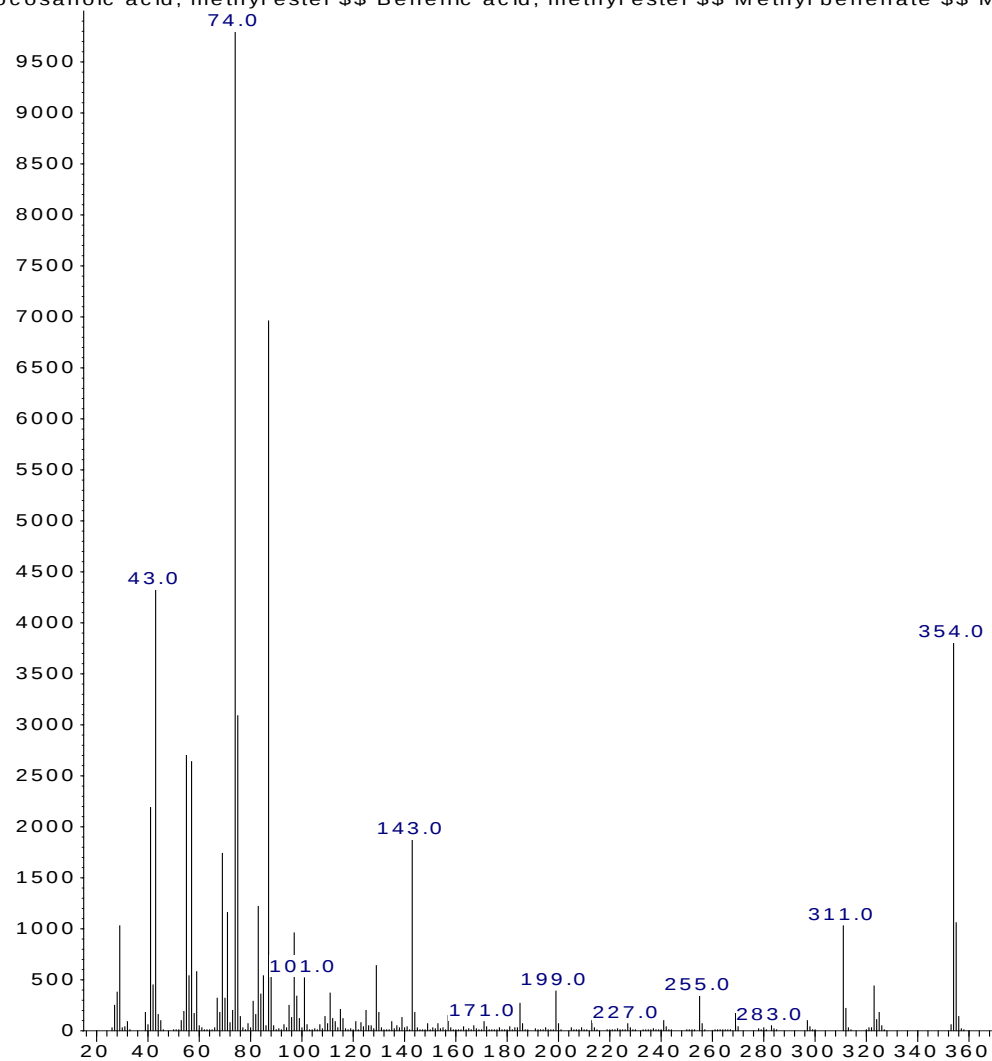
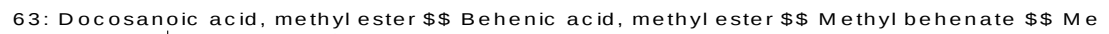
Docosanoic Acid, Methyl Ester

Formula Weight = 354.6101

Molecular Formula = C₂₃H₄₆O₂

Average Mass = 354.619352 Da

Abundance



m/z-->

Şekil 4.1k. *Helleborus vesicarius* bitkisinden elde edilen Heksen ekstresinde bulunan Dokosanoik (Behenik) Asit'in yapısı ve GC-MS spektrumu

4.2. Mikrobiyolojik Analiz: Antimikrobiyel Aktivite

Helleborus vesicarius bitkisinden elde edilen metanol, butanol, heksan ve su ekstralarının antimikrobiyel aktivitelerinin incelenmesinde Agar Disk Diffüzyon Metodu ve Minimum İnhibitor Konsantrasyonu olmak üzere iki yöntem kullanıldı. “Kirby-Bauer Antibiyotik Testi (KB test)” veya “Disk Diffüzyon Antibiyotik Duyarlılık Testi” de denilen Agar Disk Diffüzyon Testi için bakterilerin bitki ekstresinden etkilenip etkilenmediğini test etmek için ekstre emdirilmiş özel kâğıt diskler kullanılır. Bu testte, ekstreği içeren kâğıt diskler daha önceden bakterilerin yerleştirildiği bir agar plaka üzerine yerleştirilir ve tabaka inkübasyona bırakılır. Eğer ekstre bakterinin üremesini durduruyor ya da bakteriyi öldürüyorsa diskin etrafında bakterinin üremediği gözle görülür bir bölge olacaktır. Bu bölgeye inhibisyon bölgesi (inhibition zone) denir ve bu bölgenin çapının büyüklüğü ekstrenin ne kadar etkili antibiyotik aktiviteye sahip olduğunun göstergesidir. Antimikrobiyel aktivitesi yüksek olan ekstre daha büyük bir inhibisyon bölgesi çapı oluşturacaktır. Elde edilen inhibisyon çapı bilinen bir antibiyotik ilaç ile karşılaştırılır ve bu bilgi kullanılarak herhangi bir hastalığa özgü uygun antibiyotiği seçmek için kullanılabilir (Mohanty ve ark., 2010).

Agar Disk Diffüzyon oldukça yaygın ve verimli bir yöntem olmakla beraber bazı eksiklikleri mevcuttur. Disk Diffüzyon Metodunun hassaslığı sadece test edilen maddenin (ekstre, kimyasal, ilaç vb.) antimikrobiyel gücüne bağlı değil aynı zamanda o maddenin diffüze olabilme yeteneğine de bağlıdır. Bileşikler çok iyi antimikrobiyeller olsa bile eğer polar agar ortam içerisinde iyi diffüze olamıyorsa o zaman sonuç ya negatif çıkacaktır (aktivite göstermeyecektir) ya da elde edilen küçük inhibisyon çapından dolayı aktivite çok zayıf bulunacaktır. Bu sebepten dolayı mikro ve makro dilüsyon metodları çok önem arz etmektedir.

MİK (Minimum inhibisyon konsantrasyonu) bir antimikrobiyelin bir gecelik bir inkübasyondan sonra bir mikroorganizmanın üremesini engellediği en düşük konsantrasyon demektir. Minimum İnhibisyon konsantrasyonları hem mikroorganizmaların bir antimikrobiyelle dirençlerini tespit etmek hem de yeni antimikrobiyel maddelerin aktivitesini tayin etmek açısından önem arz etmektedir (Andrews, 2001). MİK testi hem Disk Diffüzyon ile elde edilen sonuçların

doğrulanması açısından hem de ekstrelerin etkin olduğu en düşük konsantrasyonun tespit edilmesi açısından önemlidir.

4.2.1. Disk difüzyon testi analizi

Disk Difüzyon Testi sonucunda elde edilen antimikrobiyel aktivite sonuçları Çizelge 4.2a’da verilmektedir. Daha kolay anlaşılabilmesi ve aktivitelerin daha kolay karşılaştırılabilmesi için Disk Difüzyon Testi Analiz sonuçları ayrıca % Aktivite İndeks çizelgesi olarak da çizelge 4.2b’de verilmektedir. Aktivite indeksi; % Aktivite İndeksi = (Örneğin İnhibisyon Çapı) / (Standardın İnhibisyon Çapı) x 100 formülü ile hesaplandı.

Çizelge 4.2a. *Helleborus vesicarius* ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyel aktiviteleri (İnhibisyon Bölge Çapları olarak)

Mikroorganizmalar		İnhibisyon Bölge Çapları(mm)*					
		MeOH ekstresi	BuOH ekstresi	Heksan ekstresi	H ₂ O ekstresi	CF	NYS
Gram-Negatif	<i>Salmonella thyphimurium</i> CCM 5445	10	11	11	8	14	-
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9	10	12	8	14	-
	<i>Escherichia coli</i> 0157H7	10	12	12	8	13	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21	10	18	8	20	-
Gram-Pozitif	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10	10	10	8	12	-
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10	10	10	8	17	-
	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 13590	10	12	12	8	15	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	11	8	10	12	-	18

Bitki ekstreleri (25µg/disk); CF: Cefotazidime 30 µg/disk); NYS: Nystatin (20 µg/disk). * Filtre kâğıdının çapını da içermektedir (6 mm).

Çizelge 4.2b. *Helleborus vesicarius* ekstrelerinin disk diffüzyon metoduyla antimikrobiyel aktiviteleri (Aktivite İndeksi olarak)

Mikroorganizmalar		Aktivite İndeksi (%)					
		MeOH ekstresi	BuOH ekstresi	Heksan ekstresi	H ₂ O ekstresi	CF	NYS
Gram-Negatif	<i>Salmonella thyphimurium</i> CCM 5445	72	79	79	57	100	-
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	64	72	86	57	100	-
	<i>Escherichia coli</i> 0157H7	77	92	92	62	100	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	105	50	90	40	100	-
Gram-Pozitif	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	83	83	83	67	100	-
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	59	59	59	47	100	-
	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 13590	67	80	80	53	100	-
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	61	44	56	67	-	100

Bazıları orta derecede bazıları da iyi olmak üzere ekstrelerin tamamının test edilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, genel olarak apolar bileşikler ve uçucu yağları içeren heksan ekstresinin diğer ekstrelerle göre en yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu, daha çok şekerli bileşikler içeren su ekstresinin ise en düşük antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Aktivite açısından Heksan ekstresini polaritesi daha yüksek olan sekonder metabolitleri içeren bütanol ekstresi takip etmektedir. Metanol ekstresinin ise özellikle gram-pozitif bakteri *Staphylococcus aureus*’a karşı oldukça yüksek bir inhibisyon bölge çapı sağladığı ve bu haliyle bu bakteriye karşı referans antibiyotikten bile daha yüksek aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Gram pozitif bakteri *Enterococcus faecalis* genel olarak ekstrelerin tümüne karşı en yüksek direnç gösteren mikroorganizma olarak göze çarpmaktadır. Ayrıca ekstrelerin tamamının *Candida albicans* üzerinde orta derecede antifungal etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

4.2.2. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) testi analizi

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) Testi sonucunda elde edilen antimikrobiyel aktivite sonuçları Çizelge 4.2c’de verilmektedir.

Çizelge 4.2c. *Helleborus vesicarius* ekstrelerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu

Mikroorganizmalar		Bitki ekstreleri ve referans antimikrobiyellerin MIC değerleri (µg/ml)					
		MeOH	BuOH	Heksan	H ₂ O	AMP	FC
		ekstresi	ekstresi	ekstresi	ekstresi		
Gram-Negatif	<i>Salmonella thyphimurium</i> CCM 5445	31.2	31.2	15.6	7.8	3.9	-
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	62.5	62.5	31.2	62.5	1.9	-
	<i>Escherichia coli</i> 0157H7	62.5	31.2	31.2	62.5	3.9	-
Gram-Pozitif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	62.5	31.2	31.2	31.2	3.9	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	31.2	62.5	15.6	31.2	1.9	-
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	62.5	31.2	15.6	31.2	7.8	-
	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 13590	31.2	31.2	7.8	15.6	3.9	-
Maya	<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	3.9	31.2	3.9	3.9	-	7.8

AMP: Ampicillin, FC: Flucytosine, -: Saptanmadı

Mikro dilüsyon yöntemi ile yapılan minimum inhibisyon konsantrasyonu tayininde mikroorganizmaların üremesinin durdurulduğu en düşük konsantrasyonlar Heksan ekstresi ile elde edildi. Dolayısıyla heksan ekstresinin en yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmektedir. En yüksek antibakteriyel aktiviteler heksan ekstresi tarafından *Enterococcus faecium*’a karşı ve su ekstresi tarafından *Salmonella thyphimurium*’a karşı 3.9 µg/ml’lık elde edilen en düşük konsantrasyonlarla gösterilmiştir. Ekstrelerin Antifungal etkilerine bakıldığında, bütanol ekstresi hariç tüm ekstrelerin referans ilaç Flucytosine’den daha yüksek bir antifungal aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Flucytosine 7.8 µg/ml konsantrasyonda maya üremesini durdururken bu ekstreler etkilerini 3.9 µg/ml konsantrasyonda göstererek maya üremesini durdurmuşlardır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Ülkemize endemik olan ve hakkında literatürde daha önce kimyasal ya da biyolojik içerikli herhangi bir çalışma olmayan *Helleborus vesicarius* bitkisi ilk defa tarafımızdan çalışıldı. Çalışmanın kimyasal kısmında elde edilen beş ekstreden birisi olan Heksan ekstresinin içerdiği uçucu yağlar ve temel yağ asitlerinin tayini GC-MS analizi ile yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre bitkinin temel yağ asitleri açısından oldukça zengin bir içeriğe sahip olduğu belirlendi. Birer temel yağ asidi olan Linolenik asit (omega-3), Palmitik asit, Linoleik asit (omega-6) ve bir diterpen alkol olan Phytol, heksan ekstresinin toplam bileşenlerinin %81'ini oluşturmaktadır. Bu bileşenler farmakolojik açıdan oldukça önem arz eden bileşenler olup insan hücrelerinde sentezlenemedikleri için hazır olarak gıdalarla dışarıdan alınması gerekmektedir. Bu bileşenlerin iştah artışı baskılayıcı, kalp ve damar hastalıkları oluşumunu engelleyici, anti-inflamatuar, akne azaltıcı ve nem tutucu vb gibi etkilere sahip olduklarına dair çeşitli çalışmalar literatürde sabittir. Doymamış yağ asitlerinin eksikliğinin insan vücudunda zararlı ve anormal değişimlere neden olduğu uzun süredir bilinmektedir. Bu bileşenlerin eksikliği deride hafif pullanma, saç dökülmesi ve yaraların yavaş iyileşmesi gibi etkiler doğurabilmektedir. Ayrıca endüstride sabun, kozmetik, ilaç ve yüzey kayganlaştırıcı olarak kullanım alanları mevcuttur.

Çalışmanın biyolojik kısmında bitkiden elde edilen tüm ekstrelerin çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel ve mayaya karşı antifungal aktivitesi incelendi. Disk Difüzyon testi ve mikro dilüsyon metodu olmak üzere iki farklı yöntem ile elde edilen tüm ekstrelerin antimikrobiyel aktiviteleri çalışıldı. Sonuçlar tüm ekstrelerin iyi ya da orta derecede antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğunu gösterdi.

Helleborus vesicarius (Ranunculaceae) Türkiye'nin Adıyaman ve Toroslar bölgesine endemik olup içerdiği doğal bileşikler ve biyolojik aktiviteleri hakkında bilinen bir çalışma yoktur. Bu çalışma halk arasında halk ilacı olarak kullanılan Ranunculaceae ailesi üyesi olan *Helleborus Vesicarius*'un hem uçucu yağlarının içeriği ile ilgili olarak hem de antimikrobiyel etkisinin incelenmesi açısından ilk çalışmadır. Bu bitkiye ait diğer ekstrelerden ve özellikle sekonder metabolitlerin zengin olduğu bütanol ekstresine ait doğal bileşik izolasyon ve karakterizasyonu

çalışmalarının ileride yapılması ve bu bilgilerin literatüre kazandırılması planlanmaktadır. Ayrıca biyolojik olarak aktif bir cinsin üyesi olan *Helleborus vesicarius*'a ait elde edilen farklı ekstraktların bu çalışmadaki antimikrobiyel aktivite çalışmalarının yanı sıra antioksidan ve sitotoksik aktivitelerin de çalışılması ve literatüre kazandırılması da yine büyük önem arz etmektedir. Bu çalışma tüm bu kimyasal ve biyolojik çalışmaların ilk ayağını teşkil etmektedir ve diğer planlanan çalışmalar tamamlandığında elde edilen veriler bitkinin farmakolojik açıdan önemini irdilemekte yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- AKİN, S., ve ANİL, H., 2007. A furostanol saponin and phytoecdysteroid from roots of *Helleborus orientalis*. Chemistry of Natural Compounds, 43(1): 90-92.
- ANDREWS, J. M., 2001. "Determination of minimum inhibitory concentrations". Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48(1): 5–16.
- ANNEKEN, D. J., BOTH, S., CHRISTOPH, R., and FIEG, G., 2006. Udo Steinberner, Alfred Westfechtel "Fatty Acids" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim.
- ANONİM, 2012. Doğu Çöplemesi (*Helleborus*). Orman Genel Müdürlüğü Dökümanları.
http://web.ogm.gov.tr/birimler/merkez/odundisiurun/Dkmanlar/bitkisel_urunler_sube_mudurlugu/BITKISEL%20URUNLER/DO%C4%9EU%20%C3%87%C3%96PLEMES%C4%B0.pdf (07.11.2014’de ulaşıldı).
- ANONİM, 2014, http://tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=131 (07.11.2014’de ulaşıldı).
- ANONYMOUS, 1979. World Health Organization, Chronicle 33, Inventory of Medicinal Plants, Selection And Characterization.
- ANONYMOUS, 2002. World Health Organization , WHO mortality data.
- ANONYMOUS, 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M7-A6. Approved Standard- 8th edn. Wayne NCCLS document, Pennsylvania, USA.
- ANONYMOUS, 2003. World Health Organization. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, WHO Technical Report Series 916, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. p. 88 (Table 10)
- ANONYMOUS, 2004. IFRA (International Fragrance Association). Use Level Survey, August.
- ANONYMOUS 2004. World Health Organization (2004). “The world health report 2004" Annex Table 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002.
- ANONYMOUS, 2007. NASA Science: Science News.
http://science.nasa.gov/science-news/science-at-nasa/2007/11may_locad3

- ANONYMOUS, 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 19th informational supplement. Approved Standard M100-S19 NNCLS (National Committee for Clinical Standards), Wayne PA January.
- ANONYMOUS, 2014. World Health Organization Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, 257s.
- APETREI, N. S., LUPU, A. R., CALUGARU, A., KEREK, F., SZEGLI, G., and CREMER, L., 2011. The antioxidant effects of some progressively purified fractions from *Helleborus purpurascens*. Romanian Biotechnological Letters, 16(6): 6673-6682.
- BASSARELLO, C., MUZASHVILI, T., SKHIRTADZE, A., KEMERTELIDZE, E., PIZZA, C., and PIACENTE, S., 2008. Steroidal glycosides from the underground parts of *Helleborus caucasicus*. Phytochemistry, 69(5): 1227-1233.
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J. C., and TURCK, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol, 45: 493-496.
- BENOIT, S. C., KEMP, C. J., ELIAS, C. F., ABPLANALP, W., HERMAN, J. P., MIGRENNE, S., LEFEVRE, A. L., CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C., MAGNAN, C., YU, F., NISWENDER, K., IRANI, B. G., HOLLAND, W. L., and CLEGG, D. J., 2009. "Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents". Journal of Clinical Investigation, 119(9): 2577-2587.
- BRACA A., PRIETO, J. M., DE TOMMASI, N., TOME, F., and MORELLI, I., 2004. Furostanol saponins and quercetin glycosides from the leaves of *Helleborus viridis* L. Phytochemistry, 65(21): 2921-2928.
- BRINK, D. M., and WANDERS, R. J. A., 2006. "Phytanic acid: Production from phytol, its breakdown and role in human disease". Cellular and Molecular Life Sciences, 63(15): 1752-1765.
- BROUWER, I. A., KATAN, M. B., and ZOCK, P. L., 2004. "Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis". *The Journal of nutrition*, 134(4): 919-22.
- BROWN, P. J., and KOMEN, J. C., 1993. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease. Journal of Human Nutrition and Dietetics, 6: 295-305.

- BURR, G. O., BURR, M. M., and MILLER, E., 1930. "On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition". J. Biol. Chem, 86(587): 1–9.
- CAKAR, J., PARIC, A., VIDIC, D., HAVERIC, A., HAVERIC, S., MAKSIMOVIC, M., and BAJROVIC, K., 2011. Antioxidant and antiproliferative activities of *Helleborus odoratus* Waldst. & Kit, *H. multifidus* Vis. and *H. hercegovinus* Martinis. Natural Product Research, 25(20): 1969-1974.
- CHRISTNER, B. C., MORRIS, C. E., FOREMAN, C. M., CAI, R., and SANDS, D. C., 2008. "Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall", 319 (5867): 1214.
- CUNNANE, S., and ANDERSON, M., 1997. "Pure linoleate deficiency in the rat: influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturates, and (1-14C) linoleate oxidation". J Lipid Res, 38(4): 805–812.
- DAINES, A. M., 2003. The synthesis of naturally occurring Vitamin K and Vitamin K analogues. Current Organic Chemistry, 7: 1625-1634.
- DARMSTADT, G. L., MAO-QIANG, M., CHI, E., SAHA, S. K., ZIBOH, V. A., BLACK, R. E., SANTOSHAM, M., and ELIAS, P. M., 2002. "Impact of topical oils on the skin barrier: possible implications for neonatal health in developing countries". Acta Paediatrica, 91(5): 546–554.
- DAVIS P. H., and CULLEN J., 1965. *Helleborus*, In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Volume 1, Edinburgh.
- DIEZEL, W. E., SCHULZ, E., SKANKS, M., and HEISE, H., 1993. "Plant oils: Topical application and anti-inflammatory effects (croton oil test)". Dermatologische Monatsschrift, 179: 173.
- Earth News: Ancient smell of death. Revealed (Accessed on 11.10.2014)
http://news.bbc.co.uk/earth/hi/earth_news/newsid_8232000/8232607.stm
- ERDEMOĞLU, N., KUPELİ, E., ve YESİLADA, E., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. Journal Of Ethnopharmacology, 89(1): 123-129.
- ESECELİ, H. DEĞİRMENCİOĞLU, A., ve KAHRAMAN, R., 2006. Omega Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. Türkiye 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu.
- FARRELL, D.J., 1992. The hearty egg. Poultry Digest, 7: 20-22.

- FREDRICKSON, J. K., ZACHARA, J. M., BALKWILL, D. L., KENNEDY, D., LI, S. M., KOSTANDARITHES, H. M., DALY, M. J., ROMINE, M. F., and BROCKMAN, F. J., 2004. "Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state". *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (7): 4230–41.
- GRAM, H. C., 1884. "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten". *Fortschr. Med*, 2: 185–189.
- GUNSTONE, F. D., JOHN L., HARWOOD, and ALBERT, J., 2007. *Dijkstra. The Lipid Handbook*, 3rd ed. Boca Raton: CRC Press.
- HOGAN, C. M., 2010. *Bacteria*. *Encyclopedia of Earth*. eds. Sidney Draggan and C.J.Cleveland, National Council for Science and the Environment, Washington DC.
- HORSTINANN, B., ZINSER, E., TURZA, N., KEREK, F., and STEINKASSERER, A., 2007. MCS-18, a novel natural product isolated from *Helleborus purpurascens*, inhibits dendritic cell activation and prevents autoimmunity as shown in vivo using the EAE model. *Immunobiology*, 212(9-10): 839-853.
- HUGENHOLTZ, P., 2002. "Exploring prokaryotic diversity in the genomic era". *Genome Biology*, 3(2): 1–8
- JENSEN, R. G., HAGERTY, M. M., and MCMAHON, K. E., 1978. "Lipids of human milk and infant formulas: a review". *Am J Clin Nutr*, 31(6): 990-1016.
- JESSE, P., MOTTKE, G., EBERLE, J., SEIFERT, G., HENZE, G., and PROKOP, A., 2009. Apoptosis-inducing Activity of *Helleborus niger* in ALL and AML. *Pediatric Blood & Cancer*, 52(4): 464-469.
- KORALEK, D. O., PETERS, U., and ANDRIOLE, G., 2006. "A prospective study of dietary α -linolenic acid and the risk of prostate cancer (United States)". *Cancer Causes & Control*, 17 (6): 783–791.
- KINGSBURY, K. J., PAUL, S., CROSSLEY, A., and MORGAN, D. M., 1961. "The fatty acid composition of human depot fat". *Biochemical Journal*, 78: 541–550.

- LETAWE, C., BOONE, M., and PIERARD, G. E., 1998. "Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones". *Clinical & Experimental Dermatology*, 23(2): 56–58.
- LEWIS N.M., SEBURG, S., and FLANAGEN, N.L., 2000. Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poult*, 79: 971-974.
- LEAF, A., and WEBER, P.C., 1988. Cardiovascular effects of ω -3 fatty acids. *The New Engl. J. Of Med.*, 318: 549-557.
- LINDHOLM, P., GULLBO, J., CLAESON, P., GORANSSON, U., JOHANSSON, S., BACKLUND, A., LARSSON, R., and BOHLIN, L., 2002. Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts. *Journal of Biomolecular Screening*, 7(4): 333-340.
- MATUR, E., OZCAN, M., RAKLI, Z. T. C., and KUCUKYALCI, E., 2003a. Bioactivity examination of *helleborus orientalis* plant in rats - 1. Effects on some physiological parameters. *Indian Veterinary Journal*, 80(12): 1239-1244.
- MATUR, E., CIRAKH, Z. T., OZCAN, M., and KADIKOYLU, C., 2004b. Bioactivity examination of *Helleborus orientalis* plant in rats. Effects on some serum parameters. *Indian Veterinary Journal*, 81(4): 387-391.
- MENG, Y. H., WHITING, P., SIK, V., REES, H. H., and DINAN, L., 2001. Ecdysteroids and bufadienolides from *Helleborus torquatus* (Ranunculaceae). *Phytochemistry*, 57(3): 401-407.
- MCGINTY, D., 2010. Fragrance material review on phytol. *Food and Chemical Toxicology* 48: 59-63.
- MILBRADT, A. G., KEREK, F., MORODER, L., and RENNER, C., 2003. Structural characterization of hellethionins from *Helleborus purpurascens*. *Biochemistry*, 42(8): 2404-2411.
- MIMAKI, Y., WATANABE, K., SAKUMA, C., SAKAGAMI, H., and SASHIDA, Y., 2003. Novel polyoxygenated spirostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*. *Helvetica Chimica Acta*, 86(2): 398-407.
- MIMAKI, Y., MATSUO, Y., WATANABE, K., and SAKAGAMI, H., 2010. Furostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*. *Journal of Natural Medicine*, 64(4): 452-459.
- MOHANTY, A., 2010. Physicochemical and Antimicrobial Study of polyherbal *Pharmacieglobal*, 4(04): 1-3.

- MOLDOVAN, L., GASPAR, A., TOMA, L., CRACIUNESCU, O., and SAVIUC, C., 2011. Comparison of Polyphenolic Content and Antioxidant Capacity of Five Romanian Traditional Medicinal Plants. *Revista De Chimie*, 62(3): 299-303.
- MUZASHVILI, T. S., BENIDZE, M. M., SKHIRTLADZE, A. V., and SULAKVELIDZE, T. P., 2006. Steroidal sapogenins from subterranean organs of *Helleborus caucasicus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(5): 613-613.
- MUZASHVILI, T. S., and KEMERTELIDZE, E. P., 2009. Steroidal Compounds From *Helleborus caucasicus* Leaves. *Chemistry of Natural Compounds* 45(6): 925-926.
- NEASCU, C., CIOBANU, C., BARBU, I., TOADER, O., SZEGLI, G., KEREK, F., and BABES, A., 2010. Substance MCS-18 Isolated from *Helleborus Purpurascens* Is a Potent Antagonist of the Capsaicin Receptor, TRPV1, in Rat Cultured Sensory Neurons. *Physiological Research*, 59(2): 289-298.
- NETSCHER, T., 2007. Synthesis of Vitamin E. *Vitamins & Hormones*, 76: 155-202.
- OWOLABI, J. O., OMOGBAI, E. K. I., and OBASUYI, O., 2007. Antifungal and antibacterial activities of the ethanolic and aqueous extract of *Kigelia africana* (Bignoniaceae) stem bark. *Afr J Biotechnol*, 6(14): 882-885.
- PAQUAT, C., and HAUTFENNE A., 1992. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Blackwell Scientific Publications, London.
- PENCIK, A., ROLCIK, J., NOVAK, O., MAGNUS, V., BARTAK, P., BUCHTIK, R., SALOPEK-SONDI, B., and STRNAD, M., 2009. Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta*, 80(2): 651-655.
- PIGG, K. B., and DEVORE, M. L., 2005. *Paleoactaea* gen. nov. (Ranunculaceae) fruits from the Paleogene of North Dakota and the London Clay. *American Journal of Botany*, 92(10): 1650–1659.
- PRIETO, J. M., SICILIANO, T., and BRACA, A., 2006. A new acylated quercetin glycoside and other secondary metabolites from *Helleborus foetidus*. *Fitoterapia*, 77(3): 203-207.
- PUGLISI, S., SPECIALE, A., ACQUAVIVA, R., FERLITO, G., RAGUSA, S., DE PASQUALE, R., and IAUK, L., 2009. Antibacterial activity of *Helleborus bocconeii* Ten. subsp *siculus* root extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1): 175-177.

- RAMON, J. M., BOU, R., ROMEA, S., ALKIZA, M. E., JACAS, M., RIBES, J., and OROMI, J., 2000. "Dietary fat intake and prostate cancer risk: a case-control study in Spain". *Cancer causes & control* : CCC 11(8): 679–85.
- REINER, M. F., STIVALA, S., CAMICI, G. G., and BEER, J. H., 2014. "[The effects of Omega-3 fatty acids in clinical medicine]". *Praxis (Bern 1994)* 103(6): 329–35.
- ROMAN, G. P., NEAGU, E., and RADU, G. L., 2010. Membrane Processes for the Purification and Concentration of *Helleborus purpurascens* Extracts and Evaluation of Antioxidant Activity. *Revista De Chimie*, 61(9): 877-881.
- RONTANI, J. F., and VOLKMAN, J. K., 2003. Organic Geochemistry. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments, 34: 1-35.
- ROSSELLI, S., MAGGIO, A., FORMISANO, C., NAPOLITANO, F., SENATORE, F., SPADARO, V., and BRUNO, M., 2007. Chemical composition and antibacterial activity of extracts of *Helleborus bocconeii* Ten. *subsp intermedius*. *Natural Product Communications*, 2(6): 675-679.
- ROSSELLI, S., MAGGIO, A., BRUNO, M., SPADARO, V., FORMISANO, C., IRACE, C., MAFFETTONE, C., and MASCOLO, N., 2009. Furostanol Saponins and Ecdysones with Cytotoxic Activity from *Helleborus bocconeii* *ssp intermedius*. *Phytotherapy Research*, 23(9): 1243-1249.
- RUTHIG, D. J., and MECKLING-GILL, K. A., 1999. "Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6". *Journal of Nutrition*, 129(10): 1791–1798.
- SEIFARTH, C., LITTMANN, L., RESHEQ, Y., ROSSNER, S., GOLDWICH, A., PANGRATZ, N., KEREK, F., STEINKASSERER, A., and ZINSER, E., 2011. MCS-18, a novel natural plant product prevents autoimmune diabetes. *Immunology Letters*, 139(1-2): 58-67.
- SIMON, J. A., CHEN, Y. H., and BENT, S., 2009. "The relation of alpha-linolenic acid to the risk of prostate cancer". *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5): 1558–1564.
- STOCHMAL, A., PERRONE, A., PIACENTE, S., and OLEZSEK, W., 2010. Saponins in aerial parts of *Helleborus viridis* L. *Phytochemistry Letters*, 3(3): 129-132.
- TANKER, N., ve BİNGÖL, F., 1984. "Türkiye'de Yetişen *Helleborus* L. Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar".

- TARKOWSKI, P., TARKOWSKA, D., NOVAK, O., MIHALJEVIC, S., MAGNUS, V., STRNAD, M., and SALOPEK-SONDI, B., 2006. Cytokinins in the perianth, carpels, and developing fruit of *Helleborus niger* L. Journal of Experimental Botany, 57(10): 2237-2247.
- TUFFS, A., 2002. Three out of four Germans have used complementary or natural remedies. Br Med J, 325(7371): 990.
- VALENTINE, R. C., and VALENTINE, D. L., 2004. Omega-3 fatty acids in cellular membranes: a unified concept.. Progress in Lipid Research, 43: 383-402.
- VENCI, F. V., and MORTON, T. C., 1998. The shield defense of the sumac flea beetle, *Blepharida rhois* (Chrysomelidae: Alticinae). Chemoecology, 8: 25-32.
- VITALINI, S., BRACA, A., and FICO, G., 2011. Study on secondary metabolite content of *Helleborus niger* L. Leaves. Fitoterapia, 82(2): 152-154.
- VONDERBANK, H., 1949. Ergebnisse der Chemotherapie der Tuberculose. Pharmazie, 4: 198-207.
- YANG, F. Y., SU, Y. F., WANG, Y., CHAI, X., HAN, X., WU, Z. H., and GAO, X. M., 2010. Bufadienolides and phytoecdystones from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* (Ranunculaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 38(4): 759-763.
- YANG, F. Y., SU, Y. F., ZHANG, X. A., TU, G. Z., GAO, X. M., and ZHANG, B. L., 2010a. New Spirostanol Sulfonate from the Rhizomes of *Helleborus thibetanus*(Ranunculaceae). Chemical Research in Chinese Universities, 26(5): 746-748.
- YANG, J. A., ZHANG, Y. H., MIAO, F., ZHOU, L., and SUN, W., 2010b. Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* Franch. Fitoterapia, 81(6): 636-639.
- WANDERS, R. J., and KOMEN, J.C., 2007. Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid. Biochem Soc Trans, 35: 865-869.
- WATANABE, K., MIMAKI, Y., SAKUMA, C., and SASHIDA, Y., 2002a. A novel polyoxygenated spirostanol trisdesmoside from the rhizomes of *Helleborus orientalis*. Chemistry Letters, 8: 772-773.
- WATANABE, K., SAKAGAMI, H., MIMAKI, Y., and SASHIDA Y., 2003b. Bufadienolide and spirostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*. Journal of Natural Products, 66(2): 236-241.

- WATANABE, K., SAKAGAMI, H., and MIMAKI, Y., 2005. Four new steroidal saponins from the rhizomes of *Helleborus orientalis*. *Heterocycles*, 65(4): 775-785.
- WATKINS, B. A., 1991. Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. *Journal of Nutrition*, 121: 1475-1485.
- WIERZBICKI, A. S., 2007. "Peroxisomal disorders affecting phytanic acid α -oxidation: A review". *Biochemical Society Transactions*, 35(5): 881–886.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Tarık KARABULUT
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Elazığ – 02.02.1982
Telefon : 0 539 689 23 23
e-mail : karabulut_281697@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Mehmet Akif Ersoy Lisesi, Merkez, Elazığ	1999
Üniversite	: Fırat Üniv. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2003
Yüksek Lisans	: Fırat Üniv. Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği (Pedagojik Formasyon)	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2004-2005	Elazığ Ziraat Odası Bşk.	Genel Sekreter Vekili
2005	Elazığ Mega Master Temizlik Ürünleri	Kimyager
2006....	İç İşleri Bakanlığı	Polis Memuru

İLGİ ALANLARI

Futbol, Sinema, Seyahat, Müzik