

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra DOĞAN AYTAÇ

**DEVE ÇÖKERTEN (*Tribulus terrestris* L.) BİTKİSİ
BİLEŞENLERİNİN FARKLI EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

KİMYA ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DEVE ÇÖKERTEN (*Tribulus terrestris* L.) BİTKİSİ
BİLEŞENLERİNİN FARKLI EKSTARKSİYON
YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI**

Kübra DOĞAN AYTAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 10/07/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr.Ramazan BİLGİN Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL Prof.Dr.M.Kemal SANGÜN
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Kimya Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEVE ÇÖKERTEN (*Tribulus terrestris* L.) BİTKİSİ BİLEŞENLERİNİN FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE ARAŞTIRILMASI

Kübra DOĞAN AYTAÇ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. . Ramazan BİLGİN
Yıl : 2019, Sayfa: 78
Juri : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
: Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL
: Prof.Dr. M.Kemal SANGÜN

Bu çalışmada sistematik adı *Tribulus terrestris* L. olan bitkinin kimyasal kompozisyonunun tespitinde Sub-kritik su ekstraksiyonu (sbkH₂O) ve Sub-kritik etanol ekstraksiyonu (sbkEtOH) yöntemlerinin etkileri incelenmiş ve yöntemler kıyaslanmıştır. Ayrıca Ultrasonik (USE) destekli *tert*-butil metil eter ekstraksiyonu ve *tert*-butil metil eter ile maserasyonun etkileri incelenmiş ve kıyaslanmıştır. Bunun yanında *Tribulus terrestris* L.'in sbkH₂O ile ekstraktının biyolojik aktivite tayini ve *Tribulus terrestris* L. ekstraktında Kjeldahl Yöntemi ile toplam azot (protein) tayini yapılmıştır. SbkH₂O ekstraktında ana bileşenlerden biri olan Loliolide % 1,86, Loliolide türevi ise % 10,75 oranında tespit edilmiştir. USE'a göre ekstraktın ana bileşenlerinde % 50,30 oranında Oleamide ve % 1,49 oranında Loliolide türevi tespit edilmiştir. Maserasyonda ekstraktın ana bileşeninde % 6,62 oranında Oleamide ve % 0,20 oranında Loliolide türevi tespit edilmiştir. *Tribulus terrestris* L. ekstraktı ile yapılan biyolojik aktivite tayinine göre *Candida albicans* türü maya üzerinde yapılan antifungal çalışmada sonuç pozitif bulunmuştur. 22 mm zone çapı oluşmuştur. Kjeldahl Yöntemi ile yapılan toplam azot (protein) tayinine göre ise bitkide %14,47±1,73 oranında protein tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Tribulus terrestris* L., sbkH₂O, sbkEtOH, USE, Maserasyon, Biyolojik Aktivite, Kjeldahl Yöntemi.

ABSTRACT

MSc-THESIS

INVESTIGATION OF THE COMPONENTS OF DEVE ÇÖKERTEN (*Tribulus terrestris* L.) BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS

Kübra DOĞAN AYTAÇ

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. . Ramazan BİLGİN

Year : 2019, Page: 78

Jury : Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

: Prof. Dr. S.Seyhan TÜKEL

: Prof.Dr. M.Kemal SANGÜN

In this study, the effects of Sub-critical water extraction (sbcH₂O) and Sub-critical Ethanol extraction (sbcEtOH) methods were investigated. These methods were compared in order to determine the chemical composition of the plant which has systematic name is *Tribulus terrestris* L.. In addition, the effects of (USE) Ultrasonic Asisted tert-butylmetyl ether extraction and maceration with tert-butylmetyl ether were investigated. These methods were compared. Besides, the biological activity determination of the extract of *Tribulus terrestris* L. with sbcH₂O and the total nitrogen (protein) determination by Kjeldahl Method in *Tribulus terrestris* L. extract were investigated. Overall in this study in sbcH₂O extraction 1.86 % Loliolide and 10.75 % Loliolide's derivative were observed. In the USE, 1.49 % of Loliolide and 50.30 % of Oleamide were determined. İn total, 0,20 % of Loliolide and 6,62 % of Oleamide were determined in maceration. According to the biological activity determination of *Tribulus terrestris* L. extract, the antifungal study on *Candida albicans* yeast was positive. A zone with a diameter of 22 mm has been formed. According to the total nitrogen (protein) determination by Kjeldahl Method, 14.47 ± 1.73 % protein was identified in the plant.

Key words: *Tribulus terrestris* L., Sub-critic H₂O, Sub-critic EtOH, USE, Maceration, Biological Activity, Kjeldahl Method

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan ilaçların bir çoğunun ham maddesi bitki kökenlidir. Tıbbi bitkiler; modern ilaçlar, geleneksel ilaçlar, nutrosotikler, gıda katkıları, sentetik ilaçların kimyasal birimleri ve farmakolojik ara ürünler için zengin biyolojik kaynaklardır.

Bu çalışmada Zygophyllaceae familyasından *Tribulus terrestris* L. bitkisinin kimyasal içeriği ve içeriğindeki bazı önemli moleküller incelenmiştir. *Tribulus terrestris* L. bitkisinin seçilmesinin nedeni bitki ekstraktının hipertansiyon hastalığı, koroner kalp rahatsızlıkları, gözde oluşan iltihapların tedavisinde kullanılması, böbrek taşı düşürücü ve idrar söktürücü olarak kullanılması bunun yanısıra kuvvet verici ve her iki cinsiyet için kısırlık tedavisinde kullanılmasıdır.

Bitki içeriği incelendiğinde içinde sistematik adı 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one olan yaygın adıyla Loliolide olarak adlandırılan özel bir molekül tespit edilmiştir. Bu molekülün özel olmasının nedeni aslında ilaçlarda uzun süredir kullanılan bir etken madde olmasıdır. En bilinen özellikleri damar açıcı ve anti-inflamatuar etkisi, cinsel aktiviteyi artırıcı ve kısırlığı tedavi edici etkileri olmasıdır.

Yine bitkide oldukça önemli bir miktarda bulunan sistematik adıyla 9-oktadecenamid yaygın adıyla Oleamide tespit edilmiştir. Bu tespit *tert*-butil metil eter ile yapılan USE ve maserasyon yöntemleriyle yapılmıştır.

Literatüre göre (Z) -9-Octadecenamid veya Oleamide'nin, skopolamin kaynaklı hafıza kaybına karşı koruyucu bir ajan olduğu tespit edilmiştir ve Alzheimer'in in vitro test edilen hastalığına karşı yeterli miktarda fare ile yapılan çalışmada yararlı bir kemopreventif ajan olduğu görülmüştür. Bu durum bu molekülü insanlar için önemli bir hale getirmektedir.

Bu araştırma için bitki Sub-kritik H₂O ve Sub-kritik EtOH ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Ayrıca *tert*-butil metil eter ile USE ve *tert*-butil metil eter ile maserasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra da Sub-kritik H₂O ile ekstraktının

biyolojik aktivitesi incelenmiştir. Bunun yanında bitkinin Kjeldahl Yöntemi ile toplam azot (protein) tayini yapılmıştır.

Bu ekstaksiyonlara göre sub-kritik H₂O ekstraksiyonunda 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one (Loliolide) % 1,86 oranında, benzer bir bileşik olan 2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(R) ise % 10,75 oranında tespit edilmiştir. Sub-kritik EtOH ekstraksiyonuna göre ekstraktta bu moleküller gözlenmemiş ve ana bileşen olarak % 44,43 oranında Dodecanal ile % 39.30 oranında 2-Myristynoyl pantetheine bileşikleri gözlenmiştir.

Ayrıca ultrasonik (USE) destekli *tert*-butil metil eter ekstraksiyonu ve *tert*-butil metil eter içerisinde maserasyonun etkileri incelenmiş ve kıyaslanmıştır. Bu kıyaslamaya göre USE ile hazırlanan ekstraktta % 50,30 oranında, maserasyon ile hazırlanan ekstarktta % 6,62 oranında 9-oktadecenamide (Oleamide) tespit edilmiştir.

Ayrıca *Tribulus terrestris L.* in sulu ekstraktı ile yapılan biyolojik aktivite tayinine göre, insan vücudunda yaşayabilen, bir çeşit maya türü olan *Candida albicans* üzerinde yapılan antifungal çalışmada sonuç pozitif bulunmuştur. 22 mm *zone* çapı oluşmuştur. *Aspergillus* cinsi küf ve *Penicillium* cinsi küf ile yapılan antifungal çalışmada sonuç negatif olmuştur.

Son olarak Kjeldahl Yöntemi ile yapılan azot (protein) tayinine göre ise bitkide % $14,47 \pm 1,73$ oranında protein tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen, görüş ve bilgisiyle yolumu aydınlatan değerli danışmanım Prof.Dr.Ramazan BİLGİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Kıymetli bilgileriyle ve yardımlarıyla bana destek olan değerli hocalarım Prof.Dr.E.Sultan GİRAY, Prof.Dr.S.Seyhan TÜKEL, Prof.Dr.Güzide YÜCEBİLGİÇ, Prof.Dr.Sadık DİNÇER, Prof.Dr.Halil ÇAKAN ve Öğr.Gör.Dr.Murat TÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte manevi destekleri ve görüşleri ile yanımda olan değerli hocalarım Doç.Dr.Deniz YILDIRIM ve Doç.Dr.Dilek ALAGÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Öğr.Gör.Dr.Bahar MERYEMOĞLU, Arş.Gör.Ali TOPRAK, Arş.Gör.Fatma Masume USLU, Öğr.Gör.Serkan KARACA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimimi tamamlamam için bana izin veren Adana Çalışma ve İş Kurumu İl Müdürü sayın Ahmet KARAVELİ'ye teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni hep cesaretlendiren en büyük destekçilerim annem Nimet DOĞAN, babam Fikret DOĞAN, kardeşim Büşra DOĞAN ve sevgili eşim Cüneyt AYTAÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisansım boyunca manevi desteğini esirgemeyen kayınvalidem Melek AYTAÇ ve kayınpederim Ali Serdar AYTAÇ'a teşekkür ederim.

Bu süreçte gülümsemeleriyle bütün zorlukları unutturan kıymetli oğullarım Arslan Ali AYTAÇ ve Aybars AYTAÇ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER ve KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Tribulus terrestris</i> L.	3
1.2. Loliolide	5
1.3. Uçucu Yağlar	7
1.4. Terpenoid Yapısında Olmayan Hidrokarbonlar	9
1.5. Terpenler	9
1.5.1. Monoterpenler (C10).....	11
1.5.1.1. Asiklik Mono Terpenler	11
1.5.1.2. Siklik Monoterpenler	12
1.5.1.2.(1). Monosiklik Monoterpenler	12
1.5.1.2.(2). Bisiklik Monoterpenler	13
1.5.1.2.(3). Trisiklik Monoterpenler.....	14
1.5.2. Seskiterpen (C15).....	15
1.5.3. Diterpenler (C20) ve Triterpenler (C30)	16
1.5.4. Aromatik Özelliklerine Göre Terpenler	16
1.5.5. Farmakolojik Etkilerine Göre Terpenler	17
1.6. Tıbbi Bitkiler İçin Genel Ekstraksiyon Metodları	17
1.7. Tıbbi Bitkilerin Ekstraksiyonunda Uygulanan Yeni Yöntemlerden Bazıları	18

1.7.1. Ultrasonik Ekstraksiyon.....	18
1.7.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	20
1.7.2.1. Süperkritik Akışkanlar	20
1.7.2.2. Süperkritik Akışkanın Seçimi	24
1.7.3. Sub-kritik Su Ekstraksiyonu (sbkH ₂ O).....	25
1.7.4. Sub-kritik Etanol (sbkEtOHE) Ekstraksiyonu	27
1.7.5. Maserasyon (Islama)	27
1.8. Kjeldahl Yöntemi ile Toplam Azot (Protein) Tayini	28
1.9. Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	28
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	31
3. MATERYAL-METOD.....	41
3.1. Materyal	41
3.1.1. Kimyasallar	41
3.2. Metod	41
3.2.1. Sub-kritik Su Ekstraksiyonu (sbkH ₂ O) Yöntemiyle Deve Çökerten Bitki Ekstraktının Hazırlanması.....	41
3.2.2. Sub-kritik Etanol Ekstraksiyonu (sbkEtOHE) Yöntemiyle Deve Çökerten Bitki Ekstraktının Hazırlanması.....	42
3.2.3. Ultrasonik Destekli Deve Çökerten Bitki Ekstraksiyonu(USE)	43
3.2.4. Maserasyon (Islama) Yöntemi ile Ekstraksiyon	43
3.2.5. Kjeldahl Yöntemi ile Toplam Azot (Protein) Tayini	43
3.2.6. Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	45
3.2.7. GC-MS	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	49
4.1. Bitkinin Ekstraksiyon Yüzdeleri Ve Kimyasal Kompozisyonları Bulguları.....	49
4.2.Kjeldahl Yöntemi ile Protein Tayini Bulguları.....	56

4.3. Bitkide (<i>Tribulus terrestris</i> L.) Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini Bulguları.....	56
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	57
5.1. Ekstraksiyon Yöntemleri Sonuçları ve Önerileri	57
5.2. Bitkide (<i>Tribulus terrestris</i> L.) Protein Araştırması Sonuçları ve Önerileri	60
5.3. Bitkide (<i>Tribulus terrestris</i> L.) Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini Sonuçları ve Önerileri	60
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	73
EKLER.....	74



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Terpenlerin Genel Yapıları.....	10
Çizelge 1.2. Süperkritik akışkanların fiziksel özellikleri.....	25
Çizelge 3.1. Sub ve süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon için çalışma koşulları ..	52
Çizelge 4.1. (<i>Tribulus terrestris</i> L.) Deve Çökerten Ekstraksiyon metodlarına göre kimyasal kompozisyonu.....	52





ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Deve çökerten (<i>Tribulus terrestris</i> L.).....	4
Şekil 1.2.	6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)- one (Loliolide)	6
Şekil 1.3.	Isoprene	10
Şekil 1.4.	Asiklik Monoterpenler	11
Şekil 1.5.	Asiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri.....	12
Şekil 1.6.	Monosiklik Monoterpenler.....	13
Şekil 1.7.	Monosiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri	13
Şekil 1.8.	Bisiklik Monoterpenler.....	14
Şekil 1.9.	Bisiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri	14
Şekil 1.10.	Seskiterpenler	15
Şekil 1.11.	Seskiterpenlerin Oksijenli Türevleri.....	16
Şekil 1.12.	Uçucu Yağlardaki Çeşitli Aromatik Bileşikler.....	17
Şekil 1.13.	Ses dalgası tipleri.....	18
Şekil 1.14.	İndirek (a) ve direk (b) ultrason uygulamalarının şematik gösterimi.....	19
Şekil 1.15:	CO ₂ için yoğunluk/basınç diyagramı.....	22
Şekil 3.1.	Sub ve süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemi (a: ISCO pompa; b: HPLC pompası; c: Fırın; d: Ekstraksiyon hücresi).....	42
Şekil 3.2.	Kjeldahl Metodu Azot Tayini Cihazı (Nötralizasyon ve Destilasyon Aşaması)	45
Şekil 3.3.	<i>Candida albicans</i> ' a, <i>Tribulus terrestris</i> L. ' in sulu ekstraktının uygulaması.....	46
Şekil 4.1.	9-Octadecenamide,(Z) C ₁₅ H ₃₅ NO.....	54
Şekil 4.2.	6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one (Loliolide).....	55



SİMGELER ve KISALTMALAR

USE	: Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu
sbkH ₂ O	: Sub-kritik Su Ekstraksiyonu
sbkEtOH	: Sub-kritik Etil Alkol Ekstraksiyonu
EtOH	: Etil alkol
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
H ₂ O	: Su
NH ₃	: Amonyak
H ₃ BO ₃	: Borik Asit
NaCl	: Sodyum Klorür
Na ₂ SO ₄	: Sodyum Sülfat
CH ₂ Cl ₂	: Dikloro Metan
rpm	: 1 dakikada gerçekleşen dönüş/ devir sayısı
P	: Basınç
T	: Sıcaklık
atm	: atmosfer
°C	: Santigrat
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
g	: Gram
w/w	: ağırlık/ağırlık
v/v	: hacim/hacim
s	: çözünürlük
ρ	: yoğunluk
ε	: dielektrik sabiti

W	: Güç
kHz	: kilo Hertz
MHz	: Mega Hertz
PDA	: Potato Dextros Agar
CFU/ ml	: Koloni Oluřturma Birimi/ ml



1. GİRİŞ

Bitkiler yaşamın var oluşundan bu yana canlılar için başlıca vazgeçilmez hayat kaynağı olmuştur. İlk çağlardan itibaren insanlar farklı amaçlar için bitkileri kullanmış, incelemiş ve tanıtmak için çabalamışlardır. İnsanların besinleri genelde hayvansal ve bitkisel içeriklidir. Bitkiler besin maddesi olarak kullanılmalarının yanında tat ve koku verici olarak da kullanılmışlardır.

İnsanların bitkileri tedavi edici olarak kullanmaları ise milattan önceki yıllara dayanmaktadır. Mısır papirüslerinde çok sayıda bitkisel kaynaklı ilaç formülü ile karşılaşmıştır. Örneğin etkili bir ağrı kesici olan morfin haşhaş bitkisinden, geçmişten bu yana idrar söktürücü olarak bilinen fakat asıl etkisi kalp kası üzerine olan digitoksin, digitalis bitkisinden elde edilmiştir. Parasempatik sistemi bloke eden antropin, *Atropa belladonna*' da bulunan bir alkaloiddir. Sıtma tedavisinde kullanılan kinin, kına ağacı kabuklarından, romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılan salisilik asit, söğüt ağacı kabuklarından elde edilmiştir. Bilim insanları uzunca bir süredir bitkilerden elde edilen ana moleküller üzerinde çalışarak aktif gruplara benzer yeni kimyasal maddelerin analoglarını elde etmiştir. Bu gelişme sayesinde etkileri daha fazla yan etkileri daha az bir çok sentetik ilaç yapılmıştır (Mutlu, 2002).

Bazı ilaçların laboratuvarında sentezinin pahalı olması nedeniyle insanlar halihazırda bitkilerden elde etmeyi tercih etmektedirler. Örneğin bunlardan biri morfindir. Günümüzde kullanılan ilaçların bir kısmı bitkisel kaynaklıdır veya bitkisel kaynaklı bileşiklerin sentezlenmiş çeşitleridir. Sentetik yollarla yapılan ilaçların istenmeyen yan etkileri bulunması, insanları tekrar bitkisel kaynakları ilaç olarak kullanmaya yönlendirmiştir. Bunun yanında Türkiye'deki doğal bitki türlerinin önemli bir miktarının kimyasal içerikleri henüz bilinmemektedir. Yer yüzünde 250.000 civarı çiçekli bitkinin etken maddesi açısından oldukça az miktarının araştırılmış olduğunu düşünürsek bitkiler aleminde keşfedilecek oldukça fazla gizem olduğu söylenebilir (Cellat, 2011).

Uçucu yağ, bitkilerin kök, meyve, yaprak ve kabuk bölümlerinden elde edilen, oda sıcaklığında sıvı olan, genelde renksiz ya da açık sarı renkli, kuvvetli kokulu, kolay kristalleşebilen ve uçucu bir maddedir. Su ile karışmazlar ve yağ olarak tanımlansalar dahi sabit yağlardan farklıdır (Ceylan, 1997). Bitkilerin kendilerine has kokuları, içindeki uçucu yağlardan kaynaklanmaktadır. Açıkta bırakılırlarsa oda sıcaklığında dahi buharlaşabilirler. Uçucu yağlar; küçük bir kısmı hariç hoş kokuludur, hoş kokusundan dolayı eterik yağ veya esans da denir.

Uçucu yağların geneli hidrokarbonlar, terpenler, esterler, laktonlar, aldehytler, fenoller, asitler, alkoller ve ketonlardan oluşur. Bunlardan oksijenli bileşenler (alkol, aldehyt, ester, keton, fenol, lakton) ana koku kaynağıdır. Bu bileşenler oksitlenme ve reçineleşme etkilerine karşı diğer bileşenlere göre daha kararlıdır. Diğer yandan seskiterpenler ve monoterpenler gibi doymamış bileşenler hava ve ışık ortamında oksitlenme ve reçineleşme eğilimindedirler (Türk, 2010).

Uçucu yağlar farmakoloji, gıda ve parfüm sektöründe koku ve tatları için kullanılan önemli doğal ürünlerdir. Son yıllarda uçucu yağlar ve bileşenlerinin biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri artan yönde ivme kazanmıştır.

Aromatik bitkiler; tat, koku, kozmetikler ve terpenlerin kaynağıdır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, gelişmiş ülkelerdeki gibi gelişmekte olan ülkelerde de basit yöntemlerden en ileri yöntemlere kadar çeşitli tekniklerle ekstrakte edilerek değerli biyo kaynaklara dönüştürülebilmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin endüstriyel açıdan incelenmesi çeşitli teknikler kullanılarak aktif bileşenlerinin ekstrakte edilmesiyle başlar. Bu amaç için kullanılan yaygın yöntemler maserasyon (ıslatma), sızdırma, demleme, Soxhlet ekstraksiyonu, parçalama, organik çözücülerle ekstrasyon, mikrodalga ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve hidroflorokarbon çözücülerle ekstraksiyondur (Türk, 2010).

Son yıllarda gelişen süperkritik akışkan ekstraksiyonu alternatif bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak en yaygın kullanılan çözücü CO₂' dir. Sub-kritik su ise son yıllarda çözücü olarak

araştırmacılar tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Sub-kritik su ekstraksiyonu 100-374°C arasında ve sıvı fazın oluşmasını sağlayacak basınçta suyun ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı bir metoddur. Bu şartlardaki su bir çok organik molekül için iyi bir çözücü özelliğine sahip olmasından dolayı bitki ekstraksiyonu için klasik ve süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yöntemlerine göre alternatif bir yöntem olarak gelecek vaat etmektedir ve son yıllarda araştırmacılar tarafından artan bir ilgiyle kullanılmaktadır. Bunun yanında etanol toksik bir çözücü olmaması, suya nazaran düşük kritik sıcaklığa sahip olması, polaritesinin CO₂' de göre yüksek olması ve daha az korozyif özellik göstermesinden dolayı bitki ekstraksiyonunda önemli bir alternatiftir (Türk, 2010).

Süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon hem düşük çalışma sıcaklığına hem de diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre yüksek hıza sahip olmasından dolayı bitkilerin ısıl olarak dayanıksız bileşenlerinin ekstrakte edilebilmesine olanak sağlamakta ve bilim insanlarınca çok tercih edilmelerine neden olmaktadır.

Bu çalışmada tıbbi özelliklere sahip Deve Çökerten (*Tribulus terrestris L.*) bitkisinin kimyasal kompozisyonları üzerine özellikle de Loliloide ve Oleamide bileşiklerinin izolasyonunda sub-kritik ekstraksiyon metodları etkileri, maserasyon etkileri, ultrasonik destekli ekstraksiyon metodu etkileri incelenmiştir. Ayrıca *Tribulus terrestris L.* ile biyolojik aktivite tayini ve buna ek olarak *Tribulus terrestris L.* de protein tayini incelenmiştir.

1.1. *Tribulus terrestris L.*

Botanikteki ismi *Tribulus terrestris L.* olan şifalı bitki yabani kimyongiller ailesindendir. Dünyanın bir çok bölgesinde doğal olarak yetişir. Bu bitki türü Çoban Çökereten, Çarık Diken, Demir Diken olarak da bilinmektedir.

Genellikle bahçelerde ve doğada yabani ot olarak görülmektedir. Hindistan ve Afrika' da bol miktarlarda rastlanmaktadır. 15-80 cm boyunda tek yıllık otsu bir bitkidir. Sürünücü ve çiçekleri küçük açık sarı renklidir. Toprak üzerine yatık olarak bulunur. Meyveleri ortalama olarak 10 mm çapındadır ve boynuz şeklinde

sivri uçları mevcuttur. Bitkinin soy adı "Tribu" 'nun "ağlama" 'dan geldiği düşünülmektedir. Sıcak, kuru ve iyi ışık alan yerlerde yetişen, tohumla çoğalan, geç ilkbahar dönemi bitkisidir. *Tribulus terrestris* L. tropik ve ılıman yörelerde bulununan hormonal diüretik bir bitkidir. Bitkinin genellikle kurutulmuş meyvelerinden faydalanılır. Bu kurutulmuş meyvelerden infüzyon yapılarak istifade edilir. İnfüzyon metodunda etken olan içerik sıvıya geçer (Umay, 2007).

Bu bitkinin ekstraktları hipertansiyon, koroner kalp rahatsızlıkları ve gözde oluşan iltihapların tedavisi için kullanılmaktadır. Ayrıca böbrek taşı düşürücü, idrar söktürücü ve kuvvet verici olarak kullanılmakta bunun yanı sıra her iki cinsiyette de kısırlık tedavisi amaçlı kullanılmaktadır (Baytop, 1997).



Şekil 1.1. Deve çökerten (*Tribulus terrestris* L.)

1.2. Loliolide

Monoterpenoidlerin en yaygın temsilcilerinden olan hydroxylactones (Loliolide) 11 karbon atomundan oluşmaktadır. Hem karasal ortam hem deniz ortamında bulunan bitki ve hayvan türlerinde bulunmaktadır. Basit bir yapısı olmasına rağmen Loliolide'nin, geniş bir biyolojik aktivite aralığı gösterdiği bildirilmiştir (Winska ve ark, 2015).

Loliolide, ilk kez 1964 yılında İngiliz çimi Ryegrass *Lolium perenne*' de tanımlanmıştır (Honges ve ark, 1964).

Kırmızı karınca *Solenopsis invicta*' nın kraliçelerinin gövdelerinde keşfedildi. Kraliçenin, görevlilerine itaat etmeyi zorunlu kılan feromonlardan biri olduğu tespit edilmiştir (Roca ve ark, 1983).

Denizlerde yaşayan kahverengi alglerde (*Sargassum crassifolium*), Loliolide'in yanında stereoizomer Epiloliolide de bulunmuştur (Kuniyoshi, 1985). Yıllar geçtikçe Loliolide birçok organizmada tespit edilmiştir.

Loliolide ve türevleri genellikle küçük miktarlarda bulunmaktadır. Bu nedenle Loliolide'in ekstraksiyonu ve saflaştırılması çok karmaşıktır, yoğun emek ister ve pahalıdır.

Farklı ülkelerin halk hekimliğinde kullanılan bitkilerle ilgili uzun yıllar yapılan araştırmalar, Loliolide' lerin yaygın bir şekilde ortaya çıkması ve çeşitli biyolojik özellikleri hakkında bilgiler vermiş ve çok sayıda kanıt sağlamıştır.

Japonya' daki araştırmacılar, Loliolide' in, uzun yıllardır tıpta yaygın olarak kullanılan mor gevşek bitki (*Lythrum salicaria L.*)' de bulunan bileşiklerden biri olduğunu bulmuşlardır. Ateş düşürücü, iltihap önleyici ve damar genişletici etkiler sergilediğini bildirmişleridir (Fujita ve ark, 1972).

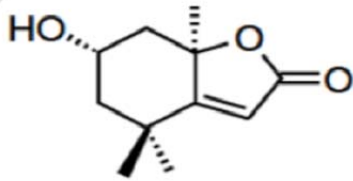
Loliolide, heliotrop (kedi otu) yapraklarından elde edilen ekstrakta bulunmuştur. Heliotrope (*Heliotropium angiospermum*), Güneydoğu Meksika'da bulunan, hodongiller familyasına ait bir çalı türüdür. Bu molekülün anti inflamatuvar ajan olarak kullanıldığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı ve ayrıca

dizanteri ve ishali tedavi etmek için de uygulandığı bildirilmiştir (Erosa-Rejón ve ark, 2009).

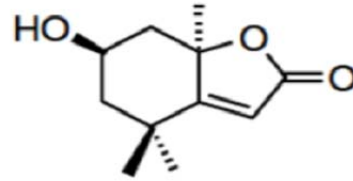
Brezilyalı bazı araştırmacılar, kuru dulavrat otu yapraklarından izole edilen lakton Loliolide' nin, kolon adenokarsinom hücresi Caco-2'ye göre anti proliferatif aktivite sergilediğini keşfetmiştir. Çalışma, tüm dünyada bulunan Asteraceae familyasına ait daha büyük dulavratotu (*Arctiumlappa L.*)' nin bir dizi hücre hattına karşı antitümör aktivitesi göstermesinden esinlenmiştir (Machado ve ark, 2012). Bu çalışmalar yabani otların bile faydalı olabileceğini ortaya çıkarmıştır.

Loliolide(1) ve Epiloliolide hidroksi(2) Şekil:1 ve Şekil:2 'de gösterilmiştir. Ek olarak Loliolide' in diğer türevleri Şekil:3 ve Şekil:4' te ayrıca tespit edilmiştir.

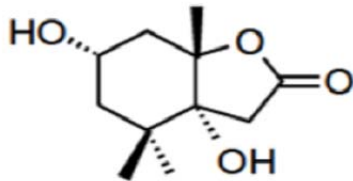
İleriki anlatımlarımızda Loliolide türevleri ile ilgili bilgi verirken bu numaralandırmalar kullanılacaktır.



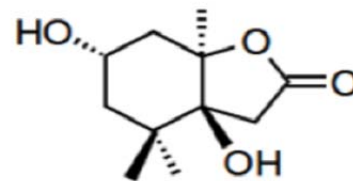
Şekil 1



Şekil 2



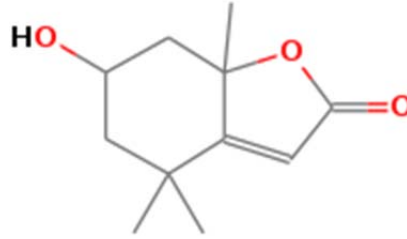
Şekil 3



Şekil 4

Şekil 1.2. 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one (Loliolide ve türevleri)

- **Formül:** C₁₁H₁₆O₃
- **Molekül Ağırlığı:** 196.2429 g/mol



- **Kimyasal Yapı:**
- **Stereoizomeri:** IsoLoliolide
- **Diğer İsimleri:** 2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-6-hydroxy-4,4,7a-trimethyl-;
- Δ1,α-Cyclohexaneacetic acid, 2,4-dihydroxy-2,6,6-trimethyl-;
- γ-lactone;
- 2,4-Dihydroxy-2,6,6-trimethyl cyclohexylidene acetic acid;
- Loliolide (*NIST Chemistry WebBook*)

1.3. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar canlılar tarafından sentezlenen uçucu bileşenlerin kompleks bir karışımıdır ve bulundukları içerikten buhar, su ve kuru destilasyon ya da narenciyedeki gibi sıkma yoluyla izole edilebilirler (Türk, 2010).

Uçucu yağlar genellikle terpen içeriklidirler ve çoğu sıvı olup yoğun kokuya sahiptirler bunun yanında adından anlaşıldığı gibi uçucudurlar. Büyük oranda kozmetik ve parfümeri sanayinde kullanılmaktadır. Su ile karışmayıp su yüzeyinde bir tabaka oluşturdıklarından yağ diye de adlandırılırlar fakat sabit yağlardan önemli farklılıkları vardır. Su buharı ile sürüklenirler ve suda çözünmeyip organik çözücülerde büyük oranda çözünürler. Süzgeç kağıdında iz bırakmazlar. Fakat sabit yağlar su buharında sürüklenmez ve süzgeç kağıdında

kalıcı iz bırakırlar. Ayrıca uçucu yağlar sulu etanolde çözünürler ve bu özellikle sabit yağlardan ayrılırlar (Cellat, 2011).

Bitkilerin hem meyve hem yaprak hem de çiçeklerinde bulunurlar. Bitkilerin büyük çoğunluğu canlılarda fizyolojik etkileri sebebiyle tıbbi tedavilerde tercih edilmektedirler. Etkin maddelerin çoğunlukla uçucu yağlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bugüne dek uçucu yağ çeşitlerinden 2000'den fazla sayıda bileşen belirlenmiştir. Bunlardan en önemlileri fenilpropanlar ve terpenlerdir. Bunun yanında çok miktarda su buharında uçucu olan azot ve kükürt ihtiva eden bileşiklerin varlığı da tespit edilmiştir (Umay, 2007).

Uçucu yağlar genellikle aromatik bitkilerde yağ hücrelerinde salgı kanallarında veya boşluklarında ya da salgı tüyleri içerisinde oluşurlar. Bazı durumlarda karbohidratlar ile bağlıdırlar. Bu durumda glizoidik bağın enzimatik reaksiyonlar ile hidroliziyle serbest kalırlar (Berger, 2007).

Uçucu yağlar fiziksel özellikleri açısından birbirlerine benzerler. Genellikle kırılgan indisleri yüksektir ve optikçe aktiflerdir. Uçucu yağlar büyük oranda renksiz veya açık sarı renklidirler fakat karanfil yağı gibi sarıdan kahverengiye veya papatya yağı gibi yeşilden maviye değişen şekilde renklerde olanları da vardır. Uzun süre açıkta kalırlarsa renkleri koyulaşır. Uçucu yağlardaki maddeler genelde 4 grup altında incelenebilir.

- *Terpenik maddeler
- *Aromatik maddeler
- *Düz zincirli hidrokarbonlar
- *Azot ve kükürt taşıyan bileşikler

Uçucu yağlar büyük oranda (yaklaşık %90) terpenik maddelerden oluşmuştur.

Uçucu yağlar çok düşük konsantrasyonlarda bulunan kompleks karışımlardır. Analiz edilmeden önce içinde bulundukları matriksten

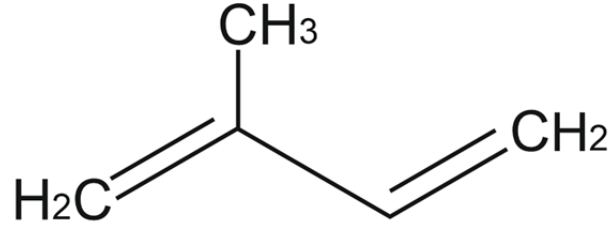
uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Bunun için yaygın olarak buhar destilasyonu, hidrodestilasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu kullanılır. Fakat uçucu yağları oluşturan moleküller ısı olarak hassas ve sıcaklıkla yapısal değişikliğe uğrayan bileşiklerdir. Bazı uçucu bileşenlerin kaybı, ısı ve hidrolitik etkilerle doymamış ve ester bileşiklerinin parçalanması ve ekstrakt içeriğinde zehirli çözücü kalıntısı bu yöntemler kullanıldığında sık karşılaşılan dezavantajlardır. Bu tür dezavantajlar uçucu yağ ekstraksiyonunda yeni ve daha az enerji, daha az çözücü kullanılan ultrasonik ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi ‘‘yeşil’’ tekniklerin gelişmesine sebep olmuştur (Türk, 2010).

1.4. Terpenoid Yapısında Olmayan Hidrokarbonlar

Uçucu yağlarda terpenoid yapıda olmayan hidrokarbonlar fosfolipitlerin ve yağ asitlerinin metabolik dönüşümleri veya aldehitler şeklinde bulunurlar (Berger, 2007).

1.5. Terpenler

Terpenler, doğal ürünlerin en yaygın gruplarından biridir. Bitkilerde ve hayvanlarda bilinen ve birçok farklı işlevi bulunurken gıdalarda da aroma bileşenleri olarak bulunurlar. Örnek verecek olursak turuncgiller, tarçın ve diğer baharat aromaları bazı terpen molekülleri ile karakterize edilir. Limonene ve citral (ikisi de limonda bulunur), eugenol (karanfil), pinene (çam ağaçları), anethol, camphor, geraniol (gül), menthol ve thymol en çok bilinen terpenlerdir. Kimyasal anlamda terpenler, çeşitli yapılarda bulunur ve belli sayıda isoprene birimlerine sahip olan bir moleküller grubu olarak adlandırılır (2-metil-1,3-bütadien), (hemiterpene olarak isimlendirilen 5 karbonlu moleküldür) (Umay, 2007).



Şekil 1.3. Isoprene

Bu tanım, temel moleküler iskelette isoprene sayılarına dayanan terpenlerin rasyonel bir şekilde sınıflandırılmasını sağlar.

Çizelge 1.1. Terpenlerin Genel Yapıları

Terpenler	İzopren üniteleri	Karbon atomları
1. Monoterpenler	2	10
2. Seskiterpenler	3	15
3. Diterpenler	4	20
4. Sesterpenler	5	25
5. Triterpenler	6	30
6. Karotenoidler	8	40
7. Kauçuk	>100	>500

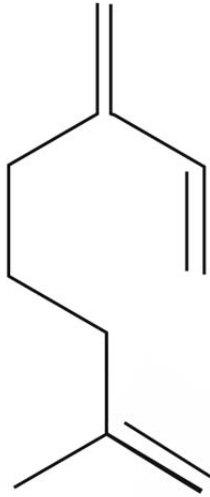
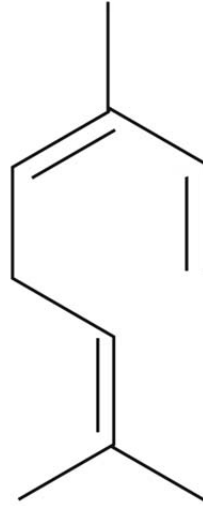
Mono-, seski-, di-, ve sesterpenler baş-kuyruk şeklinde bağlanmış ‘İsoprene’ lerden meydana gelmiştir. Triterpenler iki C15 ve Karotenoidler (tetraterpenler) iki C20 biriminin kafa kafaya bağlandıkları yapılardır. Terpenlerin çoğu hidrokarbondur ancak alkoller, ketonlar veya aldehytler gibi oksijen de içerebilirler. Bu türevler genellikle terpenoidler olarak adlandırılırlar. Mono- ve seskiterpenler esansiyel yağların ana bileşenleridir. Diğer terpenler ise mum, kauçuk ve reçinenin temel bileşenleridir (Umay, 2007).

1.5.1. Monoterpenler (C₁₀)

Bugüne dek uçucu yağlarda 150'den fazla monoterpen bulunmuştur. Monoterpenler, iki isopren biriminden oluşur. En basit iskelet yapısı 2,6-dimetiloktan'dır.

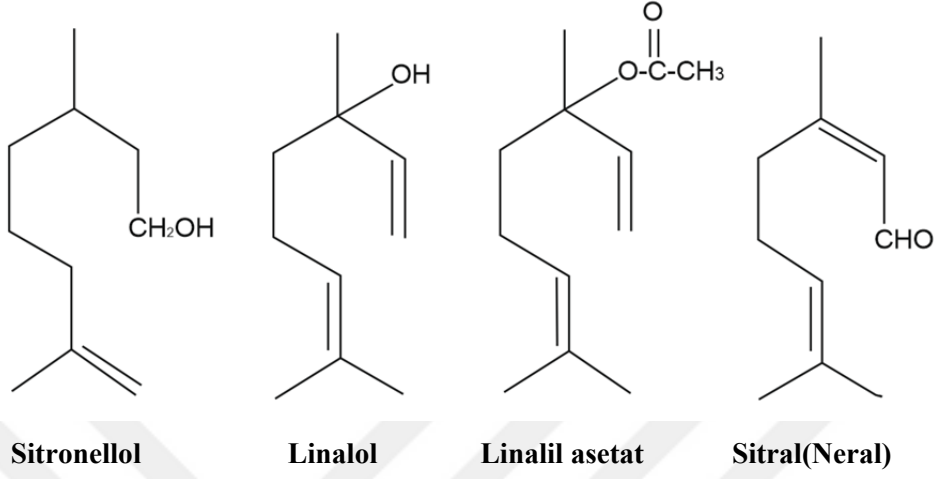
1.5.1.1. Asiklik Mono Terpenler

a) Asiklik monoterpenler üç çift bağ içerirler:

**Mirsen****Osimen**

Şekil 1.4. Asiklik Monoterpenler

Asiklik monoterpenlerin alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri bulunur.



Şekil 1.5. Asiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri

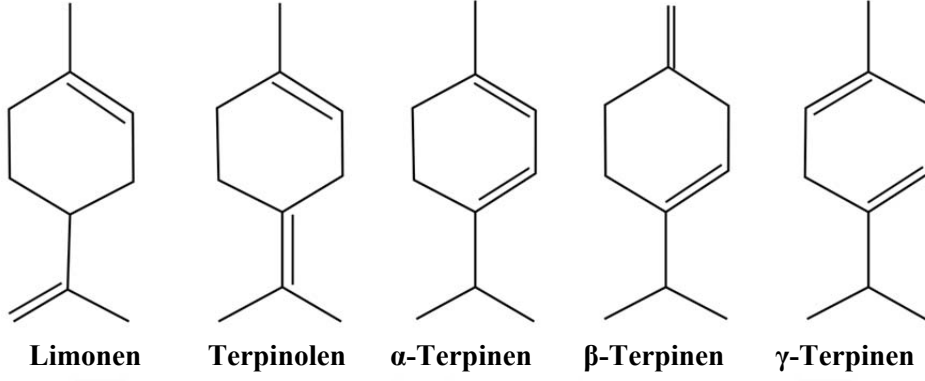
1.5.1.2. Siklik Monoterpenler

Siklik monoterpenler halka sayılarına göre 3 alt grupta sınıflandırılabilir:

- 1- Monosiklik Monoterpenler
- 2- Bisiklik Monoterpenler
- 3- Trisiklik Monoterpenler

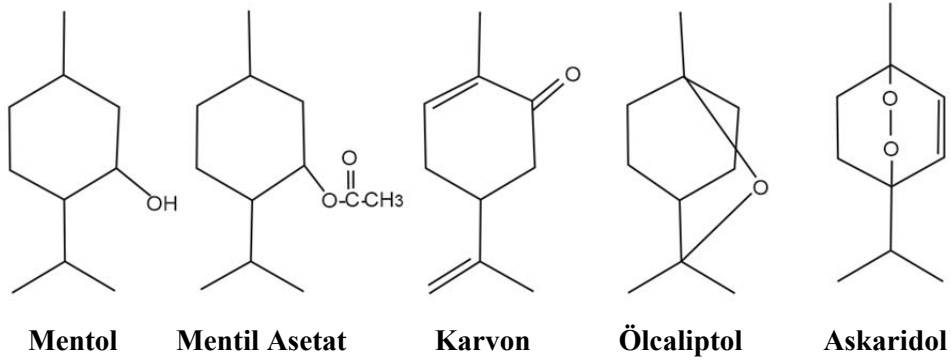
1.5.1.2.(1). Monosiklik Monoterpenler

Monosiklik monoterpenlerde iki çift bağ bulunur:



Şekil 1.6. Monosiklik Monoterpenler

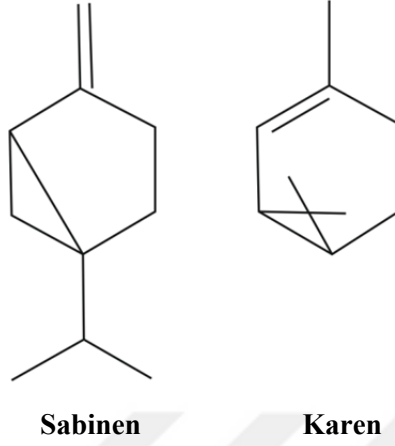
Monosiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri ester, epoksit, keton, alkol ve peroksit grubu taşıyabilirler:



Şekil 1.7. Monosiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri

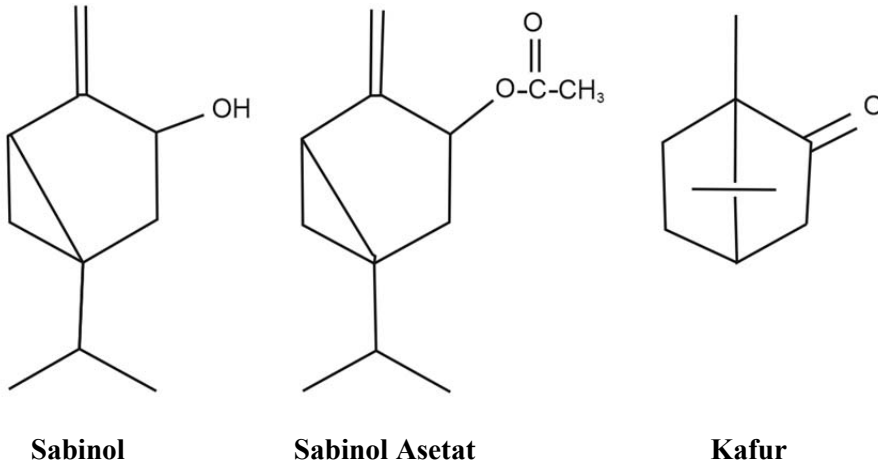
1.5.1.2.(2). Bisiklik Monoterpenler

Bisiklik monoterpenler bir çift bağ içerirler:



Şekil 1.8. Bisiklik Monoterpenler

Bisiklik monoterpenerin alkol, ester veya ketonlu türevleri bulunur:



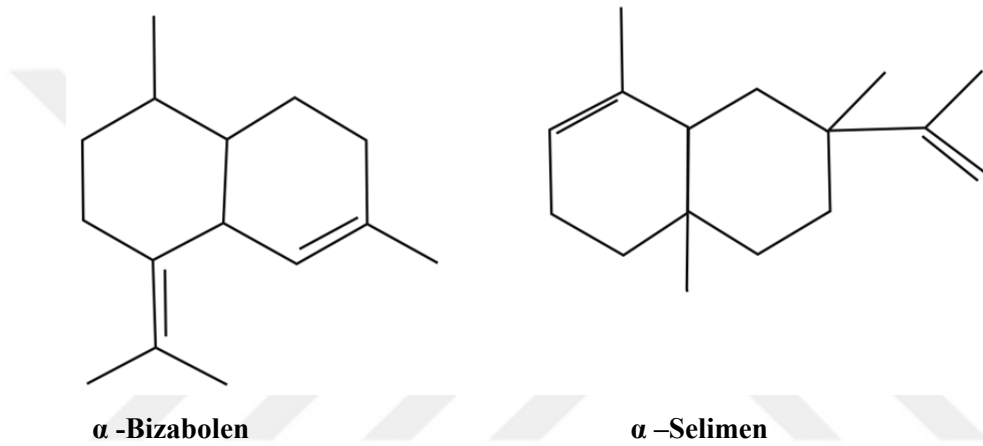
Şekil 1.9. Bisiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri

1.5.1.2.(3). Trisiklik Monoterpenler

Trisiklen **8** yada 1,7,7-trimetiltrisiklo[2.2.1.0^{2,6}] heptan çeşitli uçucu yağlarda sıklıkla bulunan iyi bir örnektir.

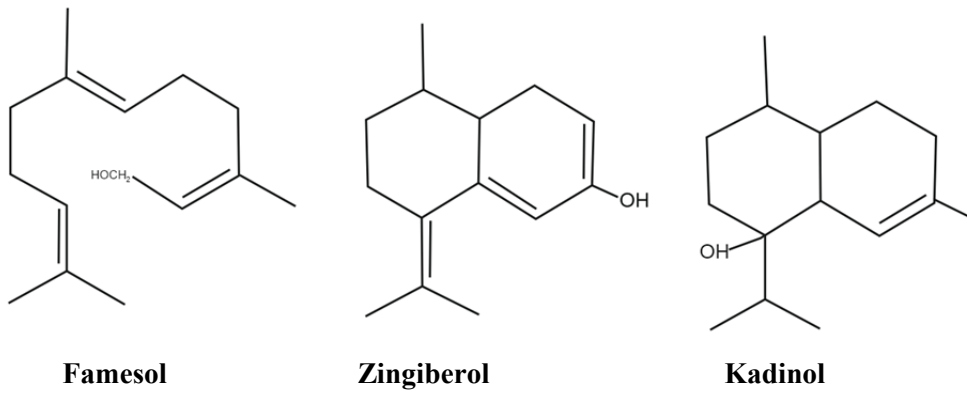
1.5.2. Seskiterpen (C₁₅)

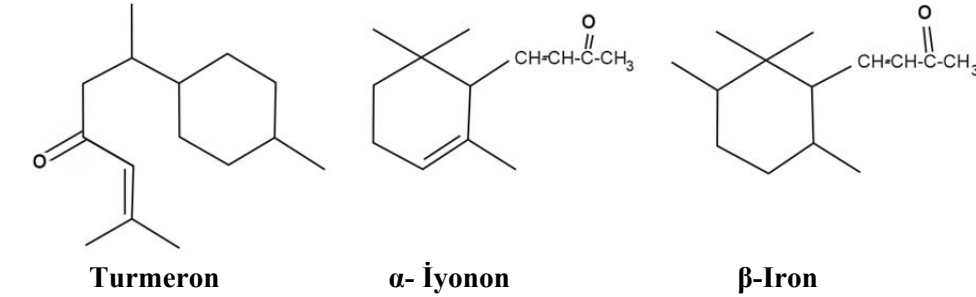
Bunlar da asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik seskiterpenler olarak alt gruplara ayrılır. Günümüzde uçucu yağlarda 1000 e yakın seskiterpen bağlantılı türevler bulunmaktadır. Seskiterpenlere örnek olarak Bisabolol, Farnesol, Kamazulen verilebilir. Seskiterpenler monosiklik, bisiklik ve asiklik yapıda olabilir (Ceylan, 1997).



Şekil 1.10. Seskiterpenler

Seskiterpenlerin oksijenli türevleri yaygın olarak bulunur.





Şekil 1.11. Seskiterpenlerin Oksijenli Türevleri

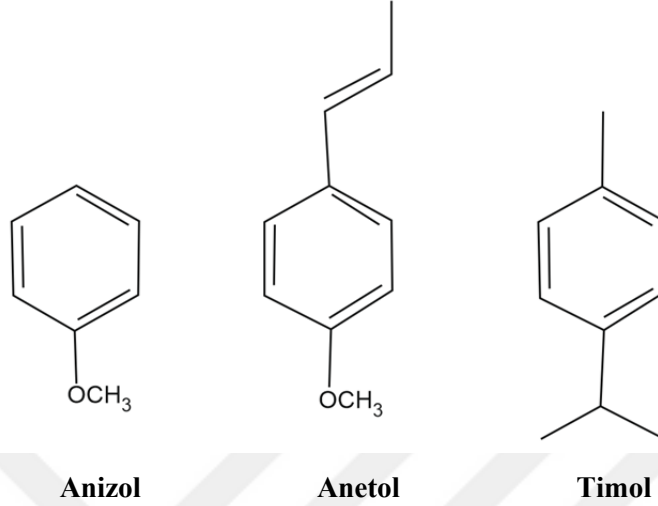
1.5.3. Diterpenler (C₂₀) ve Triterpenler (C₃₀)

Aromatik ve terpenik maddelerin oksijenli ya da oksijensiz türevlerinin bir çoğu uçucu yağda karışım halinde bulunmaktadır. Oksijensizler genelde kolay uçucudur. Uçucu yağlar düşük sıcaklıklarda dahi sıvı halde kalabilir. Oksijenli türevlerinin ise uçuculuğu daha azdır ve uçucu yağ soğutulduğunda çoğunluğu çökerek oksijensiz bileşiklerden ayrılır. Bazı uçucu yağlarda çöken kısma stearopten, bu şartlarda sıvı halde kalan kısma da elaopten denir.

Uçucu yağlara fraksiyonlu destilasyon uygulandığında ilk gelen fraksiyonlar elaoptenden oluşan oksijensiz bileşiklerdir. Terpenlerin oksitlenmesi ile oluşan oksijenli türevler uçucu yağın kendine has kokusunu ve tadını verirler. Uçucu yağlarda asıl önemli olan bileşikler oksitlenmiş türevlerdir (Umay, 2007).

1.5.4. Aromatik Özelliklerine Göre Terpenler

Aromatik maddeler terpenlerden sonra uçucu yağlarda bulunan önemli bir bileşik grubudur. P-simen, propilbenzen veya benzen yapısında olabilirler. Alkol, asit, aldehit, ester, keton, eter ve fenol gibi organik fonksiyonel gruplar taşıyabilirler. Uçucu yağların koku ve tat açısından önemli ve belirgin bazı fizyolojik etkilere sahip bölümünü oluştururlar. Tat ve koku sanayinde birçok bileşiğin sentezinde de kullanılırlar.



Şekil 1.12. Uçucu Yağlardaki Çeşitli Aromatik Bileşikler

1.5.5. Farmakolojik Etkilerine Göre Terpenler

Uçucu yağlar farmakolojik etkilerine bağlı olarak da gruplandırılırlar. Farmakolojik etkilerine göre uçucu yağlar dezenfektan, idrar söktürücü, antiromatizmal, iltihap çözücü, öksürük kesici vs. gibi de gruplandırılabilirler (Ceylan, 1997).

1.6. Tıbbi Bitkiler İçin Genel Ekstraksiyon Metodları

Tıbbi bitkiler için genel ekstraksiyon metodları şöyle sıralanabilir;

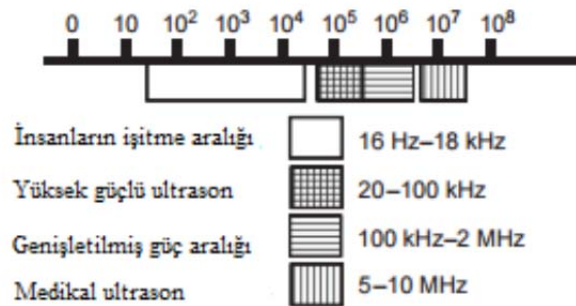
- Çözücü ile ıslatma (maserasyon)
- Demleme
- Parçalama
- Dekoksiyon
- Perkolasyon
- Soxhlet Ekstraksiyonu
- Fermantasyon ile Sulu Alkolik Ekstraksiyon

- Ters Akım Ekstraksiyonu
- Hidrodestilasyon

1.7. Tıbbi Bitkilerin Ekstraksiyonunda Uygulanan Yeni Yöntemlerden Bazıları

1.7.1. Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrason saniyede 20.000 veya daha fazla titreşim yapan ses dalgalarının enerji meydana getirmesidir. İnsanların duyabileceği ses dalgaları aralığı 20 Hz ile 20 kHz arasındadır. Ultrasonik ses dalgaları ise insanların duyabileceği ses dalgalarının üzerinde yer alan 20 kHz ile 10 mHz arasındadır. Gıda sanayinde ultrason uygulamaları ise genelde 20 kHz ile 1 MHz arasındadır. 5 MHz üzeri ultrason uygulamaları ise genelde medikal tanı amaçlı kullanılmaktadır (Yaycıoğlu, 2015).



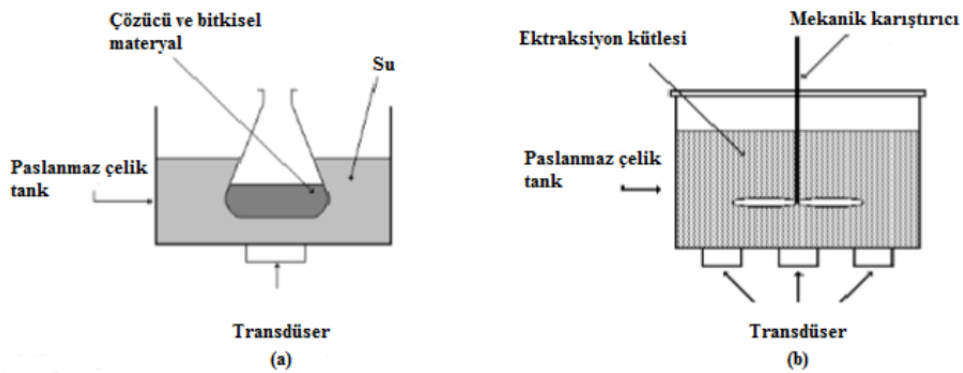
Şekil 1.13. Ses dalgası tipleri

Ultrason cihazları alternatif akımı bir dönüştürücü (transdüser) vasıtasıyla mekanik titreşimlere dönüştürür. Ultrason destekli ekstraksiyonda ultrasonik banyo (indirekt) ve proplu ultrason (direkt) en yaygın kullanılan uygulamalardır (Takeuchi ve ark, 2008). Ultrasonik banyolar duvarında bir veya birden fazla transdüser bulunan paslanmaz çelik tanklardır. Ekonomiktir, kullanımı kolaydır ve birçok kullanım alanı bulmuştur. Ultrason uygulanacak maddeler bir banyo

içerisine yerleştirilir ve maddeye uygulanan maksimum güç genellikle 1-5 W/cm² kadar çıkabilmektedir. Ultrasonik banyo genelde yüksek hacimli uygulamalarda kullanılmaktadır

Proflu ultrason uygulamaları direk katı-sıvı karışım içerisine etki etmesi nedeniyle fazla güç kullanımına sebep olur. Bundan dolayı genelde laboratuvar ortamında yapılan küçük hacimli çalışmalarda kullanılmaktadır. Proflu ultrason cihazlarının avantajı ise daha verimli kavitasyon sağlayabilen lokalize enerjidir (Takeuchi ve ark, 2008; Chemat ve ark, 2008; Torley ve Bhandari, 2007).

Ultrason uygulamaları gıda sektöründe geniş bir kullanım alanı bulmuştur.



Şekil 1.14. İndirek (a) ve direk (b) ultrason uygulamalarının şematik gösterimi

Ultrason destekli ekstraksiyonun avantajları; kullanımı kolaydır, çevre dostudur, ekipmanı ucuzdur, minimum bozulma ile hedeflenen bileşenin ekstraksiyonu maksimize edilebilir ve yüksek verim alınır. Ultrason destekli ekstraksiyonun kütle transferini hızlandığı görülmüştür ve klasik ekstraksiyon metodu ile kıyaslandığında daha az çözücü tüketimi sağladığı görülmüştür (Vieira ve ark, 2013; Wu ve ark, 2014; Gonzalez ve ark, 2015). Ultrason destekli ekstraksiyon hücreleri parçalayarak penetrasyonu artırır (Vinatoru ve ark, 2001).

Bu yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örnek verecek olursak; materyal ve çözücünün içine koyulduğu sıvının uygulama sırasında ısınması bir

dezavantajdır. Ayrıca ultrason destekli ekstraksiyon ile hücre duvarının geçirgenliği artar ve hücre duvarında boşluklar oluşur. Rauwolfia köklerinin ekstraksiyonu gibi bazı durumlarda yararlı bir süreç olmasına karşın büyük ölçekli uygulamalarda yüksek maliyeti nedeniyle sınırlıdır. Bu yöntemin başka bir dezavantajı ise nadir de olsa 20 kHz' in üzerindeki frekanslarda tıbbi aromatik bitkilerin aktif bileşenleri üzerinde serbest radikallerin oluşumuna neden olması ve ilaç moleküllerinde istenmeyen değişikliklere neden olmasıdır (Handa ve ark, 2008). Bunun yanında yapılan bazı çalışmalarda ekstrakte edilen bileşenlerin stabilitesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu belirlenmiştir.

1.7.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Süperkritik akışkanlar, 20.yy'ın ikinci yarısında doğal bileşiklerden biyoaktif moleküllerin ekstraksiyonu için önemli bir alternatif yöntem olmuştur. Bunun en önemli nedeni çalışma sıcaklığının düşük ve işlem süresinin kısa olması dolayısıyla ısı olarak bozulan doğal bileşenlerin zarar görmesinin engellenmiş olmasıdır. Özellikle 1980'lerden itibaren yapılan yoğun araştırmalar sayesinde günümüzde, süperkritik akışkan ekstraksiyonlarına ait tüm ekonomik ve teknik sorular yanıtlanmıştır (Türk, 2010).

1.7.2.1. Süperkritik Akışkanlar

Süperkritik akışkan; bileşiğin gaz ve sıvı halinin denge durumunda olduğu hal olarak da adlandırılabilir. Sıcaklığı ve basıncı kritik sıcaklık ve basınç noktasının üstünde olan akışkanlardır. Bir akışkana süperkritik akışkan denebilmesi için indirgenmiş sıcaklığın T_r 1,2-1,3 aralığında olması ($T_r = T/T_c$) gerekir. İndirgenmiş basınç P_r ise kullanılan sistemin teknik olarak izin verdiği ölçüde olması yeterlidir. ($P_r = P/P_c$).

Gerekli koşullar uygulandığında herhangi bir sıvı süperkritik koşullara ulaşabilir. Fakat yalnızca kritik sıcaklığı oda sıcaklığının çok üstünde olmayan sıvılar tıbbi aromatik bitkilerin ekstraksiyonunda alternatif çözücü olurlar.

Karbondiyoksit kritik sıcaklığının ve basıncının düşük olması nedeniyle en çok uygulanan çözücü olmuştur ($T_c=31.06^\circ\text{C}$ ve $P_c=73.81\text{ bar}$) (Türk, 2010).

Süperkritik karbondiyoksit ayrıca toksik ve alev alıcı olmaması, ucuz ve kolay temin edilebilir olmasından dolayı alternatif bir çözücü olmuştur.

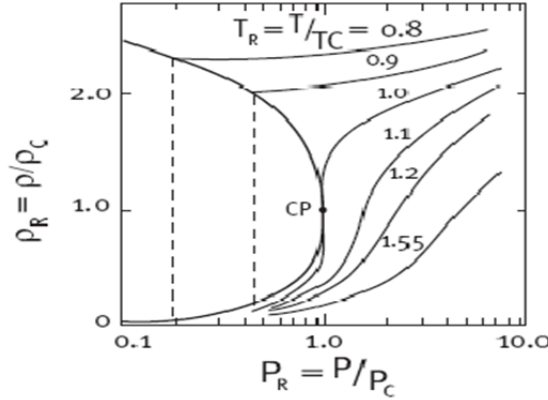
Süperkritik akışkanın yoğunluğu da önemli bir parametredir. Süperkritik akışkanların ekstraksiyon çözücüsü olması yoğunluğu ile direkt ilgilidir. Chrastil yoğunluk ve çözünürlük arasındaki ilişkiyi Formül 1 de verildiği gibi ifade etmiştir (Chrastil, 1982).

Formül.1:

$$s = \rho^a \exp(b/T + c) \quad (1)$$

s çözünürlük; ρ çözücünün yoğunluğu; T mutlak çalışma sıcaklığı; a , b ve c düzeltme sabitleridir.

Bir akışkan kritik koşullara yaklaştıkça yoğunluğu bir sıvının yoğunluğuna yaklaşır. Şekil 1.15'te CO_2 için yoğunluk izotermi indirgenmiş basınca karşı grafiğe geçirilmiştir. Buradan $T = 35^\circ\text{C}$, $P = 200\text{ bar}$ ve $\rho = 866\text{ kg/m}^3$ olduğu görülebilir. Başarılı bir süperkritik akışkan ekstraksiyonunda çözücü yoğunluğu çok önemli bir faktördür.



Şekil 1.15: CO₂ için yoğunluk/basınç diyagramı

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu sahip olduğu avantajlardan dolayı klasik çözücü ekstraksiyonu yöntemlerinin yerini almaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun avantajları aşağıda verilmiştir (Lang ve Wai, 2001).

- Süperkritik akışkanlar yüksek difüzyon hızı ve düşük viskoziteye sahip olmalarından dolayı gözenekli yapıdaki katı maddelerin içine sıvılara göre daha hızlı yayılmaktadır. Yüksek yayılma gözenek içi kütle aktarım dirençlerini azaltmakta ve bunun yanı sıra süperkritik-CO₂ 'nin yüzey gerilimi çok düşük olduğu için gözenekli katılara daha kolay girişim yapabilmektedir. Böylece artan kütle aktarım hızı işlem süresini kısaltır ve klasik çözücü ekstraksiyon yöntemlerine göre işlem süresi ile ilgili üstünlük sağlamış olur.
- Süperkritik akışkanın dolgulu kolon ekstraktöre aralıksız olarak beslenmesi ekstraksiyon işlemlerinde yürütücü kuvvetin artmasını sağlamış olur ve bu durum kütle aktarım hızını artırır.
- Süperkritik akışkanların çözme güçleri basınç veya sıcaklık değerlerindeki küçük değişimler ile büyük oranda değişebilmektedir. Bu özellik ile ürün seçimi ve verimliliği etkilenir. Ayarlanabilir çözme gücü süperkritik

akışkan ekstraksiyonu için çok önemli bir avantaj sağlamaktadır.

- Süperkritik akışkanlar ile ekstraksiyon işlemi bittiğinde basıncın düşürülmesi sonrasında akışkan çözünen madde içerisinden kolayca ayrılabilir ve bu yönüye göre üründe çözücü kalıntısı kalmaz. Dolayısıyla yeni bir saflaştırma işlemine gerek duyulmaz.
- Isıya duyarlı bileşiklerin ayırma ve saflaştırma işlemleri için süperkritik akışkan ekstraksiyonu en etkili yöntemdir.
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılan akışkanlar inert çözücüler olmakla beraber bu şartlarda yapılan ekstraksiyon işlemlerinde herhangi bir bozunma tepkimesi, oksidasyon ya da hidroliz olmamaktadır.
- Tabii ürünlerin içeriğinde düşük miktarda bulunan değerli endüstriyel ürünlerin ayırma işlemlerinde süperkritik akışkan ekstraksiyonu oldukça etkili bir yöntemdir.
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu için sistem direk olarak bir kromatografik analiz cihazına bağlanabilir ve elde edilen ekstraktın analizi çevrimiçi (on-line) olarak yapılabilir.
- Süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan akışkan ekstraktöre geri beslenebilir, böylece çözücü kaybı azaltılabilir ve ekonomik bir ayırma yapılmış olur (Türk, 2010).

Bunların yanında süperkritik akışkanlarla ekstraksiyonun bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Örnek verecek olursak süperkritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta (>80 atm) gerçekleşmesi nedeniyle yüksek yatırım maliyeti ve enerji gereksinimi gibi bazı olumsuz yanları vardır. Büyük önem arz etmesine rağmen ihmal edilen diğer bir dezavantajı ise en saf CO_2 tüplerinin içeriğinde bile var olan %1-2'lik oksijen ihtivasının antioksidantlar gibi oksijene duyarlı bileşikler ile tepkimeye girerek az miktarda bile olsa bozunmalarına sebep olmasıdır.

Süperkritik karbondioksitin yanı sıra “sub-kritik su” da son yıllarda çözücü olarak araştırmacılar tarafından artan bir ilgiyle kullanılmaktadır (Giray ve ark., 2008); (Özel ve ark, 2003). Sub-kritik su ekstraksiyonu, 100-374 °C aralığında ve sıvı fazın oluşmasını sağlayabilecek basınçta suyun ekstraksiyon çözücüsü olarak kullanıldığı yöntemdir. Bu koşullardaki su oldukça çok sayıda organik molekül için iyi bir çözücü olduğundan dolayı bitki ekstraksiyonu için klasik ve süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yöntemlerine göre alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Gracia ve Castro, 2000); (Kubatova ark, 2001).

1.7.2.2. Süperkritik Akışkanın Seçimi

İlaç ve gıda endüstrisinde kıymetli ve ortam şartlarına duyarlı hammaddelerin süperkritik akışkanlarla ekstraksiyonu işleminde kullanılacak akışkanın seçimi son derece önemlidir. Bu seçimde hammaddenin akışkan içinde çözünürlüğü, kolay temin edilen bir akışkan olması ve ekonomik olması akışkanın kimyasal kararlılığı, toksik, yanıcı ve patlayıcı olmaması gibi güvenlik özellikleri dikkate alınmalıdır. Çizelge 1.2’ de biyolojik uygulamalarda en çok kullanım alanı bulan çözücülerin kritik sıcaklık, yoğunluk ve basınç değerleri verilmektedir. Amonyak, metanol, toluenin ve n-pentanin kritik sıcaklıklarının yüksek olmasından dolayı sıcaklığa duyarlı tabii maddelerin ekstraksiyonu için uygun çözücüler olmadıkları görülmektedir (Skoog ve ark, 1998).

Çizelge 1.2. Süperkritik akışkanların fiziksel özellikleri

Çözücü	T _c (°C)	P _c (atm)	ρ (g/cm ³)
Karbondioksit	31.3	72.9	0.47
Etanol	243.4	63	0.28
Su	374.4	226.8	0.33
Etan	32.4	48.3	0.20
n-Propan	96.8	42	0.22
Amonyak	132.5	112.5	0.24
n-pentan	196	33.2	0.237
Metanol	240	79.8	0.272
Toluen	319	40.6	0.292
Etilen	9	49.6	0.218

Süperkritik akışkanlarla yapılan ekstraksiyon ışık ve oksijen etkilerini ortadan kaldırdığı için atmosfer basıncında çözücülerle yapılan ekstraksiyon işlemlerine göre daha yüksek verimler elde edilmesini sağlamıştır.

1.7.3. Sub-kritik Su Ekstraksiyonu (sbkH₂O)

Su yapısal özellikleri, molekül ağırlığına oranla yüksek kaynama noktasına sahip olması, yüksek miktarda hidrojen bağlı yapısı, yüksek polaritesi ve dielektrik sabiti ile özel bir solventtir.

SbkH₂O yeni sayılabilecek bir teknik olmakla birlikte basınç altında 100–374 °C sıcaklık arasında çalışmaktadır. Aynı zamanda Sub-kritik su 100–374°C sıcaklık aralığında basınç altındaki sıvı su demektir. Ekstraksiyonu yapılacak maddeden maksimum verim elde edilebilmesi için sıcaklık ve basınç değerleri değiştirilerek optimum koşullarlar belirlenir.

Kritik sıcaklık noktasına ulaşılmadan bile ekstraksiyon verimi, süperkritik çözücü veya akışkan ekstraksiyonu verimine eşdeğer bulunmuştur. Bundan dolayı sub kritik su ekstraksiyonu; süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve çözücü ekstraksiyonu yerine bir alternatif olarak gelişmiştir. Sub-kritik su kullanmanın çok fazla avantajlı yönü vardır. Bunlardan bazıları; toksik olmaması, çevre dostu

olması, ucuz olması, kolay bulunur olması ve organik atık bırakmamasıdır (Cellat, 2011).

Yüksek sıcaklık ve basınç altında iken suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerinde bilhassa da dielektrik sabitinde (ϵ) etkileyici değişiklikler oluşmaktadır. Yüksek basınç ve sıcaklık şartlarında suyun polaritesi ciddi oranda düşmektedir ve ekstraksiyon işleminde aseton, metanol ve etanol gibi davranabilmektedir. Bu sayede su orta polar veya düşük polar bileşenlerin ekstraksiyonunda organik solventlere ikame olarak kullanılabilir.

Sonuçta süper ısıtılmış su, bilhassa aromatik bileşikler gibi polarizlenebilen ya da bazı polar gruplara sahip büyük organik bileşikler için iyi bir çözücüdür. Son yıllardaki çalışmalarda poliklorlu bifeniller, poliaromatik hidrokarbon ile bitki ve gıda örneklerinden pek çok kimyasal bileşik ekstrakte edilebilmektedir.

Benz(e)pyrene ve naphthalene gibi poli aromatik hidrokarbonların ve bazı pestisitlerin süper ısıtılmış sudaki çözünürlükleri incelenmiş ve sonucunda 100 °C 'den 374 °C 'ye kadar bir aralıkta çözünürlüklerinde 10^6 civarında bir artış tespit edilmiştir ve bu sonuç çok iyi bir sonuçtur.

Süper ısıtılmış suyun günümüzde kullanılan organik çözücülere alternatif şekilde organik bileşik proseslerinde kullanılması günden güne yaygınlaşmaktadır. Elde edilen üründe organik atık yoktur ve kirlilik çalışmalarında bir çok avantajı görülmüştür ayrıca çevrecidir. Bu yöntem, bitki içeriklerinden kıymetli bileşiklerin veya esans yağların ekstraksiyonu yapılırken kullanılabilir (Cellat, 2011).

Örnek verecek olursak 210 °C' deki su ile 25 °C' deki metanolün dielektrik sabiti birbirine eşittir. Bu nedenle su bu sıcaklıkta metanolün çözdüğü bileşikleri de çözebilir.

Süper ısıtılmış su ile bitki içeriklerinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen yağın terpen ve oksijenli bileşikleri oranı su buharı destilasyonu ile kıyaslandığında daha fazla miktarda bulunmuş ve bu nedenle verimin çok daha iyi olduğu kabul edilmiştir.

Bunun yanı sıra yüksek basınç ve sıcaklık altında çözücü bitki içeriğine daha fazla etki eder.

Ayrıca süper ısıtılmış su gıda maddelerinden yeni tatların elde edilmesinde, petrol ürünlerinden aromatik bileşiklerin ekstrakte edilmesinde, çevresel örneklerden ve yağlardan kirliliklerin ekstraksiyonunda da kullanılmaktadır. Bu tekniğin ucuz ve çevreci olması kozmetik, eczacılık ve gıda endüstrisinde büyük gelişmelerin olmasını sağlayacaktır (Cellat, 2011). Bitki ekstraksiyonu açısından çok kullanışlı bir sistemdir. 10-20 dakika arasında bir süre yeterli olmaktadır (Özel ve ark, 2003).

Sub-kritik H_2O statik mod, dinamik mod veya her iki modun bileşimleri şeklinde gerçekleştirilir. Statik modda, materyal ve çözücü belli bir süre boyunca sabit basınç ve sıcaklık altında tutulur. Dinamik modda ise örneğin içinden sürekli bir çözücü akışı söz konusudur. Bazı çalışmalarda ise statik ve dinamik modun birlikte kullanılmasının sub-kritik su ekstraksiyonlarında çok daha etken olduğu tespit edilmiştir (Lehotay ve ark., 1997); (Gamiz ve ark., 2000); (Chienthavorn ve ark., 2004). Sub-kritik su ekstraksiyonu gücünü etkileyen faktörler; materyal miktarı kompozisyonu, çözücü akış hızı ve hacmi, ekstraksiyon süresi, basınç, döngü ve sıcaklıktır (Smith, 2002); (Ramos ve ark, 2002).

1.7.4. Sub-kritik Etanol (sbkEtOHE) Ekstraksiyonu

Süperkritik ekstraksiyonun çözücü olarak etanol kullanılan bir çeşididir. Ekstraksiyon içeriği ekstraksiyonda çözücü olarak etanol kullanıldığı için direk GC-MS analizine verilebilir veya sub-kritik su ekstraksiyonu metodunda olduğu gibi ekstrakt dikloro metan ile sıvı-sıvı emülsiyon şeklinde muamele edilip ayrılarak GC-MS analizine verilebilir.

1.7.5. Maserasyon (Islama)

Maserasyon, çiçeklerden uçucu yağ elde etmek amacıyla kullanılan ilkel yöntemlerden biridir. 60–70 °C’ deki erimiş hayvansal ya da bitkisel yağa batırılan

çiçekler ısı etkisiyle parçalanır ve aroma içeriklerinin yağa geçmesi sağlanır. Yağ içinde kalan çiçek parçaları bulunduğu ortamdan uzaklaştırılır ve üzerlerinde kalan yağ hidrolik basınç uygulamasıyla alınır. Sonra da aroma maddelerini ihtiva eden yağa eklenir. Bu işlem yağ aroma maddeleriyle doyana kadar devam ettirilir. maserasyon çok zaman alan pek de verimli olmayan bir işlemdir (Mukhopadhyay, 2000).

1.8. Kjeldahl Yöntemi ile Toplam Azot (Protein) Tayini

Kjeldahl metodu hayvansal ve bitkisel içerikli maddelerin analizinde azot miktarının tayini için kullanılır. Bu metod farklı cihaz ve metodlar kullanıldığında da aynı sonuçlar bulunduğundan farklılıklar eş değer olarak görülebilir. Metodun prensibi analiz için homojenize edilmiş gıda örneklerinin uygun katalizörler ve derişik sülfürik asit ile 380-400 °C civarında muamele edilerek organik maddenin parçalanması ile hem proteini oluşturan aminoasitlerin amin grubundaki hem de protein olmayan diğer azot kaynaklarındaki NH_2 formunda bulunan azotun amonyum azotuna yükseltgenmesi ve derişik NaOH ile ortamın kuvvetli alkalileştirilmesi sonucunda NH_3 halinde su buharı ile birlikte destile edilmesi ile toplama kabındaki çözelti tarafından (borik asit veya ayarlı bir asit çözeltisi) tutulmasıdır. Tutucu olarak borik asit kullanıldığında ayarlı bir asit çözeltisi veya tutucu olarak ayarlı bir asit çözeltisi kullanıldığında ayarlı bir NaOH çözeltisi ile titre edilir ve azot miktarı hesaplanır, uygun katsayılarla çarpılır, sonuç protein miktarı olarak ifade edilir (Anonymous, 2010); (Öncül ve ark., 2010).

1.9. Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu yöntemde mikroorganizmanın inoküle edildiği katı besiyerinde 10 mm çapında kuyucuklar açılır ve antimikrobiyal aktivitesi belirlenecek sıvı örnek farklı miktarlarda bu kuyucuklara eklenir. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra mikroorganizmanın hassas olduğu diskin çevresinde üreme görülmez ve inhibisyon

zonu meydana gelir. Değerlendirmeler zon çapının büyüklüğüne (mm cinsinden) göre bir standarta karşı yapılır (Schillinger ve ark, 1989).





2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Akgollu ve ark (2018), *Tribulus terrestris* L. ile sub-kritik su ekstraksiyonu yöntemiyle ve 100 °C 60 bar 30 dk. koşullarında yapılan çalışmada basit lakton bileşiği olan Loliolide % 23,82 oranında tespit edilmiştir.

Noikotra,K. ve ark (2017), (Z) -9-Octadekenamid veya Oleamidin, skopolamin kaynaklı hafıza kaybına karşı koruyucu bir ajan olduğu tespit edilmiştir ve Alzheimer'in in vitro test edilen hastalığına karşı yeterli miktarda fare ile yapılan çalışmada yararlı bir kemopreventif ajan olduğu görülmüştür.

Corbin ve ark (2015), Keten tohumundan ultrason destekli lignan ve diğer fenolik maddelerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu metot musilaj oluşumunda azalma sağlamış ve ekstraksiyon verimini arttırmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları 0,2 N sodyum hidroksit çözeltisi ilavesi ile 60 dakikada 25 °C' de 30 kHz frekansta gerçekleştirilen ekstraksiyonda sağlanmıştır. Diğer ekstraksiyon metotları ile kıyaslandığında ultrason destekli metodun en yüksek fenolik madde ekstraksiyonunu sağladığı gözlenmiştir.

Dhas, Selvaraj, Citarasu, Punitha, ve Babu (2015), *Tribulus terrestris* L., steroidal saponinler olarak bilinen bir dizi madde içerir. Bunlar; desgalaktotigonin veya gitonin, manogenin veya neomanogenin, F-gitonin veya desglukolanatigonin II, tribulosin, terrestrosin c, terrestrosin E, terrestrosin D'dir.

Hammi ve ark (2015), Tunus *Zizyphus lotus* meyvesinden yanıt yüzey yöntemi ile ultrason destekli antioksidan ekstraksiyonu optimizasyonu gerçekleştirdikleri çalışmada; etanol konsantrasyonu, sıcaklık, zaman ve çözücü: çözünen oranını bağımsız değişkenler olarak belirlemişlerdir. % 50 etanol derişimi, 25 dakika ekstraksiyon süresi, 63 °C sıcaklık, 67 mL/g çözücü katı materyal oranı *Zizyphus lotus* için optimum antioksidan ekstraksiyon şartı olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle *Aronia melanocarpa* atıklarından antosiyanin eldesi incelenmiştir.

D'Alessandro ve diğ (2014), Etanol konsantrasyonu, ultrason ve sıcaklık gücünün farklı sürelerde ekstraksiyon verimi üzerine etkileri incelenmiş bunun sonucunda sıcaklık ve etanol derişimindeki artışın toplam polifenol ekstraksiyonu üzerinde olumlu etkileri olduğunu tespit etmişlerdir. Polifenollerin ekstraksiyonunda ultrason desteğinin ekstraksiyon başında ve düşük sıcaklıkta daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Ancak antosiyaninlerin sıcaklık arttıkça degrede olmaları nedeniyle yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyon koşullarında antosiyanin veriminin azaldığını tespit etmişlerdir.

Acar ve ark (2013), Melek balığı (*Pterophyllum scalare*) yavrularının büyüme performansı ve yem değerlendirmesi üzerine *Tribulus terrestris* L. bitkisinin etkilerini araştırmıştır.

Araştırma bulgularına göre en iyispesifik büyüme oranı, en iyi ağırlık artışı ve en iyi yem değerlendirme oranı 600 mg/kg *Tribulus terrestris* yoğunluğa sahip yemlerle beslenen gruplarda elde edilmiştir. Sonuç olarak melek balığı yavrularının yemlerinde *Tribulus terrestris*' in büyüme performansı ve yaşama oranına herhangi bir olumsuz etkisi olmaksızın kilogramda 600 mg kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Zhou ve ark (2013), Lolilide (1), yengeç çimi (*Digitaria sanguinalis*) köklerinin bir ekstraktından izole edilmiştir. Bu bitki kuzey-doğu Çin' de bulunan Poaceae familyasına aittir. Bir yandan soya fasulyesi büyümesinin inhibisyonu üzerine alelokimik aktivite sergilerken, diğer yandan mısır sürgünlerinin büyümesini uyarmıştır.

Hossain ve ark (2012), Mercan köşk bitkisinden ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile antioksidan ekstraksiyonunun, katı-sıvı ekstraksiyonuna oranla daha verimli olduğunu tespit etmiştir. Bağımsız değişken olarak sonikasyon genliği (24.4–61.0 µm), ekstraksiyon sıcaklığı (15–35 °C) ve uygulama süresi (5–15 dak) seçilmiştir. Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasında 61 µm, 35 °C ve 15 dakika uygulanarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda toplam antioksidan kapasite, toplam fenolik madde, luteolin-7-O-

glukosit, rosmarinik asit, karnosol, kafeik asit, karnosik asit ve apigenin-7-O-glukosit değerleri en yüksek değerlerdir.

Zajdel ve ark (2012), Meksika'da *Penstemon campanulatus* (Cav.) Willd adlı Loliolide (1) de bulundu. Plantaginaceae familyasına aittir. Loliolide (1) 'in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı antibakteriyel etkinliği olduğu tespit edilmiştir.

Yılmaz ve ark (2012), *Oreochromis Mossambicus* balık türünde *Tribulus terrestris* L. kullanımının büyüme performansını arttırdığı bildirilmiştir.

Hunyadi ve ark (2012), Loliolide (1), Moraceae familyasının küçük yaprak döken ağaçlarının türü olan beyaz dutun (*Morus alba* L.) yapraklarında da bulunmuştur. Beyaz dut yaprakları kan şekeri seviyesini stabilize eder ve bu nedenle tip 2 diyabet tedavisi için kullanılabilir. Macaristan'dan araştırmacılar tarafından yapılan in vitro çalışmalar, baskın bileşeni (% 40.3) Loliolide (1) olan 50 mg / ml rosiglitazon dozu ile aynı etkiye sahip olduğunu gösteren 100 µg / ml dut yaprağı dozunun, diyabet tedavisinde kullanılan bir ilaç olduğunu bildirmiştir.

Kavitha ve Subramanian (2011), *Poecilia Lapitinna* balık türünde *Tribulus terrestris* L. kullanımının büyüme performansını arttırdığı bildirilmiştir.

Yang ve ark (2011), Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş kahverengi algler *Sargassum ringgoldianum* subsp. *Coreanum*'un iyi bir Loliolide (1) kaynağı olduğu kanıtlanmıştır, H₂O₂' nin etkisiyle üretilen serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreyi koruyan antioksidan özellikler sergilediği tespit edilmiştir.

Rasher ve ark (2011), Epiloliolide (2) ve dihidro türevi (3), *Votua* (Fiji) resiflerinde oluşan kırmızı alg *Galaxaura filamentleri* 'nden izole edilmiştir. Bu bileşikler alglerin büyümesi ve aynı zamanda mercan tükenmesi ile tropik resifler üzerindeki etkileri için yapılan testler sırasında bulundu. Bu laktonların mercan içindeki fotosentezi inhibe ettiği ve böylece ölümlerine neden olduğu, hatta nüfusun % 79' una kadar kısmının ölmesinin alg-mercan temasından sonraki 24 saat içinde olduğu bulunmuştur.

Biesaga (2011), Mısır bitkisinde bulunan flavonoidlerin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmesi sonucunda stabilitelerini karşılaştırmış ve ultrason destekli ekstraksiyonun diğer yöntemlere göre flavonoidlerin daha fazla degrades olmasına sebep olduğunu tespit etmiştir. İçerdikleri hidroksil grubu miktarı ile bağlantılı olarak kamferol, kuersetin, mirisetin ve ramnetin en fazla degrades olan flavonoidlerdir.

Mason ve Vinatoru (2011), Ultrasonun daha iyi kütle transferi ile ekstraksiyon verimini arttırmasında birbiri ile bağlantılı üç mekanizma söz konusudur.

Birincisi, katı yüzeye yakın asimetrik kabarcıkların çökmesi sonucu mikrojetlerin oluşumu ile bitkilerin dokusunun geçirgenliğini arttırarak hücre içi maddeleri serbest bırakır ve hücreler parçalanır.

İkincisi, kabarcıkların içe doğru patlamalarının olduğu bölgelerde bölgesel basınç ve sıcaklık artışından kaynaklı analitlerin çözünürlüğünü ve çözücülerin penetrasyonunu arttırır.

Üçüncüsü ise ultrason tarafından üretilen şok dalgalarının bir sonucu olarak difüzyonun artmasıdır. Ultrason destekli ekstraksiyon yardımıyla bitkisel kaynaklardan fenolik madde ekstraksiyonu konusunda yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Neergaard ve ark (2010), Lacton Loliolide (1); Sinir sistemi hastalıklarını tedavi etmek için halk tıbbında kullanılan, Güney Afrika kökenli bir bitki olan *Mondia beyazının* kurutulmuş yapraklarının ekstraktında da bulundu. Buna ek olarak yerel kabileler tarafından, bitkinin kurumuş köklerinin afrodisyak olduğuna inanılmaktadır. İn vitro çalışmalarda, Loliolide (1) 'in bir serotonin taşıyıcı olarak yüksek afiniteye sahip olduğu ve böylece bir antidepresan özelliği gösterdiği bulunmuştur. Antidepresanlar için tipik olan azotlu bir bileşik olmadığından, etki mekanizmasının şimdiye kadar bilinenlerden farklı olabileceği bildirilmiştir.

Virot ve ark (2010), Elma posasından fenolik maddeleri ekstrakte etmişlerdir. Çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon uygulaması yaptıklarında klasik ekstraksiyona oranla % 20'den fazla verim artışı sağlandıklarını bildirmişlerdir.

Pan ve ark (2009), Loliolide (1) Kudüs'te enginar bitkisinde (*Helianthus tuberosus* L.) bulunmuştur, ki bunlar dünya genelinde yenilebilir. Aynı zamanda yem ve dekoratif amaçlı kullanılan bir bitkidir. ABD' nin Ohio eyaletinde ve Mississippi Nehri vadisinde yetişen bu bitkiden izole edilmiş bileşiğin patojenlere karşı bitki savunmasında yer alan metabolitlerin birikimini hafifçe (% 15 - 20 %) uyardığı bulunmuştur.

Elkhayat (2009), Mısır'da yetişen yaygın sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.) toz köklerinin başka bir Loliolide kaynağı olduğu kanıtlanmıştır. Sowthistle, yaygın olarak bulunup yabani ot olarak kabul edilen ve Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika'da yetişen Asteraceae familyasından gelmektedir. Yapılan in vitro testler Loliolide' in (1), fare lenfoma hücrelerine (L5187Y' ye) (ED50 = 4.7 mg / ml) yüksek derecede sitotoksik olduğunu ve *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Neisseria gonorrhoeae* suşlarına karşı antibakteriyel aktivite sergilediğini bildirmişlerdir.

Erosa-Rejon ve ark (2009), Loliolide kedi otu yaprakları ekstraktında da bulunmuştur (*Heliotropium angiospermum*) ki bu güneydoğu Mexica'da bulunan hodangiller ailesine ait bir çalı türüdür. Bu madde damar açıcı ajan olarak kullanılmıştır. Yara iyileşmesini hızlandırmakta ve ayrıca dizanteri ve ishal tedavisinde uygulanmaktadır.

Giray ve ark (2008), Hidrodestilasyon (HD), sub-kritik su ekstraksiyonu (SbkH₂OE) ve organik çözücü kullanarak ultrasonik banyo ekstraksiyonu (USE) ile elde edilen *Lavandula stoechas* (lavanta) çiçeklerinin uçucu ekstraktının kompozisyonunu gaz kromatografisi-mass spektrometresi (GC-MS) ile değerlendirmişlerdir. SbkH₂OE ekstraktında 124 bileşen belirlenirken, HD ve USE ekstraktlarına sırasıyla 94 ve 65 sinyal tespit

etmişlerdir. Bu üç ekstraktda ana bileşenleri; fenchon, kamfor, mirtenil acetat, mirtenol ve 1,8-sineol olarak belirlemişlerdir. Toplam monoterpen hidrokarbonları HD ve USE ekstraktlarında sbkH₂OE ekstraktlarına göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. SbkH₂OE ekstraktının yağın güzel kokusuna katkısı olan hafif oksijenli bileşenleri yüksek konsantrasyonlarda içerdiğini belirlemişlerdir. Ağır oksijenli bileşenlerin de HD ve USE ekstraktlarına (%3,19 ve %4,78) göre SbkH₂OE ekstraksiyonunda (%9,90) yüksek bollukta olduğunu bildirmişlerdir. SbkH₂OE’ da ekstraksiyon yüzdesine sıcaklığın etkisini incelemişler ve sıcaklığın artışı ile yağ yüzdesinin arttığını, ancak 1,8 sineol, kamfor ve fenchon gibi daha polar bileşenlere doğru bir azalış olduğunu gözlemlemişlerdir. Kinetik çalışmalarla SbkH₂OE’nun geleneksel yöntemlerden daha temiz ve hızlı olduğunu bildirmişlerdir. Uçucu bileşenlerin çoğunun 15 dakikada ekstrakte edildiğini rapor etmişlerdir.

Percot ve ark (2008), Deniz canlısı olan bazı alglerle yapılan çalışmada Loliolide; 7’si kırmızı 5’i kahverengi 1 yeşil toplam 13 deniz alginde tespit edilmiştir. Loliolide miktarları azalan sırayla, kırmızı alglerden *Phyllophora crispera*’da 4.35 mg/g, *Boergeseniella fruticulosa*’da 0.55 mg/g, *Polysiphonia morrowii* ‘da 0.43 mg/g, *Gelidium crinale* ‘de 0.32 mg/g, *Hypnea musciformis*’de 0.18 mg/g, *Corallina granifera*’da 0.16 mg/g, *Halymenia floresii* 0.14 mg/g, kahverengi alglerden *Taonia atomaria* ‘da 4.83 mg/g, *Cutleria multifida*’da 4.43 mg/g, *Dictyota dichotoma*’da 0.44 mg/g, *Cystoseira mediterranea*’da 0.36 mg/g, *Sporochnus pedunculatus*’da 0.18 mg/g, yeşil alg olan *Enteromorpha compressa*’da da 1.76 mg/g oranında bulunmuştur. Bu sonuçları etanol ve asetonla 4 saat geri akış altında ekstrakte ederek ve buna ek bazı işlemler yaparak elde etmişlerdir.

Gauthaman ve Gereson (2008), *Tribulus terrestris* L. ve ürünleri yapısındaki saponinlerden dolayı testosteron hormonunun salgılanmasını tetikleyici etkisiyle bilinmekte, bununla beraber insanlar tarafından kasların gelişmesinde kullanılmaktadır.

Çek ve ark (2007a), *Poecilia reticulata* balık türünde *Tribulus terrestris* L. kullanımının büyüme performansını arttırdığı bildirilmiştir.

Çek ve ark (2007b), *Cichlasoma Nigrofasciatum* balık türünde *Tribulus terrestris* L. kullanımının büyüme performansını arttırdığı bildirilmiştir.

Turan ve Çek (2007), *Clarias Gariepunus* balık türünde *Tribulus terrestris* L. kullanımının büyüme performansını arttırdığı bildirilmiştir.

Çek,Turan ve Atik (2007a), Spermatogenez yapılmış ve tedavi edilmeyen progeniden daha iyi bir büyüme oranına sahip olmuştur.

J.D. Zhang ve ark (2006), *Tribulus terrestris* L. bitkisinin antifungal aktivitelerini ve etki mekanizmalarını geniş bir şekilde araştırmışlardır. Bu bitkiden izole edilmiş ve tanımlanmış 8 adet steroid yapısındaki glikozidlerin; beş önemli durumdaki hastalık yapıcı insan mayasına karşı inaktif edici özelliğini tespit etmişlerdir.

Zhao ve ark (2006), Yüksek yoğunluklu ultrason uygulaması ile ekstrakte ettikleri bir çeşit karetenoid olan (all-E)-astaksantin tanınlanamayan renksiz bileşenlere degrede oldukları tespit edilmiş ve artan ekstraksiyon süresi ve ultrason gücünün degridasyonu arttırdığı tespit edilmiştir.

Neychev ve Mitev (2005), *Tribulus terrestris* L.'in testosteron veya testosteron prekürsör düzeylerini önemli ölçüde artıran androjen metabolizmasını etkilediğine inanılmaktadır.

Kistanova, Zlatev, Karcheva ve Kolev (2005), *Tribulus terrestris* L. preparatının erkek insan ve deney hayvanları üzerindeki etkileri hakkında çalışmalar yapılmıştır.

O.A.Phillips ve ark (2005), *Tribulus terrestris* L. bitkisinin metanol ve su ile ekstraksiyonlarını elde etmişler ve fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda KCl ile arttırılan kan basıncına karşı bu bitkinin su ve metanol ekstraktlarının doza bağlı oranlarda damar genişletici etkisi (vasodilator) ile kan basıncını düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Su ile hazırlanan ekstraktın metanol ile hazırlanan ekstrakta göre daha fazla oranda damar gevşetici etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir.

Ragasa ve ark (2005), Filipin ağacı *Pterocarpus indicus*' un kurutulmuş yapraklarının ekstraktında Loliolide (1) de tespit edilmiştir. Bu ağacın yaprakları, gövdesi, ağaç kabuğu ve köklerinden elde edilen özler, yerel halk arasında ülser, ishal ve dizanteri gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır. Loliolide (1)' in etkilerinin test edilmesiyle, bu bileşiğin, *Pseudomonasa eruginosa* ve *Escherichia coli* suşlarına karşı düşük bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*' e karşı orta düzeyde antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Ali ve ark (2003), Deve çökerten bitkisinin meyveleri ve yapraklarının bir arada bulunduğu halinin sulu ekstraktını elde etmişlerdir. Suyu süzülerek uzaklaştırıldıktan sonra kurutulmuştur ve daha sonra serum fizyolojik ile istenen konsantrasyonlara getirilmiştir. Hazırlanan ekstraktların farelere ağız yolu ile verilmesi sonucu kontrol gurubuyla karşılaştırıldığında anlamlı oranlarda diüretik (idrar artırıcı) etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir.

Gauthaman, Adaikan ve Prasad (2002), *Tribulus terrestris*'in libido cinsini güçlendirdiği, testosteron ve LH düzeylerini artırdığı, atletik performansı artırdığı ve spermatozoanın sayısını ve hareketliliğini artırdığı bildirilmiştir.

Ganzer, Bedir, ve Khan (2001), *Tribulus terrestris*' de saponin, testosteron düzeyleri üzerindeki etkisinden sorumlu olduğu düşünülen protodiosin olarak bilinir.

Bucci (2000), Gokshura olarak da adlandırılan *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) Bulgaristan, Doğu Avrupa, Uzak Doğu, Çin ve Hindistan'da cinsel eksiklikleri tedavi etmek için kullanılan bir tıbbi bitkidir.

Wu ve ark (1999), *Tribulus terrestris* L. bitkisinin meyvelerinden elde edilen ekstraktların içeriğinden bilinen 10 tane bileşenin dışında 25R -spirost-4-en-3,12-dione, tribulusterine ve terretribisamide isimli üç tane yeni bileşen izole etmişlerdir. Bu bileşenlerin tayinini spektral analiz ile yapmışlardır.

Ragasa ve ark (1997), Filipin çalısı *Malachra fasciata*' da lakton Loliolide (1) de bulunmuştur. Malvaceae familyasına ait bu çalı, kanser önleyici özellikleri

ile de bilinmektedir. Bu nedenle, bu bitkinin antimutagenik özelliklerini araştırmak için testler yapılmıştır. Bu bitkide meydana gelen ve 14,8 mg / kg'lık bir dozda farelere verilen Loliolide (1) 'in mitomisin C tarafından indüklenen mikro nükleer polikromatik eritrosit sayısını % 64,4 oranında azalttığı bulunmuştur. Bu durum antimutagen olduğunu gösterir .

Hiraga ve ark (1997), Loliolide (1), Japonya' da meydana gelen at kuyruğu *Equisetu marvense'* nin taze yaprak özünden izole edilmiştir ve 250 ppm' lik bileşiğin, marul tohumlarının çimlenmesini tamamen engellediğini tespit etmişlerdir.

Xu ve ark (1997), *Tribulus terrestris L.* bitkisinin içerikleri üzerine yapılan çalışmalarda (5 α , 25R)- spirostan-3,6,12-trione ve 25R-spirostan-4-ene-3,6,12-trione isimli iki yeni steroidal sapogenin izole etmişlerdir. Bunun yanında 5 tane de bilinen steroidal sapogenin izole etmişlerdir. Yeni sapogeninlerin yapılarını spektral teknik kullanarak belirlemişlerdir.

Pettit ve ark (1980), Loliolide (1), Hint Okyanusunda yaşayan *Opistho branch* cinsinin yumuşakçalarından da çıkarılmıştır. Yapılan testler, bu bileşiğin, insan nazofarengeal karsinoma KB (ED50 = 10 ug / ml) ve murin lenfositik lösemi P-388 (ED50 = 3,5-22 ug / ml) tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir.

Kuniyoshi (1985), Loliolide'in yanısıra denizlerde yaşayan kahverengi alg olan *Sargassum Crassifolium'*da stereoisomeri olan Epiloliolide' in bulunduğu gösterilmiştir.

Okunade ve Wiemer (1985), Lakton Loliolide (1), Kosta Rika'da meydana gelen bir bitki olan *Xanthoxylum setulosum* P. Wilson'un kurutulmuş yapraklarının bir ekstraktından izole edilmiştir. Bu bitki zararlılara karşı bitki koruma arayışı için de uygun kabul edilmiştir. Öyle ki bitkinin, karıncaları (*Atta cephalotes*) (Attini) 'yi caydırdığı bilinmektedir. Test sırasında yüzlerce karınca tutsak kolonisi için tercih edilen Loliolide (1) kullanılmıştır. Teste göre karıncaların, 6,8 mg / g konsantrasyonunda Loliolide çözeltisi ile doyurulmuş

çavdar gevrekleri ve sadece temiz çözücü ile ıslatılmış buğday gevrekleri arasından seçim yapmaları gerekiyordu. Sonuçlar, karıncaların kesinlikle Loliolide çözeltisi olmayan tahıl seçtiklerini göstermiştir. Yazarlar bu sonuçların; Loliolide'in, bu karıncalar için aranan karınca itici olduğunun düşünülebileceğini bildirmiştir.

Rocca ve ark (1983), Loliolide'in kırmızı karıncaların kraliçesi olan *Solenopsis invicta*'nın vücudunda keşfedilmiştir ve bunun kraliçenin görevlileri itaate zorlamak için kullandığı bir feromon türü olduğu belirtilmiştir.

Fujita ve ark (1972), Bazı japon araştırmacılar kınagiller familyasına mensup bir çiçek türü olan kırmızı kan çiçeğinin (*Lythrum salicaria*) bileşiminde Loliolide bulmuştur ve bu hem bilinen hem de uzun yıllardır ilaçlarda kullanılan bir maddedir. Bu ilaçların damrar açıcı ve anti-inflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir.

Hodges ve Porte (1964), Loliolide'in ilk kez İngiltere'de *Lolium perenne* çiminde tespit edildiği bildirilmiştir.

3. MATERYAL-METOD

3.1. Materyal

Tribulus terrestris L. bitkisi yerel satıcılardan temin edilmiştir. Çukurova Üniversitesi F.E.F Biyoloji Bölümü Botanik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Halil ÇAKAN tarafından *Tribulus terrestris* L. bitkisi olduğu tespit edilmiştir.

3.1.1. Kimyasallar

tert- Butil Metil Eter, etanol, H₂O (Deiyonize Su), CH₂CL₂ (Dikloro Metan), NaCl (Sodyum Klorür), Na₂SO₄ (Sodyum Sülfat), H₂SO₄ (Sülfürik Asit), NaOH (Sodyum Hidroksit), H₃BO₃ (Borik Asit)

3.2. Metod

3.2.1. Sub-kritik Su Ekstraksiyonu (sbkH₂OE) Yöntemiyle Deve Çökerten Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Ekstraksiyon kolonu 1.0g bitki örneği ile doldurulduktan sonra etüv içine yerleştirilmiştir. Bir HPLC pompası yardımıyla 80 atm basınçta gazı giderilmiş deiyonize su, 2 ml/dk akış hızında 125 °C sıcaklıktaki hücreye gönderilmiştir. 30 dk süreyle statik ekstraksiyon ve ardından 20 dk dinamik ekstraksiyonla ekstrakt toplanmıştır. Uçucu yağlar bir defa 10 ml diklorometanla sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak alınmıştır. Ayrılmayı kolaylaştırmak için emülsiyona yaklaşık 1g NaCl ilave edilmiş daha sonra içerisinde kalan su yeterince Na₂SO₄ ilavesi ile tutulmuştur.

GC-MS analizleri yapılmak üzere vial içerisine alınan örneğin basınçlı azot gazı altında çözücüsü uzaklaştırılmıştır.

Çalışma koşulları Çizelge (3.1)'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sub ve süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon için çalışma koşulları

Çözücü/Bitki	T(°C)	P(atm)	Akış Hızı (ml/dak)	Zaman(dak)
SkH ₂ O/Deve Çökerten	125	80	2	30 (statik), 20 (dinamik)
SkETOH/DeveÇökerten	125	80	2	30(statik), 20 (dinamik)



Şekil 3.1. Sub ve süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemi (a: ISCO pompa; b: HPLC pompası; c: Fırın; d: Ekstraksiyon hücresi)

3.2.2. Sub-kritik Etanol Ekstraksiyonu (sbkEtOHE) Yöntemiyle Deve Çökerten Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Ekstraksiyon kolonu 1.0g bitki örneği ile doldurulduktan sonra etüv içine yerleştirilmiştir. Çizelge (3.1.)’de verildiği şekilde 80 atm basınç ve 125°C sıcaklıktaki çalışma koşullarında, bir HPLC pompası yardımıyla gazı giderilmiş etanol 2 ml/dk akış hızında hücreye gönderilmiştir. 30 dk süreyle statik ekstraksiyon ve ardından 20 dk dinamik ekstraksiyonla ekstrakt toplanmıştır. Uçucu yağlar bir kez 10 ml diklorometan ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılarak alınmıştır. Ayırma işlemini kolaylaştırmak amacıyla emülsiyona yaklaşık 1g NaCl ilave edilmiş, daha sonra içerisinde kalan su yeterince Na₂SO₄ ilavesi ile tutulmuştur.

GC-MS analizleri yapılmak üzere vial içerisine alınan örneğin basınçlı azot gazı altında çözücüsü uzaklaştırılmıştır.

3.2.3. Ultrasonik Destekli Deve Çökerten Bitki Ekstraksiyonu(USE)

Bir Lab-Line Instruments Inc. 9314-1 model ultrasonik banyoda 1 g. bitki örneği için gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık 25°C (ortam sıcaklığı) olarak uygulanmış ve ekstraksiyon 50 mL hacminde balonda 30 mL *tert*-butil metil eter kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon süresi 2 saat olacak şekilde ayarlanmıştır. Ekstraksiyon sonunda 2 örnek ekstrakt ve artık 10000 rpm de 30 dk santrifüj edildikten sonra ekstraktlar süzülerek alınmıştır. Azot gazı ile kurutma işlemi yapılarak GC-MS analizleri yapılmak üzere 1,5 ml' lik viallere alınmıştır.

3.2.4. Maserasyon (Islama) Yöntemi ile Ekstraksiyon

1g. Deve Çökereten (*Tribulus terrestris L.*) bitkisi tartılmıştır ve 50 ml'lik tüplere alınmıştır. Çözücü olarak üzerine 30 ml *tert*-butil metil eter eklenerek 10 gün bekletilmiştir. Azot gazı ile 1,5 ml kuruluğa kadar kurutulup GC-MS analizi yapılmak üzere viallere alınmıştır. Bu işlem 3 tekrar şeklinde yapılmıştır.

3.2.5. Kjeldahl Yöntemi ile Toplam Azot (Protein) Tayini

Yakma ünitesine 1g. *Tribulus terrestris L.* bitkisi ve üzerine 10 ml H₂SO₄(der) eklenip 1 saat 420 °C'de yakma yapılmıştır. Soğuduktan sonra azot protein tayin cihazına takılmıştır. Cihaz üzerine 50 ml NaOH ve 50 ml H₂O ilave ettikten sonra açığa çıkan amonyak içerisinde 50 ml % 4' lük Borik Asit olan erlene destillenmiştir. Erlenekteki Borik Aside tutunmuş Amonyak 0,1025 M H₂SO₄ ile titre edilerek azot miktarı belirlenmiştir.

Toplam N miktarı =

$$\frac{0,1025 \text{ mol } H_2SO_4}{1L} * \frac{1L}{1000ml} * \frac{X \text{ ml } H_2SO_4}{1} * \frac{14g \text{ N}}{1 \text{ mol N}} * \frac{1 \text{ mol N}}{1 \text{ mol NH}_3} * \frac{2 \text{ mol NH}_3}{1 \text{ mol } H_2SO_4}$$

Sırasıyla harcanan Xml H₂SO₄ ; 7,63ml , 7,65ml , 9,28ml , 8,85ml , 10,01ml olarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ N içeren bileşik miktarı} = \frac{X \text{ g N içeren bileşik}}{1g \text{ bitki}} * 100$$

% N içeren bileşik miktarı sırasıyla ; % 2,18, % 2,19, % 2,65, % 2,53, % 2,86 olarak tespit edilmiştir.

Azotlu bitkisel besinler için uygun katsayı olan 5,83 ile çarpılacak olursa sırasıyla % protein miktarı ; %12,72 , %12,75 , %15,47 , %14,75 , %16,68 olarak bulunacaktır. Sonuçta *Tribulus terrestris* L. bitkisinde % protein miktarı deneylerin ortalama değeri alınarak yaklaşık olarak %14,47 ± 1,73 tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Kjeldahl Metodu Azot Tayini Cihazı (Nötralizasyon ve Destilasyon Aşaması)

3.2.6. Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Test edilecek mikroorganizmaların (*Candida albicans*) saf kültürü Malt Extract Broth' a inoküle edilmiştir. 30 °C' de 24 saat inkübe edilerek üretilen saf kültür serum fizyolojik kullanılarak, 0.5 McFarland bulanıklığına seyreltilmiştir. (0.5 McFarland *Candida* spp. için $1-5 \times 10^6$ CFU/ml' ye karşılık gelen yoğunluğu ifade eder). PDA (Potato Dextrose Agar) besiyeri petri kutularına 4-6 mm kalınlık olacak şekilde dökülmüştür. Seyreltilerek hazırlanan sıvı kültürden 1 ml ekim, dökme plak yöntemiyle PDA besiyerine yapılmıştır. Petri kutusu yavaş hareketlerle çalkalanarak mikorganizmanın homojen dağılımı sağlanmıştır. Besi yeri donduktan sonra agar üzerinde 10 mm çapında 4 adet kuyucuk açılmıştır. (kuyucuklar

arasında en az 2-2.5 cm olmalı, petri kenarına uzaklığı da en az 1.5 cm olmalıdır). Kuyucuklara sırasıyla 50, 100,150 ve 200 µl örnek steril pipet yardımıyla eklenmiştir. Örnek; Sub-kritik su ekstraksiyonu (sbkH₂O₂) ile hazırlanmış *Tribulus terrestris* L. bitkisi ekstraktından oluşmaktadır. Bu deneyde, *tert*- butil metil eter ve etanol mikroorganizmalara zarar verdiği ve doğru değerlendirme yapılmasına engel olduğu için, *tert*- butil metil eter ile USE ekstraktı ve sub-kritik EtOH ekstraktı kullanılmamıştır. 18 -24 saatlik inkübasyondan (30° C' de) sonra değerlendirmeler Şekil 3.3' de görüldüğü gibi standartla kıyaslayarak yapılmıştır (Bioanalyse limited zone table). Standartta 15mm esas alınmıştır.



Şekil 3.3. *Candida albicans* ' a, *Tribulus terrestris* L.' in sulu ekstraktının uygulaması

3.2.7. GC-MS

Uçucu bileşen analizleri Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak HP - 5MS (30 m uzunluk x 0,25 mm iç çaplı x 0,25 µm film kalınlığı, %5 phenyl methyl poly siloxane) kullanılmıştır. Uygulanan fırın sıcaklık programı; 40°C de başlayıp, 5 °C / dk artışlarla 240 °C' e çıkarak ve bu sıcaklıkta 10 dk bekleme şeklindedir. 1:20 oranında split olarak çalışılmıştır. Kütle taraması 50-600 m/z aralığında olup, bileşen tanımlama NIST kütüphanesi ile yapılmıştır.





4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada farklı ekstraksiyon yöntemlerinin, tıbbi aromatik bir bitki olan Deve Çökerten (*Tribulus terrestris L.*) bitkisinden izole edilen bileşenlerin kimyasal kompozisyonları üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca bitkinin % protein miktarı ve biyolojik aktivitesi araştırılmıştır. Uygulanan ekstraksiyon metodları sbkH₂OE, SbkETOH, USE, maserasyon işlemleridir.

4.1. Bitkinin Ekstraksiyon Yüzdeleri Ve Kimyasal Kompozisyonları Bulguları

Sub-kritik ekstraksiyon metodlarında kullanılan koşullar literatürde yer alan değerlendirmelere göre belirlenmiş olup (Çizelge 3.1.) 'de özetlenmiştir (Giray ve ark, 2008). Buna göre sub-kritik H₂OE 125°C sıcaklık, 80 atm basınç ve 2 ml akış hızı ile 30 dk. statik 20 dk. dinamik koşullarda yapılmıştır. Sub-kritik su ekstraksiyonu 1g. *Tribulus terrestris L.* bitkisi ile yapılmıştır. Sub-kritik H₂O ile yapılan ekstraksiyon çalışmasından elde edilen ekstraktların GC-MS ile incelenmesi sonucunda 38 adet sinyal tespit edilmiştir. Bunlardan sadece göreceli bolluğu 0,001' den büyük olanlara ve NIST kütüphanesi tarafından adı tespit edilebilenlere yer verilmiştir. Sub-kritik H₂O ekstraktında % 10,75 oranında 2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(R)-, % 6,34 Octadecamethyl, % 3,50 oranında Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-, % 2,94 oranında (E)-4-(3-Hydroxyprop – 1 en-1-yl)-2-methoxy phenol, %1,86 oranında 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one (Lololide) tespit edilmiştir.

Deve Çökerten bitkisi ile yapılan sub-kritik ETOH ekstraksiyonu da 125°C sıcaklık, 80 atm basınç ve 2 ml akış hızı ile 30 dk. statik 20 dk. dinamik koşullarda yapılmıştır. Sub-kritik etanol ekstraksiyonu 1g. *Tribulus terrestris L.* bitkisi ile yapılmıştır. Sub-kritik ETOH ile yapılan ekstraksiyon çalışmasından elde edilen ekstraktların GC-MS ile incelenmesi sonucunda 8 adet sinyal tespit edilmiştir. Bunlardan sadece göreceli bolluğu 0,001' den büyük olanlara ve NIST kütüphanesi

tarafından adı tespit edilebilenlere yer verilmiştir. SbkEtOH ekstraksiyonuna göre Loliolide gözlemlenmemiştir. Tespit edilen moleküller % 39,30 ile : 2-Myristynoyl pantetheine, % 2,45 ile Tetraacetyl-d-xylonic nitrile, % 1,78 ile Benzene, 1,1'-sulfonylbis[4-chloro-, % 44,43 ile Dodecanal' dir.

USE ile yapılan çalışmaya göre elde edilen ekstraktların GC-MS ile incelenmesi sonucunda 25 adet sinyal tespit edilmiştir ve göreceli bolluğu 0,001' den büyük olanlara ve NIST kütüphanesi tarafından adı tespit edilebilenlere yer verilmiştir. USE 1g. *Tribulus terrestris* L. bitkisi ile yapılmıştır. USE'a göre ekstraktta % 50,30 oranında 9-Octadecenamide (Oleamide), % 18,80 oranında n-Hexadecmoic acid, % 14,81 oranında Linolenic acid, % 2,07 oranında 17-Pentatriacontene, % 1,75 oranında Dibutyl phthalate, % 1,67 oranında Phytol, % 1,49 oranında 2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(R)-, % 1,01 oranında Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-, % 0,75 oranında Nononal, % 0,59 oranında 2- Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-, % 0,50 Benzaldehyde,2-chloro-, % 0,50 2-Myristynoyl pantetheine, % 0,29 oranında Docosahexaenoic acid, 1,2,3-propanetriylester tespit edilmiştir.

Maserasyon ile yapılan çalışmaya göre elde edilen ekstraktların GC-MS ile incelenmesi sonucunda 42 adet sinyal tespit edilmiştir ve göreceli bolluğu 0,001' den büyük olanlara ve NIST kütüphanesi tarafından adı tespit edilebilenlere yer verilmiştir. Maserasyon 1g. *Tribulus terrestris* L. bitkisi ile yapılmıştır. Maserasyona göre % 46,19 oranında Octadecanoic acid, % 13,83 oranında 9,12,15-Octodecatienoic acid, (Z,Z,Z), % 10,75 oranında n-Hexadecanoic acid , % 6,62 oranında 9-Octadecenamide (Oleamide), % 3,44 oranında Mono (2-ethylhexyl) phthalate, % 2,31 oranında Pentadecane, % 2,31 oranında Nonadecane, % 1,95 oranında Heneicosane, % 1,56 oranında Phytol, % 1,54 oranında Octadecanoic acid, 2hydroxy – 1,3, -propanediyl ester, % 1,1 oranında 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen -1-ol, % 0,61 oranında 2,5-Octadecadiyonicacid, methylester, % 0,37 oranında Ethanol,2-(-9-)octadecenyloxy)-,(Z)-, % 0,22 oranında 1-Octanol,2-butyl,

% 0,20 oranında 2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(R)-molekülleri tespit edilmiştir.

Sub-kritik H₂OE, Sub-kritik EtOHE, USE, maserasyon metodları ile elde edilen ekstraktların kimyasal kompozisyonları ve göreceli miktarları Çizelge 4.1’ de verilmiştir. Ekstraktlara ait GC-MS kromatogramları ‘Ekler’ bölümünde verilmiştir.

Ekstraksiyon metodlarına göre sub-kritik H₂OE, USE ve maserasyonda ekstraktın kimyasal kompozisyonu açısından aynı olan 2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-,(R)- (Loliolide türevi) molekülünü değerlendirdiğimizde sub-kritik H₂OE’ da % 10,75, USE’ da % 1,49, maserasyonda % 0,20 oranlarında tespit edilmiştir. Sub-kritik EtOHE’ na göre ise bu moleküle rastlanılmamıştır. Bu duruma göre bu molekül açısından sub-kritik H₂OE en etkin yöntem olmaktadır. Daha sonra USE’ un 2. ve maserasyonun 3. etkin yöntem olduğu görülmektedir.

USE ve maserasyon yöntemiyle yapılan ekstraksiyonlara göre 9-Octadecenamide (Oleamide), USE ekstraktında % 50,30 oranında maserasyon ekstraktında % 6,62 oranında tespit edilmiştir. Ayrıca n-Hexadecanoic acid, USE ekstraktında % 18,80 oranında maserasyon ekstraktında % 10,75 oranında tespit edilmiştir. Bu iki yöntemi kendi aralarında kıyasladığımızda bu moleküller açısından USE’ un daha etkin bir yöntem olduğu görülmektedir.

Sub-kritik EtOH ve USE yöntemiyle yapılan ekstraksiyonlara göre 2-Myristynoyl pantetheine, Sub-kritik EtOH ekstraktında % 39,30 oranında, USE ekstraktında % 0,50 oranında tespit edilmiştir. Bu durumda bu bileşik açısından Sub-kritik EtOH ekstraksiyonu USE’a göre daha etkin bir yöntem olmaktadır.

Buna ek olarak Çizelge 4.1 den de görüleceği gibi monoterpenoid türevi 11 carbon atomlu hydroxylactone (Loliolide) 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one % 1,86 oranında ve sadece Sub-kritik H₂OE’ da tespit edilmiştir.

Çizelge 4 1. (*Tribulus Terrestris L.*) Deve Çökerten Ekstraksiyon metodlarına göre kimyasal kompozisyonu

Kimyasal Bileşik	% Göreceli Dağılım (1g. Bitki)			
	sbkH ₂ O	sbkEtOHE	USE	Maserasyon
Octadecane, 6-methyl-	0,94	—	—	—
2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)- (Loliolide türevi)	10,75	—	1,49	0,20
(E)-4-(3-Hydroxyprop – 1-en-1-yl)-2-methoxy phenol	2,94	—	—	—
6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetra hydro benzafuran-2(4H)-one (Loliolide)	1,86	—	—	—
Octadecamethyl	6,34	—	—	—
Octadecane, 3-ethyl-5-(2- ethylbutyl)-	3,50	—	1,01	—
2-Myristynoyl pantetheine	—	39,30	0,50	—
Dadeconal	—	44,43	—	—
Tetraacetyl-d-xylonic nitrile	—	2,45	—	—
Benzene,1,1'-sulfonylbis(4-chloro-	—	1,78	—	—
Dacosahexaenoic acid, 1,2,3-propanetriylester	—	—	0,29	—
Nononal	—	—	0,75	—
Benzaldehyde,2-chloro-	—	—	0,50	—
2- Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	—	—	0,59	—
Dibutyl phthalate	—	—	1,75	—
n-Hexadecmoic acid	—	—	18,80	10,75
Phytol	—	—	1,67	1.56
Linolenic acid	—	—	14,81	—

17-Pentatriacontene	—	—	2,07	—
9-Octadecenamide (Oleamide)	—	—	50,30	6,62
1-Octanol,2-butyl-	—	—	—	0,22
Pentadecane	—	—	—	2,31
3,7,11,15-Tetramethyl-2- hexadecen -1-ol	—	—	—	1,02
2,5-Octadecadiyonicasid, methylester	—	—	—	0,60
Ethanol,2-(-9-)octadecenyloxy)-, (Z)-	—	—	—	0,37
Nonadecane	—	—	—	2,31
Heneicosane	—	—	—	1,95
9,12,15-Octodecatrienoic acid, (Z,Z,Z)	—	—	—	13,83
Octodecanoic acid	—	—	—	46,18
Octadecanoic acid, 2hydroxy – 1,3, -propanediyl ester	—	—	—	1,54
Mono (2-ethylhexyl) phthalate	—	—	—	3,44

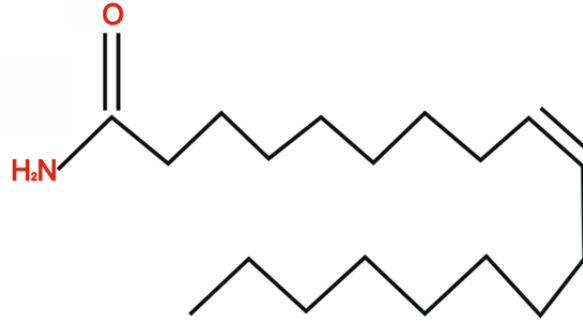
Sub-kritik H₂OE yöntemi ile elde edilen ekstraktın uçucu yağ kalitesinin diğer yöntemlerle elde edilenlerden daha iyi olması, ekstraksiyonun hızlı bir şekilde tamamlanması, diğer ekstraksiyon metodlarına göre düşük sıcaklıklarda çalışmaya elverişli olması ve sıcaklıkla bozunan bileşenlerin kayıplarının önlenmesi, diğer ekstraksiyon metodlarına oranla düşük maliyetli olması, basit olması ve çevresel açıdan kirlilik üretmemesi, kullanımı kolay olması gibi özellikleri ile diğer yöntemlere göre daha kullanışlı alternatif bir yöntem olmaktadır.

Farklı ekstraksiyon metodlarının kimyasal kompozisyonları ve yüzdelерinden de anlaşılacağı gibi *Tribulus terrestris* L. bitkisi ekstrakt

içeriklerinin 1g. *Tribulus terrestris* L. ekstraktları için göreceli dağılımı seçilen ekstraksiyon metoduna göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Ayrıca *tert*- butil metil eter ile yapılan USE ve maserasyon yöntemlerine göre tespit edilen -9-Octadekenamid kıymetli bir bileşendir.

Literatüre göre (Z) -9-Octadekenamid veya Oleamide'in, skopolamin kaynaklı hafıza kaybına karşı koruyucu bir ajan olduğu tespit edilmiştir ve Alzheimer'in in vitro test edilen hastalığına karşı yeterli miktarda fare ile yapılan çalışmada yararlı bir kemopreventif ajan olduğu görülmüştür. Bu durum bu molekülü insanlar için önemli bir hale getirmektedir (Noikotra ve ark 2017).

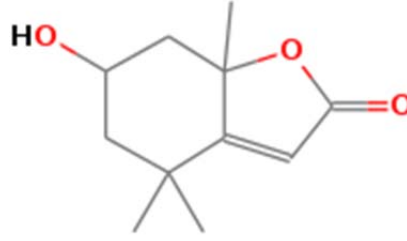


Şekil 4.1. 9-Octadecenamide,(Z) C₁₅H₃₅NO

(Z) -9-Octadekenamid, daha önce *Artocarpus* özütlerinde tespit edilen bir fitokimyasaldır ve birçok önemli fitokimyasal ihtiva etmektedir. (Noikotra ve ark 2018)

Artocarpus'un familyası dutgillerdir (Moraceae). 15-20 m boyunda, tek evcikli, büyük meyveli, kalın gövdeli bir ağaçtır, tropik bir bitkidir ve Asya adalarında (Sunda adalarında) yetişir. Ana vatanı da Pasifik adalarıdır. Yaprakları düz kenarlı ve küçüktür. Çiçek örtü yaprakları ve çiçek eksenini yenen bölümleridir. Ekmek ağacı olarak bilinir ve meyvesi nişasta açısından zengindir. Yetiştirildiği yerlerde yerli halkın başlıca gıdasını temsil eder. Ananasa benzeyen meyveleri 1-2 kg ağırlığında olabilir ve beyaz etli olup biraz unludur.

Bu çalışmada Loliolide(1) ve Loliolide' in bir türevi tespit edilmiştir. Loliolide monoterpeneoidlerin yaygın temsilcilerinden olup basit lakton bileşigidir ve 11 karbon atomundan oluşmaktadır.



Şekil 4.2. 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one (Loliolide)

Molekül kapalı formülü $C_{11}H_{16}O_3$, molekül ağırlığı 196.2429 g/mol' dür.

Loliolide, ilk kez 1964 yılında İngiliz çimi Ryegrass *Lolium perenne*' de tanımlanmıştır (Honges ve ark 1964).

Kırmızı karınca *Solenopsis invicta*' nın kraliçelerinin gövdelerinde keşfedilmiştir. Kraliçenin, görevlilerine itaat etmeyi zorunlu kılan feromonlardan biri olduğu tespit edilmiştir (Roca ve ark 1983).

Loliolide' nin, geniş bir biyolojik aktivite aralığı gösterdiği bildirilmiştir (Winska ve ark 2015).

Japonya' daki araştırmacılar, Loliolide'in, uzun yıllardır tıpta yaygın olarak kullanılan mor gevşek bitki (*Lythrum salicaria* L.) 'de bulunan bileşiklerden biri olduğunu bulmuşlardır. Ateş düşürücü, iltihap önleyici ve damar genişletici etkiler sergilediğini bildirmişleridir (Fujita ve ark 1972).

Loliolide, heliotrop (kedi otu) yapraklarından elde edilen ekstraktta bulunmuştur. Heliotrope (*Heliotropium angiospermum*), Güneydoğu Meksika' da bulunan, hodongiller familyasına ait bir çalı türüdür. Bu molekülün anti inflamatuvar ajan olarak kullanıldığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı ve ayrıca

dizanteri ve ishali tedavi etmek için de uygulandığı bildirilmiştir (Erosa-Rejón ve ark 2009).

4.2.Kjeldahl Yöntemi ile Protein Tayini Bulguları

Bu yöntemle bitkideki toplam azotlu bileşiklerin yüzdesi araştırılmıştır. 5 adet titrasyon sonucunun ortalaması alınmıştır. Sırasıyla harcanan X ml H₂SO₄ 7,63ml, 7,65ml, 9,28 ml, 8,85ml, 10,01ml olarak belirlenmiştir. Bu titrasyonlardaki % N içeren bileşik miktarı sırasıyla ; % 2,18, % 2,19, % 2,65, % 2,53, % 2,86 olarak tespit edilmiştir.

Azotlu bitkisel içerikler için uygun katsayı olan 5,83 ile çarpılacak olursa sırasıyla % protein miktarları ; % 12,72, % 12,75, % 15,47, % 14,75, % 16,68 olarak bulunacaktır. Sonuçta *Tribulus terrestris L.* bitkisinde % protein miktarı deneylerin ortalama değeri alınırca yaklaşık olarak % 14,47±1,73 tespit edilmiştir.

4.3. Bitkide (*Tribulus terrestris L.*) Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini Bulguları

Tribulus terrestris L. bitkisinin sulu ekstraktı ile *Aspergillus* cinsi küf ve *Penicillium* cinsi küfte yapılan çalışmada antifungal etki görülmemiştir ve negatif sonuç elde edilmiştir. *Candida albicans* türü maya üzerinde yapılan antifungal çalışmada ise pozitif sonuç elde edilmiştir. Değerlendirme Clotrimazole antibiyotiği ile yapılan standart çalışmaya göre yapılmıştır (Bioanalyse limited zone table). Standartta 15 mm dirençli kabul edilmektedir.15-18 mm arası doza bağlı duyarlı, 19 mm ve üstü duyarlı yani kullanılan ekstrakta karşı hassasdır denilmektedir. *Tribulus terrestris L.* bitkisinin sulu ekstraktına karşı 22 mm zone çapı oluşmuştur. Bu sonuç *Candida albicans* türü mayanın *Tribulus terrestris L.* bitki estraktına karşı hassas olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Ekstraksiyon Yöntemleri Sonuçları ve Önerileri

Bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon metodlarını 2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)- (Loliolide türevi) miktarları açısından kıyaslarsak % 10,75 oranı ile Subkritik H₂O ekstraksiyonu en etkili yöntemdir. Sonrasında *tert*-butil metil eter ile USE ekstraktında % 1,49 oranı ile bulunmaktadır. Böylece USE 2. etkin yöntem olarak tanımlanabilir. *Bu molekül tert*-butil metil eter ile maserasyon yöntemine göre ise % 0,20 oranında bulunmaktadır. Bu koşullarda maserasyon 3. etkin yöntem olarak tanımlanabilir. Sub-kritik EtOH ekstraksiyonuna göre ise 2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-, (R)- (Loliolide türevi) tespit edilmemiştir. Buna ek olarak (Loliolide) 6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-one sadece Sub-kritik H₂O ekstraktında ve % 1,86 oranında tespit edilmiştir.

Loliolide izolasyonu ile ilgili **Akgollu ve ark., 2018'** na ait çalışmayı bizim çalışmamızla kıyaslarsak; *Tribulus terrestris L.*'in Sub-kritik su ekstraksiyonu yöntemiyle ve 100 °C 60 bar 30 dk. koşullarında hazırlanan ekstraktında basit lakton bileşiği olan Loliolide % 23,82 oranında tespit etmişlerdir. Bu farklılık bitkinin farklı coğrafik bölgeden temin edilmesi ve farklı çalışma koşullarına bağlı olabilir.

Bunun yanında yapılan denemelere göre USE ile maserasyonu kıyaslarsak; *tert*-butil metil eter ile USE yöntemine göre n-Hexadecanoic acid % 18,80 oranında, *tert*-butil metil eter maserasyon yöntemine göre ise % 10,75 oranında bulunmuştur.

Diğer yandan 47. dakikada gelen bileşik (Oleamide) 9-octadecenamide'dir. USE yöntemine göre % 50,30 oranında iken maserasyon yöntemine göre % 6,62 oranındadır.

USE' da çözelti 2 saat ekstraksiyona tabi tutulmaktadır, maserasyonda ise bitki 10 gün *tert*-butil metil eter içerisinde beklemiştir. USE' da ise ekstraksiyon

süresi daha kısa, ekstraksiyon daha ekonomik, daha az işçilikle, daha hızlı ve daha verimli sonuçlar elde edilmektedir. Burdan da anlaşılabacağı gibi USE, maserasyon yöntemine göre çok daha etkili ve zaman tasarrufu sağlayan bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bu deneylere bakılarak *Tribulus terrestris* L. bitkisi tert- butil metil eter ile USE ve maserasyon işlemine tabi tutulup ayırma saflaştırma işlemlerine tabi tutularak, önemli bileşiklerden olan, 9-oktadecenamid (Oleamide), biyokimyasal açıdan faydalı olduğu konularda kullanılmak üzere saflaştırılabilir ve halk tıbbında kullanılan bitkilerle ilgili yapılacak ileri çalışmalar yeni 9-oktadecenamid kaynaklarının bulunmasını ve 9-oktadecenamid' in yeni özelliklerinin ve uygulamalarının keşfedilmesini sağlayabilir.

Tribulus terrestris L. bitkisinden elde edilen ekstraktlarda belirlenen bileşenlerin göreceli dağılımı seçilen ekstraksiyon metoduna göre farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar nedeni ile ekstraktın kullanım amacına uygun (gıda, kozmetik, ilaç vb.) bir ekstraksiyon metodunun seçilebilmesi mümkündür. Ayrıca bitkilerin yetiştiği Coğrafya ve iklim koşullarının farklılıkları da bitkilerden elde edecek uçucu yağların bileşenleri ve yüzdeleri üzerine etki etmektedir.

Ekstraksiyon metoduna göre farklılık gösteren bileşenler amaca göre ekstrakte edildikten sonra ayırma ve saflaştırma teknikleri ile tek başına ve saf olarak elde edilebilir ve karakterize edilebilirler. Sub-kritik H₂O ve sub-kritik EtOH ekstraksiyonlarında uçucu yağlar elde edildikten sonra kalan sulu kısımdaki bileşenleri belirleme çalışmaları sıvı kromatografisi ile (HPLC ve LC-MS ile) yürütülebilir. Endüstride kullanılan bazı bileşenlere uygulandığında önemli ve maddi değeri olan sonuçlar elde edilebilir. Uygun ekstraksiyon ve kromatografik yöntemleri uygulayarak Loliolide molekülü saflaştırılabilir ve önceki çalışmalarda da bahsedildiği gibi damar açıcı etkisi, anti-inflamatuvar etkisi, yara iyileştirme etkisi, dizanteri ve ishal tedavisi için ilaç etken maddesi olarak kullanılabilir.

Ayrıca önceki çalışmalarda belirtildiği gibi idrar söktürme ve damar açma özelliğinden dolayı tansiyon düşürme etkilerine yoğunlaşarak ilaç etken maddesi olarak kullanılabilir.

İlaç etken maddeleri laboratuvar ortamında pahalı yöntemlerle üretilbildiği gibi doğanın insanoğlu için yarattığı bitki ve hayvan türlerinden de izole edilebilir.

İnsanlar potansiyel ilaçların yeni kaynaklarını ararken kıyı sularında yaşayan organizmalara da dönüş yapmışlardır. Genellikle bilinmeyen, çok çeşitli bitki ve hayvan türleri denizlerde ve okyanuslarda yaşamaktadır. Daha önce yapılmış çalışmaya göre çeşitli alglerde farklı miktarlarda Loliolide tespit edilmiştir. Ayrıca Hint Okyanusunda yaşayan *Opistho branch* cinsinin yumuşakçalarında Loliolide (1) tespit edilmiştir. Bu durum kara bitkilerinin yanında deniz ve okyanuslarda da araştırılması gereken çeşitli deniz canlılarının olduğunu göstermektedir.

Doğanın bizim için değerli olan çeşitli ürünlerin kaynağı olduğu konusunda atalarımızın iyi bildiği ve uyguladığı yöntemlere ve bilgilere karşı son zamanlarda artan bir ilgi vardır. Genellikle çok pahalı ve karmaşık bileşiklerin sentezlenmesi yerine, doğanın yarattığı bileşiklerin kullanılması daha kolay ve ekonomiktir. Lakton Loliolide (1), hem karada hem de suda, dünyadaki canlı organizmalarda yaygın olarak bulunan çok çeşitli özelliklere sahip çok basit bir moleküldür. Birçok farklı organizmada bulunan lakton Loliolide' in anti-enflamatuar, anti-tümör veya anti-bakteriyel gibi aktiviteleri onu önemli kılmaktadır. Bununla birlikte diyabet ve depresyon tedavisindeki faydalı etkileri de önemlidir. Kuşkusuz geleneksel halk tıbbında kullanılan bitkilerin daha ileri çalışmaları, yeni Loliolide kaynaklarının bulunmasını ve Loliolide'in yeni özelliklerinin ve uygulamalarının keşfedilmesini sağlayacaktır.

Uçucu yağın güzel kokusuna katkısı nedeniyle oksijenli bileşenler, monoterpen hidrokarbonlardan daha değerlidir (Lucchesi ve ark., 2004). Bu bakımdan uçucu yağda bulunan oksijenli bileşenler, hidrokarbonlara göre

ekonomik olarak daha önemlidir (Smith, 2002). *Tribulus terrestris* L. bitkisi ekstraktlarında da Loliolide ve Oleamide gibi önemli bileşikler tespit edilmiştir.

5.2. Bitkide (*Tribulus terrestris* L.) Protein Araştırması Sonuçları ve Önerileri

Melek balıklarında yapılan ağırlık artışı denemeleri, diğer bazı balık türlerinde yapılan ağırlık artışı denemeleri ve insanlar tarafından kasların geliştirilmesinde kullanılması denemelerinden esinlenilerek bitkideki protein oranı araştırılmıştır. Sonuç olarak ($14,47 \pm 1,73$) oranıyla tespit edilmiştir. Bu oran bitkiler için azımsanmayacak bir orandır.

Bundan yola çıkarak balıklar canlı yemlerle değil protein kaynağı olan *Tribulus terrestris* L. gibi tıbbi aromatik bitkilerle kuru yem temelinde beslendiğinde balıklarda bir ağırlık artışı sağlanmış olabilir ve bunun yanında hastalık etkenlerinden de koruyarak antibiyotik almak zorunda kalmalarına engel olunabilir. Böylece bu balıklarla beslenecek olan insanlara da antibiyotik aktarımı olmaz. Günümüzde insanlar için çok çok önemli olan sağlıklı yaşam çalışmalarına katkıda bulunulmuş olur. Bunun yanında önceki çalışmalarda da bahsedildiği gibi insanlar için kas yoğunluğunu arttırmasından ve fiziksel aktiviteyi arttırmasından dolayı *Tribulus terrestris* L. bitkisini çay olarak tüketmeleri tavsiye edilebilir.

5.3. Bitkide (*Tribulus terrestris* L.) Kuyu Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Tayini Sonuçları ve Önerileri

Candida albicans türü maya üzerinde yapılan antifungal çalışmada en fazla 200 mikrolitre uygulanan kuyucukta 22 mm zone çapı tespit edilmiştir. Clotrimazole antibiyotiği standart alınarak yapılan denemeye göre 19 mm zone çapı hassas kabul edilmektedir (Bioanalyse limited zone table). Bu pozitif sonuç daha önce yapılan literatür çalışmasına göre *Tribulus terrestris* L.' in, insan vücudunda yaşayan 5 önemli maya türünü inaktif etme özelliğini destekler niteliktedir. 22 mm zone çapı *Candida albicans* türü mayanın *Tribulus terrestris* L.'in sub-kritik su ekstraktı ile inaktif edildiğini göstermektedir.

Başka bir literatür çalışmasına göre Filipin ağacı *Pterocarpus*' un kurutulmuş yapraklarının ekstraktında bulunan Loliolide (1)'in, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*' e karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Burdan yola çıkarak; *Tribulus terrestris* L. bitki ekstraktının da önemli ölçüde Loliolide içerdiğini göz önüne alırsak, *Candida albicans* türü mayayı bitkinin içeriğindeki Loliolide inaktif etmektedir denilebilir. Böylece alternatif tıp alanında kullanılabileceği söylenebilir. Bu bitki ekstraktı *Candida Albicans* türü maya ile ilgili rahatsızlık olan cilt bölgelerine sürülerek fayda sağlanabilir. Fakat bu fayda etki süresine de bağlı olarak değişebilir.

Ayrıca, bu çalışmada, *Tribulus terrestris* L. sulu ekstraktı ile farklı maya ve bakteri türleri üzerinde daha sonra yapılacak çalışmalarda alınabilecek çeşitli sonuçlar olabileceği öngörülmüştür. Bu çalışma yapılacak yeni çalışmalara öncü nitelikte olacaktır.



KAYNAKLAR

- Acar,Ü., Öğretmen,Ö.,Türker,A., Şahin,M., Kesbiç,O.S.,2013, Farklı Oranlarda *Tribulus Terrestris L. İçeren Yemlerle Beslemenin Melek Balığı (Pterophyllum Scalare Liechtenstein, 1923) Yavrularının Büyüme Ve Yaşama Oranına Etkisi ;1.Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Muğla, Türkiye* 2kastamonu Üniversitesi, İnebolu Meslek Yüksekokulu, Deniz Ve Liman İşletmeciliği, İnebolu, Türkiye
- Aguleira, J. M. (2003). Solid–Liquid Extraction. In: Extraction Optimization İn Food Engineering. Crc Press, Pp: 35-55.
- Alı, A.M., Wahbi, S., Twajj, H., 2003, *Tribulus Terrestris L.*: Preliminary Study Of Its Diuretic And Contractile Effects And Comparison With Zea Mays. Journal Of Ethnopharmacology (85), 257-260.
- Aniol M.,Winska K.,Potaniec B.;Loliolide-The Most Ubiquitous Lactone; Wrocław University Of Environmental And Life Sciences,Research Gate
- Anonim, 2010.Ham Protein Tayini. [Http://Www.Muhendisevi.Com/Dosya/?D=917](http://www.Muhendisevi.Com/Dosya/?D=917)
- Akgollu,E.,Bilgin,B.,Türk,M.,Umay,A.,Chemical Composition Of Subcritical Water Extraction Extract Of *Tribulus Terrestris L.*;
- Bauer, Aw.,Kirby W M,Sherris İ C,And Turck M.Antibiotic Susceptibility Testing By A Standardized Single Disk Method.Am J Clin Pathol 1966;45:493-96.
- Baytop, T., 1997, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu. 88, 153, 217
- Berger, G. R., 2007. Flavours And Fragrances.Springer, Germany, 649.
- Cellat,K.,2011,Bazı Endemik Bitkilerin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Ekstrakte Edilmesi Ve İçeriklerinin Araştırılması; Çukurova Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı;(19)
- Ceylan, A., 1997, Tıbbi Bitkiler Iı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:481, S 1-22.

- Chemat, F., Tomao, V. ve Viot, M. (2008). Ultrasound Assisted Extraction In Food Analyses. In: Handbook Of Food Analysis Instruments. Crc Press, Pp:85-99.
- Chrastil, J., 1982, Solubility Of Solids And Liquids In Supercritical Gases, *Journal Of Physical Chemistry*, 86: 3016-3021.
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguieres, A., Renouard, S., Blondeau, J. P., Ferroud, C., Doussot, J., Laine, E. Ve Hano, C. (2015). Development And Validation Of An Efficient Ultrasound Assisted Extraction Of Phenolic Compounds From Flax (*Linum Usitatissimum* L.) Seeds. *Ultrasonic Sonochemistry*, 26: 176 185.
- Çek Ş. , Turan F. , Atik E. , Masculinization Of Convict Cichlid (*Cichlasoma Nigrofasciatum*) By Immersion In *Tribulus Terrestris* L.Extract, Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü April 2007, Volume 15, Issue 2, Pp 109–119
- D'alessandro, L. G. Ve Dimitrov, K. (2014). Kinetics Of Ultrasound Assisted Extraction Of Anthocyanins From *Aronia Melanocarpa* (Black Chokeberry) Wastes. *Chemical Engineering Research And Design*, 92(10):1818-1826
- Erosa-Rejón, G., Peña-Rodríguez, L.M. & Sterner O. 2009. Secondary Metabolites From *Heliotropium Angiospermum*. *Journal Of Mexican Chemical Society*, 53: 44–47
- Elkhayat, E. 2009. Cytotoxic And Antibacterial Constituents From The Roots Of *Sonchus Oleraceus* L. Growing In Egypt. *Pharmacognosy Magazine*, 5: 324–328.
- Fujita, Eiichi; Saeki, Yukikazu; Ochiai, Masahito; Inoue, Takehisa, Investigation Of The Neutral Constituents Of *Lythrum Salicaria* L (Commemoration Issue Dedicated To Professor Sango Kunichika On The Occasion Of His Retirement), *Bulletin Of The Institute For Chemical Research, Kyoto University* (1972), 50(4): 327-331

- Gauthaman, K., Ganesan, A.,P., 2008. The Hormonal Effects Of *Tribulus Terrestris* L. And Its Role In The Management Of Male Erectile Dysfunction – An Evaluation Using Primates, Rabbit And Rat. *Phytomedicine* 15:44-54.
- Giray, E. S., Kırıcı, S., Kaya, D. A., Türk, M., Sönmez, Ö., İnan, M.,2008. Comparing The Effect Of Sub-Critical Water Extraction With Conventional Extraction Methods On The Chemical Composition Of *Lavandula Stoechas*. *Talanta*, 74: 930-935
- Gonzalez, R., Serra, F. C., Femenia, A., Rossello, C. Ve Simal, S. (2015). Effect Of Power Ultrasound Application On Aqueous Extraction Of Phenolic Compunds And Antioxidant Activity From Grape Pomace (*Vitis Vinifera* L.): Experimental Kinetics And Modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506-514.
- Gracia, G. L., Castro, L. D. M., 2000. Continuous Subcritical Water Extraction Of Medicinal Plant Essential Oil: Comparison With Conventional Techniques. *Talanta*, 51:1179-1185
- Hammi, K. M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H. Ve Ksouri, R. (2015). Optimization Of Ultrasound-Assisted Extraction Of Antioxidant Compounds From Tunisian *Zizyphus Lotus* Fruits Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 184: 80-89.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D., 2008. Extraction Technologies For Medicinal And Aromatic Plants. Ics- Unido, Trieste, Italy, 266.
- Hossain, M., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C.P., Martin Diana A.B. Ve Barry-Ryan C. (2012). Optimization Of Ultrasound Assisted Extraction Of Antioxidant Compounds From Marjoram (*Origanum Majorana* L.) Using Response Surface Methodology *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3):582-590

- Hunyadi, A., Veres, K., Danko, B. *Et Al.* 2012. In Vitro Anti-Diabetic Activity And Chemical Characterization of An Apolar Fraction of *Morus Alba* Leaf Water Extract. *Phytotherapy Research*, 27: 847–851.
- Hiraga, Y., Taino, K., Kurokawa, M. *Et Al.* 1997. (-)-Loliolide And Other Germination Inhibitory Active Constituents In *Equisetum Arvense*. *Natural Product Letters*, 10: 181–187.
- J.Rocca, J.Htumlinson, B.Mglancey, C.Slofgren, The Queen Recognition Pheromone Of *Olenopsis Invicta*, Preparation Of (E-6-(1-Pentenyl)-2h-Pyran-2-One, The Title Compound, I, Prepared In Five Steps Via Four Known A-Pyrones, Is Responsible, In Part, For “Queen Recognition” By Red Imported Fire Ant Workers. Ir, Nmr And Ms Data Are Presented, Volume 24, Issue 18, 1983, Pages 1889-1892
- Noikotra, K., Chaveeracha, A., Sudmoona, R., Tanea, T., Patarapadungkita, N. Phytochemicals, Cytotoxicity, And Genotoxicity of Three *Artocarpus* Species Reveal Arbutin In *A. Lacucha*, 2017
- Kuniyoshi, M. 1985. Germination Inhibitors From The Brown Alga *Sargassum Crassifolium* (Phaeophyta, Sargassaceae). *Botanica Marina*, 28: 501–503.
- Lang, Q., Wai, M. C., 2001. Supercritical Fluid Extraction In Herbal And Natural Product Studies-A Pratical Review. *Talanta*, 53:771-782.
- Lehotay, S.J., Lee, C.H. 1997. Evaluation Of A Fibrous Cellulose Drying Agent In Supercritical Fluid Extraction And Pressurized Liquid Extraction of Diverse Pesticides. *Journal Of Chromatography A*. 785:313-327
- Lucchesi, E. M., Farid, C., Smadja, J., 2004. Solvent-Free Microwave Extraction Of Essential Oil Form Aromatic Herbs: Comparison With Conventional Hydro-Distillation. *Journal Of Chromatography A*, 1043:323- 327.

- L. Gámiz-Gracia, M.D Luque De Castro, Continuous Subcritical Water Extraction Of Medicinal Plant Essential Oil: Comparison With Conventional Techniques, Analytical Chemistry Division, Faculty of Sciences, University Of Córdoba, E-14004 Córdoba, Spain, Volume 51, Issue 6, 5 May 2000, Pages 1179-1185
- Machado, F.B., Yamamoto, R.E., Zanolli, K. *Et Al.* 2012. Evaluation Of The Antiproliferative Activity Of The Leaves From *Arctium Lappa* By A Bioassay-Guided Fractionation. *Molecules*, 17:1852–1859.
- Mason, J. Ve Vinatoru, M. (2011). The Extraction Of Natural Products Using Ultrasound Or Microwave. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2):237-247.
- Mukhopadhyay, M., 2000, Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide, Crc Press Llc, Florida, 131 – 141.
- Mutlu,M.,2002, *Tribulus Terrestris* L. L. (Deve Çökerten) (Zygophyllaceae) Bitkisinden Elde Edilen Ekstarktların Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması ;Süleyman Demirel Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı (1)
- Neergaard, J.S., Rasmussen, H.B., Stafford, G.I. *Et Al.* 2010. Serotonin Transporter Affinity Of (–)- Loliolide, A Monoterpene Lactone From *Mondia Whitei*. *South African Journal Of Botany*, 76: 593–596.
- Nist (The National Institute Of Standards And Technology) Standard Reference Database 69: *Nist Chemistry Webbook*
- Noikotra.K, Chaveeracha.A, Sudmoona.R, Tanee.T, Patarapadungkita.N. (2018) Phytochemicals, Cytotoxicity, and Genotoxicity Of Three *Artocarpus* Species Reveal Arbutin İn *A. Lacucha*
- Okunade, A.L. & Wiemer, D.F. (1985). (–)- Loliolide, An Ant-Repellent Compound From *Xanthoxylum Setulosum*. *Journal Of Natural Products*, 48: 472–473.

- Orapin Chienthavorn, Roger M. Smith, Ian D. Wilson, Brian Wright, Eva M. Lenz, Superheated Water Chromatography–Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Of Kava Lactones, Volume 16, Issue 3, May/June 2005, Pages 217–221
- Öncül, N. Ve Ensoy, Ü. 2010. Kjeldahl Yöntemiyle Ham Protein Tayini. Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat.10–12.
- Özel, Z. M., Gogus, F., Lewis, C. A., 2003. Subcritical Water Extraction Of Essential Oils From *Thymbra Spicata*. Food Chemistry, 82:381-386.
- P. Kavitha, R. Ramesh, G. Bupesh, A. Stalin, P. Subramanian, Hepatoprotective Activity Of *Tribulus Terrestris L.* Extract Against Acetaminophen-Induced Toxicity İn A Freshwater Fish (*Oreochromis Mossambicus*), Department Of Animal Science Bharathidasan University Tiruchirappalli India, Department Of Zoology Jamal Mohamed College Tiruchirappalli India, December 2011, Volume 47, Issue 10, Pp 698–706
- Pan, L., Sinden, M.R., Kennedy, A.H. *Et Al.* 2009. Bioactive Constituents Of *Helianthus Tuberosus* (Jerusalem Artichoke). Phytochemistry Letters,2: 15–18.
- Percota,A.,Yalçın,A.,Aysel,V.,Erdügan,H.,Dural,B.,Güven,K.C., Loliolide İn Marine Algae (2009) Natural Product Research,23:5,460-465
- Pettit, G.R., Herald, C.L., Ode, R.H *Et Al.* 1980. The İsolation Of Loliolide From An Indian Ocean *Opisthobranch Mollusk*. Journal Of Natural Products, 43: 752–755.
- Phillips, O.A., Mathew K T., And Oriowo M A., 2005, Antihypertensive And Vasodilator Effects Of Methanolic And Aqueous Extracts Of *Tribulus Terrestris L.* İn Rats, Journal Of Ethnopharmacology 5
- Ragasa, C.Y., De Luna, R.D. & Hofilena, J.G. 2005. Antimicrobial Terpenoids From *Pterocarpus İndicus*. Natural Product Research, 19: 305–309.

- Ragasa, C.Y., Agbayani, V., Hernandez, R.B. *Et Al.* 1997. Antimutagenic Monoterpene From *Malachra Fasciata* (Malvaceae). Philippine Journal Of Science, 126: 183–189.
- Rasher, D.B., Stout, E.P., Engel, S. *Et Al.* 2011. Macroalgal Terpenes Function As Allelopathic Agents Against Reef Corals. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 108: 17727–17731.
- R.Hodges, A.L.Porte, The Structure Of Loliolide : A Terpene From Lolium Perenne, Loliolide, A Compound C₁₁H₁₆O₃ Obtained From Lolium Perenne, Has Been Shown To Be 1,3-Dihydroxy-3,5,5-Trimethylcyclohexylidene-4-Acetic Acid Lactone, Volume 20, Issue 6, 1964, Pages 1463-1467
- Schillinger,U. And F.K. Lucke ,1989 Antibacterial Activity Of Lactobacillus Isolated From Meat.Appl.Environ.Microbiol.,55:1901-1906.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., And Nieman T.A., 1998.Principles Of Instrumental Analysis, (E. Kiliç Editör). Enstrumental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, 1.Baskı, Ankara, 768-777s.
- Smith, R.M. 2002. Extractions With Superheated Water. Journal Of Chromatography A .975:31-46
- S. Yılmaz, S.Ergün, H. Kaya, M. Gürkan, Influence Of *Tribulus Terrestris* L. Extract On The Survival And Histopathology Of Oreochromis Mossambicus (Peters, 1852) Fry Before And After Streptococcus Iniae Infection, Volume 30, Issue 5, October 2014 , Pages 994–1000
- S.D.Jayasooriya, P.J.Torley, B.R.D'arcy, B.R.Bhandari, Effect Of High Power Ultrasound And Ageing On The Physical Properties Of Bovine Semitendinosus And Longissimus Muscles, School Of Land Food Sciences, The University Of Queensland, St. Lucia Qld 4072, Australia, Volume 75, Issue 4, April 2007, Pages 628-639

- Takeuchi, T. M., Pereira, C. G., Braga, M. E. M., Marostica, M. R., Leal, P. F. Ve Meireles M. A. A. (2008). Low Pressure Solvent Extraction, Microwave Assisted, And Ultrasound From Condimentary Plant. In: Extracting Bioactive Compounds For Food Products. Crc Press, Pp: 137-218.
- Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q. Ve Sun D. (2014). Ultrasound-Assisted Extraction Of Phenolics From Wine Lees: Modeling, Optimization And Stability Of Extracts During Storage. Ultrasonics Sonochemistry, 21(2):706-715.
- Torley, P.J. Ve Bhandari, B. R. (2007). Ultrasound In Food Prosesing And Preservation. In: Handbook Of Food Preservation, Second Edition. Crc Press, Pp: 713-732.
- Turan, F.,& Cek, S. (2007). Masculinization Of African Catfish (*Clarias Gariepinus*) Treated With Gokshura (*Tribulus Terrestris L.*). The Israeli Journal Of Aquaculture - Bamidgeh, 59, 224-229. [Http://Hdl.Handle.Net/10524/19235](http://hdl.handle.net/10524/19235)
- Türk,M.,2010,Bazı Önemli Tıbbi Bitkilerin Kimyasal Kompozisyonu Ve Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Sub Ve Süperkritik Akışkanların Etkisi ; Çukurova Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı (1,2
- Umay,A, 2007, Lavandula Stoeches,Melissa Officinalis Ve *Tribulus Terrestris L.* Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması ,Çukurova Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı (S 4-10)
- Vieira, G. S., Cavalcanti R. N., Meireles M. A. A. Ve Hubinger, M. (2013). Chemical And Economic Evaluation Of Natural Antioxidant Extracts Obtained By Ultrasound Assisted And Agitated Bed Extraction From Jussara Pulp (*Euterpe Edulis*). Journal Of Food Engineering, 119(2):196-204.
- Vinatoru, M. (2001). An Overview Of The Ultrasonically Assisted Extraction Of Bioactive Principles From Herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8(3), 303-313.

- Viro, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., Chemat, F. (2010). Towards The Industrial Production Of Antioxidants From Food Processing Byproducts With Ultrasound-Assisted Extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 1066-1074. Wang
- Wińska, K. Ve Diğ., 2015., Loliolide - The Most Ubiquitous Lactone; Department Of Chemistry, Wrocław University Of Environmental And Life Sciences, Norwida 25, 50-375 Wrocław, Poland (1,2)
- Wu, H., Zhu, J., Diao, W. Ve Wang, C. (2014). Ultrasound Assisted Enzymatic Extraction And Antioxidant Activity Of Polysaccharides From Pumpkin (*Cucurbita Moschata*). *Carbohydrate Polymers*, 113:314–324.
- Wu, T.S., Shi, L.S., 1999, Alkaloids And Other Constituents From *Tribulus Terrestris* L., *Phytochemistry* 50. 1411-1415
- . Xu, Y.X., Chen, H.S., 1997, Two Sapogenins From *Tribulus Terrestris* L., *Phytochemistry*, Vol 49, No 1. 199-201.
- Yağcıoğlu, P., 2015, Farklı Ekstraksiyon Metodları İle Adaçayı (*Salvia Officinalis* L.) Bitkisinden Antioksidan Ekstraksiyonunun Optimizasyonu; İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (27,28)
- Yang, X., Kang, M.C., Lee, K.W. Et Al. 2011 Antioxidant Activity And Cell Protective Effect Of Loliolide Isolated From *Sargassum Ringgoldianum* Subs. *Coreanum Algae*, 26:201-208
- Zajdel, S.M., Grakio, K., Glowniak, K., Et Al. 2012. Chemical Analysis Of *Penstemon Campanulatus* (Cav.) Willd. –Antimicrobial Activities. *Fitoterapia*, 83:373-376
- Zhang, J-D., Xu, Z., And Cao, Y-B., 2006, Antifungal Activities And Action Mechanisms Of Compounds From *Tribulus Terrestris* L. L., *Journal Of Ethnopharmacology*, (103), 76–84.
- Zhou, B., Kong, C.H., Li, Y.H Et Al. 2013 Crabgrass (*Digitaria Sanguinalis*) Allelochemicals That Interfere With Crop Growth And The Soil Microbial Community. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 61: 5310-5317.

(<http://www.Colostate.Edu/Depts/Coopext/Adams/Weed/Puncturevine.Htm>)

([http__www.Foodelphi.Com_Kjendahl-Metoduyla-Ham-Protein-Tayini_](http://www.Foodelphi.Com_Kjendahl-Metoduyla-Ham-Protein-Tayini_))

<https://www.nedir-tr.com/nedir-2046-anlamı-ekmekakağı-artocarpus> ???



ÖZGEÇMİŞ

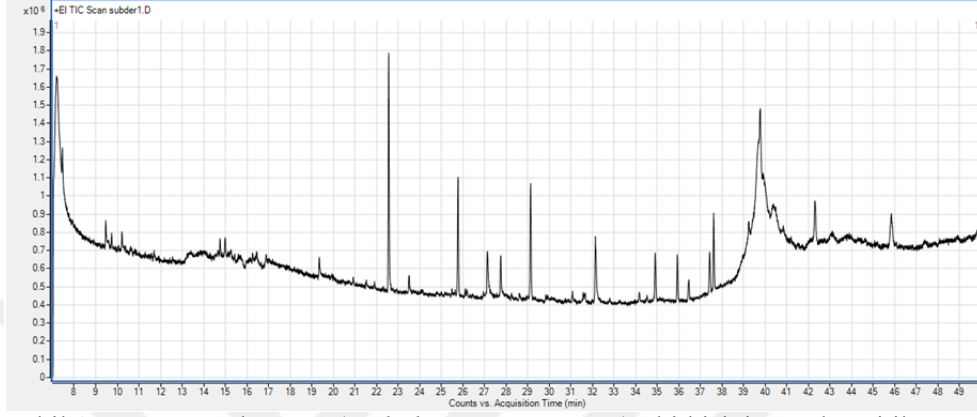
1987 yılında Adana’da doğdu. İlk öğrenimini Cebesoy İlkokul’u ve Özel Yeni Lise’de, orta öğrenimini İncirlik Süper Lisesi ve Çağrıbey Süper Lisesi’nde tamamladı. Lisans eğitimini 2005-2009 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde tamamladı. Tezsiz Yüksek Lisans’ını 2009-2010 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim Fakültesi Bölümü’nde Pedagojik Formasyon olarak tamamladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bölümü’nde Tezli Yüksek Lisans’a başladı. Şubat 2013’te halen çalışmakta olduğu Adana Çalışma ve İş Kurumu İl Müdürlüğü’ne İş ve Meslek Danışmanı olarak atandı.



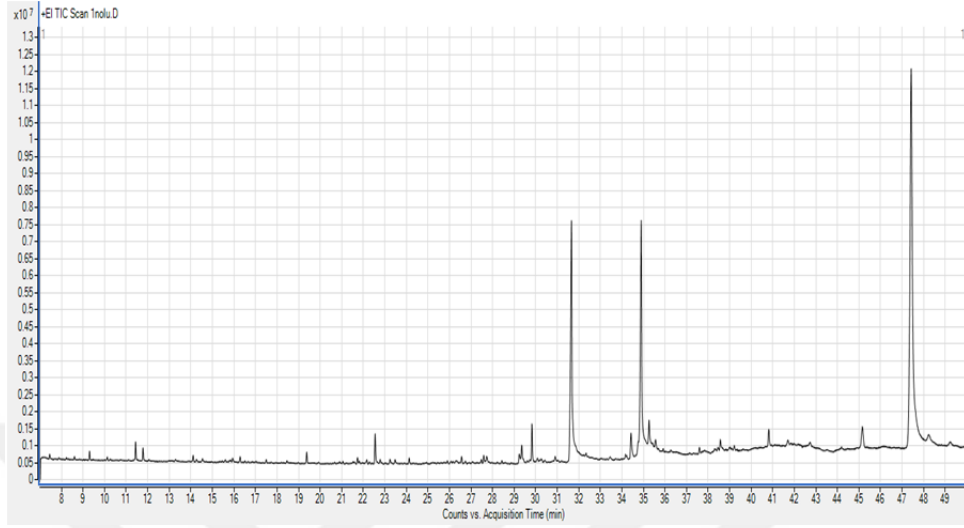
EKLER



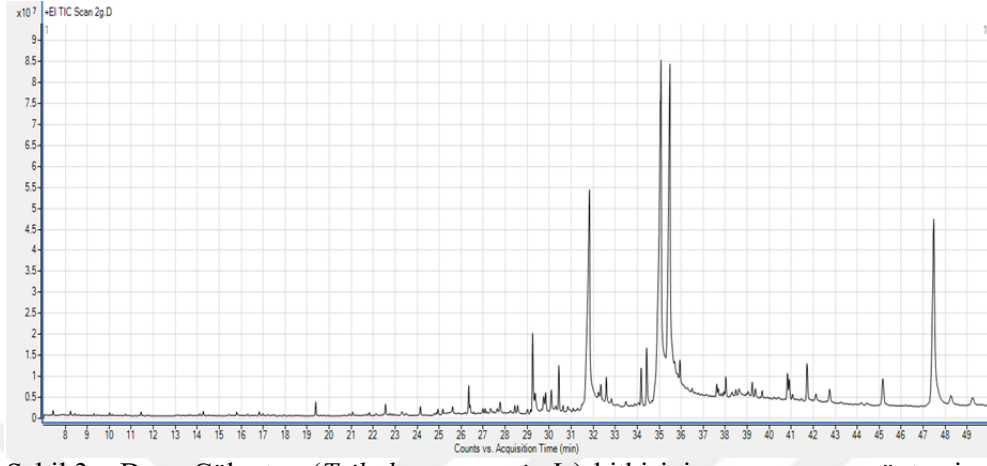
EK-1



Şekil.1. Deve Çökerten (*Tribulus terrestris L.*) bitkisinin Sub-Kritik H₂O ekstraksiyonuna göre GC-MS Kromatogramı



Şekil 2. Deve Çökerten (*Tribulus terrestris L.*) bitkisinin USE ekstraksiyon yöntemine göre GC-MS Kromatogramı



Şekil.3. Deve Çökerten (*Tribulus terrestris* L.) bitkisinin maserasyon yöntemine göre GC-MS Kromatogramı