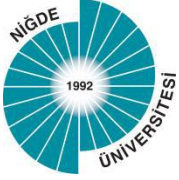


T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI *Galium (Rubiaceae)* TÜRLERİNİN
UÇUCU YAĞ ANALİZLERİ ve ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Filiz YAĞIZ

HAZİRAN 2015



**T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**BAZI *Galium* (*Rubiaceae*) TÜRLERİNİN
UÇUCU YAĞ ANALİZLERİ ve ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ**

Filiz YAĞIZ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Rifat BATTALOĞLU

HAZİRAN 2015

Filiz YAĞIZ tarafından **Yrd. Doç. Dr. Rifat BATTALOĞLU** danışmanlığında hazırlanan “**Bazı Galium (Rubiaceae) Türlerinin Uçucu Yağ Analizleri ve Antimikrobiyal Aktiviteleri**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Şeref ERTUL, Selçuk Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahmet SAVRAN, Niğde Üniversitesi



Üye : Yrd. Doç. Dr. Rifat BATTALOĞLU (Danışman), Niğde Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../20... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT

MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Filiz YAĞIZ

Filiz

ÖZET

BAZI *Galium* (*Rubiaceae*) TÜRLERİNİN UÇUCU YAĞ ANALİZLERİ ve ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

YAĞIZ, Filiz

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Rifat BATTALOĞLU

Haziran 2015, 68 sayfa

Bu çalışmada, Rubiaceae familyasına ait olan *Galium* cinsinin *Galium incanum*, *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* türlerinin uçucu yağ bileşenleri ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan bu tez çalışması kapsamında, bitki örneklerinin uçucu yağ izolasyonları tamamlandıktan sonra uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi GC/MS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda, bu bitkilere ait toplam 61 adet bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Bileşiklerin yapısı incelendiğinde beş bileşiğin monoterpen (%8.2), dokuz bileşiğin monoterpenoid (% 14,75) ve dokuz bileşiğin seskiterpen (%14,75) yapısında oldukları belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda *Galium aladaghense* bitkisine ait uçucu yağın, *Galium incanum* ve *Galium dieckii* bitkilerinin uçucu yağlarına göre her iki mikroorganizmaya karşı daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Her üç bitkinin uçucu yağının da *Escherichia coli* ATCC 25922 mikroorganizmasına, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mikroorganizmasına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Galium incanum* bitkisine ait uçucu yağ *S. aureus* mikroorganizmasına karşı zayıf aktivite gösterirken *E. coli* mikroorganizmasına karşı daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Galium dieckii* bitkisine ait uçucu yağ hem *S. aureus* hem de *E. coli* mikroorganizmasına karşı yakın bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. *Galium aladaghense* bitkisine ait uçucu yağ ise *E. coli* mikroorganizmasına karşı *S. aureus* mikroorganizmasından daha güçlü aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Galium incanum*, *Galium dieckii*, *Galium aladaghense*, *E. Coli*, *S. Aureus*, uçucu yağ, antimikrobiyal aktivite.

SUMMARY

ESSENTIAL OIL ANALYSIS and ANTIMICROBIAL ACTIVITIES of SOME *Galium* (Rubiaceae) SPECIES

YAĞIZ, Filiz

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assist. Prof. Rifat BATTALOĞLU

Haziran 2015, 68 pages

This thesis study was made for aiming the investigation of chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Galium incanum*, *Galium dieckii* and *Galium aladaghense*. In this respect, determination of essential oil contents were made by GC-MS after complete essential oil isolation of plant samples. A total of 61 compound structures which belongs to these plants were identified after analysis. When analyzed the structures of compounds were identified as five compounds were monoterpen (8.2 %), nine compounds were monoterpenoid (14.75 %), and nine compounds were seskiterpen (14.75 %). According to antimicrobial tests it is observed that the essential oil of *Galium aladaghense* plant showed a stronger antimicrobial activity against both microorganisms than the essential oils of *Galium incanum* and *Galium dieckii* plants. All three essential oils of the plants showed stronger antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 microorganism than against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 microorganism. It is determined that the essential oil of *Galium dieckii* plant showed a weak activity against *S. aureus* while showed a stronger activity against *E. coli* microorganism. The essential oil of *Galium dieckii* plant showed similar antimicrobial activities both against the microorganisms of *E. coli* and *S. aureus*. The essential oil of *Galium aladaghense* plant showed stronger antimicrobial activity against the microorganism of *E. coli* than the microorganism *S. aureus*.

Keywords: Galium incanum, Galium dieckii, Galium aladaghense, essential oils, E. Coli, S. Aureus, antimicrobial activity.

ÖN SÖZ

Bu tez çalışması, Rubiaceae familyasına ait olan *Galium* türünden *Galium incanum*, *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* bitkilerinin uçucu yağ bileşenlerinin ve antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi amacıyla yapılmış. Tez çalışması kapsamında, bitki örneklerinin uçucu yağ izolasyonları tamamlandıktan sonra uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi GC/MS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağlara antimikrobiyal testler uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Yüksek Lisans Tez çalışmam sırasında ve bu tezin konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Rifat BATTALOĞLU'na, bitki örneklerinin toplanmasında ve teşhisinde yardımlarından ve desteklerinden dolayı Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ahmet SAVRAN'a, antimikrobiyal aktivite testleri için bakterileri sağlayan Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba ARTAN ONAT'a, , antimikrobiyal aktivite testlerini gerçekleştiren Uzman Sedef İLK'e, öğrenim hayatım boyunca bana her zaman sonsuz destek olan ve sabır gösteren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2015

Filiz YAĞIZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY.....	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ.....	xiii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri	5
2.2 Terpenler.....	6
2.2.1 Terpenoit bileşikler.....	8
2.2.1.1 Terpenoitlerin sınıflandırılması.....	8
2.2.1.2 Terpenoitlerin Biyosentezi.....	10
2.2.1.3 Terpenoitlerin izolasyonu.....	14
2.2.2 Monoterpenler	14
2.2.2.1 Asiklik monoterpenler.....	17
2.2.2.2 Monosiklik monoterpenler.....	17
2.2.2.3 Bisiklik monoterpenler.....	18
2.2.3 Seskiterpenler.....	19

2.2.3.1 Asiklik seskiterpenler.....	22
2.2.3.2 Monosiklik seskiterpenler.....	22
2.2.3.3 Bisiklik seskiterpenler.....	23
2.2.3.4 Trisiklik seskiterpenler.....	23
2.2.4 Diterpenler.....	24
2.2.4.1 Asiklik diterpenler.....	26
2.2.4.2 Monosiklik diterpenler.....	26
2.2.4.3 Bisiklik diterpenler.....	27
2.2.4.4. Trisiklik diterpenler.....	27
2.2.4.5.Tetrasiklik diterpenler.....	27
2.2.5 Triterpenler.....	28
2.2.5.1 Tetrasiklik triterpenler.....	29
2.2.5.2 Pentasiklik Triterpenler.....	30
2.2.6 Tetraterpenler.....	31
2.2.7 Politerpenler.....	32
2.3 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri.....	32
2.3.1 Destilasyon yöntemi.....	32
2.3.1.1 Buhar destilasyonu	33
2.3.1.2 Vakum destilasyonu	33
2.3.1.3 Hidrodestilasyon.....	33
2.3.2 Ekstraksiyon yöntemi.....	34
2.3.2.1 Süperkritik sıvı ekstraksiyonu	35

2.3.2.2 Mikrodalgayla ekstraksiyon	36
2.3.2.3 Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu	36
2.3.3 Mekanik yöntem (Presleme)	37
2.4 Uçucu Yağların Miktar Tayini.....	37
2.5 Uçucu Yağdaki Bileşiklerin Belirlenmesi.....	38
2.6 Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi (GC/MS).....	38
2.6.1 Enjeksiyon.....	39
2.6.2 Kolon.....	40
2.6.3 Dedektör.....	40
2.7 <i>Rubiaceae Galium</i>	40
2.7.1 <i>Galium aladaghense</i>	41
2.7.2 <i>Galium dieckii</i>	41
2.7.3 <i>Galium incanum</i>	42
BÖLÜM III DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	43
3.1 Materyal.....	43
3.2 Metot.....	43
3.2.1 Uçucu Yağların İzolasyonu.....	43
3.2.2 Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi.....	44
3.2.3 Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi.....	45
BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA	47
BÖLÜM V SONUÇLAR.....	57
KAYNAKLAR.....	61
ÖZ GEÇMİŞ.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Terpenlerin sınıflandırılması	9
Çizelge 2.2. Süperkritik sıvı karbondioksitte çözünebilen madde grupları	36
Çizelge 4.1. Uçucu yağ bileşenleri.....	48
Çizelge 4.2. <i>Galium incanum</i> (A), <i>Galium dieckii</i> (B), <i>Galium aladaghsis</i> (C) bitkilerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri (İnhibisyon Zon Çapları (mm)).	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Baş-kuyruk kondenzasyonu	7
Şekil 2.2. Mirsen.....	8
Şekil 2.3. α -pinen.....	8
Şekil 2.4. Terpenlerin izopren birimlerinin gösterilmesi.....	9
Şekil 2.5. Mevalonik asidin oluşumu.....	10
Şekil 2.6. İzopentil pirofosfatın oluşumu.....	11
Şekil 2.7. Geranil pirofosfatın oluşumu.....	11
Şekil 2.8. Farnesil pirofosfatın oluşumu.....	12
Şekil 2.9. Geranil-geranil pirofosfatın oluşumu.....	12
Şekil 2.10. Terpen bileşiklerinin oluşumu.....	13
Şekil 2.11. Bazı monoterpenler.....	15
Şekil 2.12. Monoterpenlerin biyosentez şeması.....	16
Şekil 2.13. Asiklik monoterpenler.....	17
Şekil 2.14. Asiklik monoterpenlere örnekler.....	17
Şekil 2.15. Monosiklik monoterpenler.....	18
Şekil 2.16. Bisiklik monoterpenler.....	18
Şekil 2.17. Bazı seskiterpen yapıları.....	20
Şekil 2.18. Seskiterpenlerin biyosentezi.....	21
Şekil 2.19. Farnesol.....	22
Şekil 2.20. Bisabolene'nin üç yapısı.....	22
Şekil 2.21. Kamazulen.....	23
Şekil 2.22. Trisiklik seskiterpenler.....	23

Şekil 2.23. Diterpenlerin biyosentezi için önerilen mekanizmalar.	25
Şekil 2.24. Asiklik diterpen.....	26
Şekil 2.25. Virodolis A.....	26
Şekil 2.26. Labdanoik asit.....	27
Şekil 2.27. Abietik asit.....	27
Şekil 2.28. Linearol.....	27
Şekil 2.29. Squalenine.....	28
Şekil 2.30. Tetrasiklik triterpenler.....	29
Şekil 2.31. Pentasiklik triterpenler.....	30
Şekil 2.32. Tetraterpenler.....	31
Şekil 2.33. Doğal kauçuk.....	32
Şekil 2.34. Sabinanhidratasetat'ta meydana gelen termal degradasyon.....	34
Şekil 3.1. Clevenger aparatı.....	44
Şekil 3.2. Thermo marka DSQII model GC/MS cihazı.....	44
Şekil 4.1. <i>Galium incanum</i> (A), <i>Galium dieckii</i> (B), <i>Galium aladaghense</i> (C) bitkilerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri.....	56

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 2.1. Galium Alaganhense.....	41
Fotoğraf 2.2. Galium Dieckii.....	42
Fotoğraf 2.3. Galium İncanum.....	42

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

GC-MS : Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

μg : mikrogram

mL : mililitre

CoA : Koenzim A

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E. coli : *Escherichia coli*

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Bitkiler insanlığın var oluşundan itibaren hayatın vazgeçilmez temel kaynaklarından biridir. İlkçağlardan bu yana insanlar bitkileri çeşitli amaçlarla kullanmışlardır. Geçmişten günümüze bitkiler besin maddesi olarak kullanılmalarının yanı sıra koku verici, tat verici, tedavi edici ve diğer amaçlarla kullanılmaktadırlar (Baytop, 1986).

Buradan hareketle Galium (Rubiaceae) cinsine ait *Galium incanum*, *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* türlerinin uçucu yağları çalışılarak, bileşenleri analiz edilmiştir. Buna ilaveten adı geçen türlerin antimikrobiyal özellikleri de ortaya konulmuştur.

M.Ö. 3000 yıllarında kullanılmaya başlanan şifalı bitkiler, 1900'lü yıllarda modern tıbbın gelişmesiyle yerini büyük ölçüde kimyasal ilaçlara bırakmış ve alternatif bir tıp dalı olarak anılmaya başlanmıştır. Kimyasal ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla, bitkisel ilaçlar yeniden önem kazanmaya başlamıştır (Başer, 1990). Bu nedenle yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Baytop, 1984).

Bir çok bitki türü, tat ve aroma verici özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Bu özellikleri onların uçucu yağ bileşimleri ile doğrudan ilgilidir. Bu bileşenler arasında alkol, ester, fenol ve eter gibi maddeler bulunmaktadır. Ancak her bitki türünün bünyesinde bir bileşen diğerlerinden daha fazla bulunmaktadır. Buda bitkiye kendine özgü bir takım özellikler kazandırmaktadır.

Uçucu yağlar; esas itibarıyla tepenlerden oluşmuş karışımlardır. Genellikle sıvı olup, kuvvetli kokulu ve uçucu maddelerdir. Suda çözünmez, organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler. Uçucu yağlar bitkilerin belirli organlarında (örneğin; çiçek, yaprak, meyve, kabuk, gövde gibi) mevcuttur. Uçucu yağlar konusunda çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Türkiye'de Başer ve arkadaşları ile Mirza ve arkadaşlarının çalışmaları, Dünya'da Shakirullah ve arkadaşları ile İl'ina ve arkadaşlarının çalışmaları göze çarpmaktadır.

Rubiaceae familyası Türkçe'miz de Kökboyasıgiller diye adlandırılmıştır. Bu çalışma kapsamında Rubiaceae'ye ait *Galium incanum*, *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense*'in uçucu yağları analiz edilmiş ve antimikrobiyal aktivite çalışmaları

gerçekleştirilmiştir. *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* endemiktir. *Galium incanum* ise endemik değildir, yayılış gösterir (Davis, 1994). Yaptığımız bu çalışma ile adı geçen üç türün uçucu yağ analizleri ortaya çıkarılmıştır.

Uçucu yağların izolasyonları Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında bulunan Clevenger aparatında gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağların analizi GC/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen uçucu yağlar üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

Bitkiler, insanoğlunun temel besin gereksinimlerini karşılayabilmesi için gereken primer metabolitlerin (karbonhidrat, protein ve yağların) ana kaynağıdır. Bu önemli bileşiklerin dışında odun, selüloz, zambak, lastik gibi bazı yararlı maddeler de bitkilerden sağlanmaktadır. Besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal kaynakları taşımakla birlikte, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde bitkisel doğal ürünlerden yararlanılmaktadır (Philipson, 1990).

Bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin tedavi amacıyla kullanılması, bilim adamları için uzun zamandan beri ilgi çekici bir çalışma alanı olmuştur. Bu maddeler, önceleri bitkiler tarafından oluşturulan ve hiçbir işlevi bulunmayan atık maddeler olarak kabul edilmekteydi. Ancak son zamanlarda bu metabolitlerin bazı ekolojik işlevlerin gerçekleşmesinde önemli rol oynadıkları anlaşılmıştır (Sökmen ve Gürel, 2001; Cox, 1990).

Bitkilerin tedavi edici özellikleri binlerce yıl öncesinden bu yana insanların ilgisini çekmiştir. Eski tarihlerden bu yana bir çok uygarlık hastalıklarına karşı bitkilerden elde edilen ilaçları kullanmışlardır. Bitkilerden 18. yy'da bazı önemli bileşiklerin elde edilmesi, özellikle 20.yy' nin sonlarına doğru analiz yöntemlerinin gelişmesiyle içeriklerinin saptanması ve etkilerinin araştırılması önem kazanmıştır. Bu konuda 1990'lı yıllarda A.B.D ve Avrupa Birliği ülkelerinde bazı yasalar yürürlüğe girmiştir (Tanker ve Tanker, 1998).

Günümüzde tıbbi kökenli bitkiler, geleneksel tedavi yöntemlerinin aktif birer unsuru olarak görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verileri gelişmekte olan ülkelerde yaşayan insanların % 80'inin halen geleneksel yöntemleri uyguladığını ve yaklaşık üç milyar insanın da tıbbi bitkileri tedavi aracı olarak kullandığını belirlemiştir (Eloff, 1998; Keleş vd., 2001).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bitkisel ilaç, bitkilerin toprakaltı ve toprak üstü kısımlarını içerir. Bunların kombinasyonunu taşıyan bitkisel preparatlar, günümüz ilaç endüstrisi teknolojisinin tüm gerek ve kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve

etiketlenmiş tıbbi ürünlerdir. Kimyasal olarak tanımlanmış, etken maddelerle kombine edilmiş, bitkiden saf olarak izole edilmiş kimyasal madde içeren ürünler bitkisel ilaç olarak tanımlanmaktadır (Çubukçu vd., 2002).

Bitkisel ilaçlara ilginin artmasının nedeni, modern ilaçların her hastalığı tedavi etme yeteneğine sahip olmamasıdır. Birçok yan etkilerinin olması ve çok pahalı olması da bir başka nedendir. Bitkisel kökenli ilaçların daha fazla etkili, daha riskli ve daha pahalı olan sentetik ilaçlarla birlikte kullanımlarında tamamlayıcı olarak rol oynamalarına olanak sağlamaktadır. Bunun yanında tek başlarına kullanımlarında ise alternatif terapi aracı olarak deri ve mukoza lezyonları ile diğer sistem enfeksiyonlarında iyileştirici ve antiseptik amaçlı olarak kullanımlarını gündeme getirmektedir (Alzoreky ve Nakahara, 2003; Menaker vd., 2004; Miguel vd., 2004).

Ticari antimikrobiyal ilaçların veya kimyasalların enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde rasgele kullanılması, hem insan vücudundaki hem de bitkilerdeki patojen mikroorganizmaların bunlara direnç kazanmalarına sebep olmaktadır. Bunun yanında gıda kaynaklı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklar en gelişmiş ülkelerde dahil olmak üzere hala dünyanın önemli sorunlarından biridir. Gıdaların açık olarak satışa sunulması, uygun olmayan yerlerde saklanması, bunlarda kontaminasyona sebep olmaktadır. Bu yüzden bazı kimyasal maddelerin kullanılması, yiyecekleri bozulmalara sebep olan mikroorganizmalardan korumak için şart olmuştur. Fakat kimyasal madde içeren gıdaların insan sağlığı açısından ciddi sonuçlarından dolayı, bunların yerine antimikrobiyal etkisi kontrol edilen aromatik bitkilerden elde edilen ekstraktlar veya uçucu yağlar tercih edilmeye başlanmıştır (Sökmen vd., 2004; Davis, 1994; Loper vd., 1991; Service, 1995).

Bitkilerin uçucu yağları, onların sekonder metabolizma ürünleridir ve halk arasında yemeklere tat ve koku vermek, yiyecekleri korumak ve tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bitki materyalleri içindeki yeni bileşenler tanımlandıkça, bunların antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri kanıtlanmış ve "geleneksel yiyecek koruma" yöntemlerinin yerini almaya başlamışlardır. Bazı uçucu yağ içeriğindeki maddelerin antimikrobiyal özelliği, özellikle mikotoksin üreten funguslar gibi yiyeceklerin bozulmasına sebep olan mikroorganizmalara karşı test edilmiş, ayrıca

yiyeceklerde doğal antioksidan olarak kullanılmıştır (Dorman ve Deans,2000; Alma vd.,2003; Valero ve Salmeron, 2003; Esen,2005).

2.1. Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri

Uçucu yağlar, bitkilerden elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde bulunan yağimsi karışımlardır. Su buharı ile sürüklenebilirleri için uçucu özelliktedirler. Açıkta bırakılınca oda ısısında bile buharlaşabildiklerinden dolayı "uçucu yağ" veya "esans" gibi isimlerle anılırlar (Baytop,1986; Berk,1953).

Uçucu yağlar, su ile karışmadıkları halde, kokularının suya geçmesine yetecek düzeyde çözünürler. Etanol, eter, benzen ve petrol eteri gibi organik çözücülerde çözünürler. Uçucu yağlar sudan hafiftirler, az bir kısmı sudan ağırdır. Optikçe aktifler, polarize ışığı belli bir derecede sağa ve sola çevirirler ve kırılma indisleri yüksektir (Svigar vd.,1981).

Uçucu yağlar, bitkilerin herhangi bir organında bulunabilirler. Bazen bitkinin bütün dokularında, bazen de bulunduğu familyaya göre farklı bir organda, salgı kanallarında, salgı ceplerinde veya hücrelerinde toplanabilmektedirler. Bazı durumlarda Piperaceae familyasında ki gibi değişikliğe uğramış parankima hücrelerinde, bazen de gül' de olduğu gibi epiderma-parankima hücrelerinde dağılmış olarak bulunurlar. Uçucu yağların bitkide ya doğrudan doğruya protoplazmada veya hücre çeperinin özel bir tabakasında olduğu ileri sürülmektedir. Bununla birlikte glikozitlerin hidrolizi yoluyla da meydana gelebildiği belirlenmiştir. Kendilerine has renk, koku, tat ve görünüme sahip uçucu yağlarda terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri yanında organik asitler (asetik asit, benzoik asit, sinnamik asit), alkoller (benzil alkol, sinnamik alkol, sitronellol), fenoller (karvakrol, kavitol, timol), ketonlar (kafur, karvon, pulegon), aldehitler (benzaldehit, sinnamik aldehit, sitral), esterler (benzil benzoat, bornil asetat, granil asetat), fenol esterleri ve diğer bileşikler (indol, kumarin) bulunmaktadır. Uçucu yağların istenen koku ve tadı oksijenli bileşiklerden ileri gelmektedir. Oksijenli türevler ise terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelir (Baytop,1986; Svigar vd.,1981).

Bugüne kadar uçucu yağlarda binlerce kimyasal bileşiğin bulunduğu gösterilmiş olup, bunların büyük bir çoğunluğu terpenik maddelerden oluşmaktadır. Pek azı aromatik benzen türevlerinin terpenlerle karışımı olarak görülür (Baytop, 1986).

Uçucu yağların bitkilerde neden oluştuğu bilinmemektedir. Bitkinin yaralanması esnasında oluşan reçinelerin çözünmesinin sağladığı, böceklere karşı koruyucu ve cezbedici özellik gösterdiği ve buna bağlı olarak tozlaşmaya yardımcı oldukları ve uçucu yağ taşıyan bitkilerin genellikle hayvanlar tarafından yenmediği de düşünülürse, bitkiyi koruduğu ve neslini sürdürmesine yardım edici özellikler taşıdığı söylenebilir.

Uçucu yağlar tazeysen genelde renksiz veya açık sarı renklidirler. Ancak karanfil yağı gibi sarıdan kahverengiye veya papatya yağı gibi yeşilden maviye kadar değişik renkte olanları da bulunmaktadır. Fakat uzun süre bekletilirse oksitlenebildikleri ve reçineleştikleri için renkleri koyulaşır. Bu durumda genelde koku değişimi ve yağın kalitesinin azalışı söz konusu olmaktadır. Bu nedenle serin bir yerde ve koyu renkli şişelerde saklanmalıdır

Uçucu yağların kalitesini saptarken her zaman uçucu yağı oluşturan esas maddeyi analiz etmek mümkün olmaz. Zira genellikle uçucu yağdaki tek maddenin değil, toplu halde maddelerin bir fizyolojik etkisi olmaktadır. Uçucu yağların terapidaki kullanım alanlarının genişlemesi ve tüketim miktarının her gün artması fiyatlarının dünya pazarında yıldan yıla artmasına neden olmaktadır. Bu artış bazılarında çok yüksek düzeydedir. Bu güne kadar araştırılan 300 bitki familyasından % 30'dan fazlasının uçucu yağ içerdikleri anlaşılmıştır. Aromatik bitkilerde uçucu yağ oranı % 0.01 ile % 20 arasında değişkenlik gösterir.

Uçucu yağları tanımak için, kesitlerde ve drog tozlarında Sudan m boyası kullanılır. Bu boya sabit ve uçucu yağlara turuncu bir renk vermektedir. Kesitler bir süre ısıtıldığında ya da sulu etanol ile yıkandığında yağ damlacıkları kayboluyorsa uçucu yağ, kaybolmuyorsa sabit yağ olarak tanımlanabilir (Baytop, 1986; Esen, 2005).

2.2.Terpenler

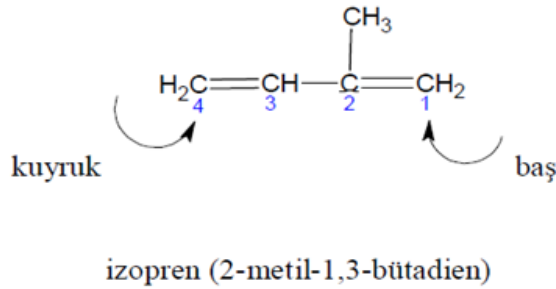
İnsanlar geçmişten günümüze, bitkilerden organik bileşikler izole etmektedir. Bitki yavaşça ısıtıldığında yada buhar destilasyonuna tabi tutulduğunda, uçucu yağlar olarak

bilinen kokulu bileşiklerin bir karışımı elde edilir (Solomons ve Fryhle, 2002). Uçucu yağlar parfümeride yaygın olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağların yapısı aydınlatıldığında ise en önemli bileşenler ; monoterenlerdir.

Terpenoidler olarak da bilinen terpenler yaygın olarak bitki aleminde bulunan bir bileşik grubudur (Finar vd., 1975). Beş karbonlu izopren moleküllerinden oluşmuşlardır (Sakar ve Tanker, 1991). Uçucu yağlarda bulunan karbon ve hidrojen içeren oksijensiz terpenik maddelere hidrokarbür denilmektedir. Ayrıca doğal olarak bulunan her tür terpenin oksijen içeren türleri de vardır ve bunlar temelde alkol, aldehit veya keton formlarıdır. Bunlar ya dallanmış zincir biçimindedir. Ya da siklik yapıda (halkalı yapıda) bulunurlar (Tanker ve Tanker, 1990). Bugün gerek açık zincirli gerekse halkalı yapıda olan çeşitli fonksiyonel gruplara sahip 20.000'den fazla terpen yapıları bilinmektedir (Gören, 2002).

Hemen hemen tüm terpenlerin termal bozunmaları izopren molekülünü vermiştir ve bu da doğal olarak bulunan bütün terpenlerin iskelet yapısının izopren ünitesinden oluştuğu fikrine götürmüştür. Bu izopren kuralı olarak bilinir ve ilk Leopold Ruzicka tarafından gösterilmiştir. Ayrıca, Ingold (1925) doğal terpenlerin içinde ki izopren ünitelerinin ‘‘baştan kuyruğa ‘’ birbirine katıldığını söylemiştir. Bununla birlikte, bu kuralın oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanırsa da, sabit bir kural olarak değil de yol gösterici bir prensip olarak gösterilebilir. Çeşitli istisnalar vardır; karotenler merkezlerinden kuyruk kuyruğa bağlanır, ayrıca bazı terpenlerin içerdikleri karbon beşin katı değildir ve karbon sayısı beşin katı olup ta izopren moleküllerine bölünemeyen terpenler vardır (Finar vd., 1975).

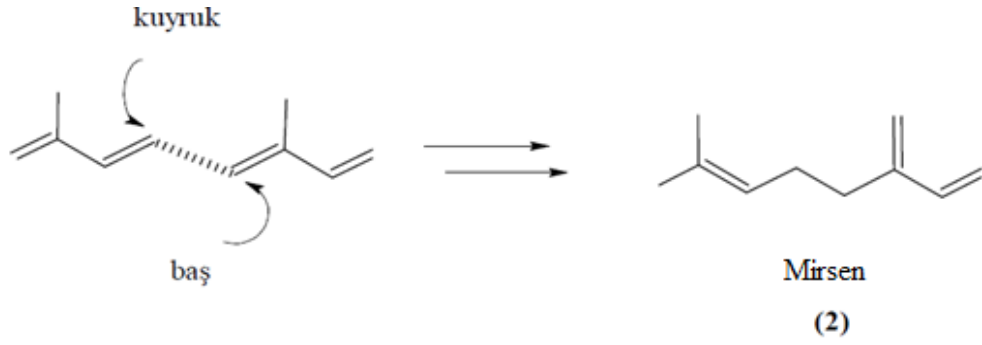
(C₅H₈)_n formülüne uyan terpenler ve oksijenli türevleri bitkisel uçucu yağların belli başlı bileşiklerini oluştururlar. Terpen, iki izopren molekülünün baş-kuyruk kondenzasyonu sonucu meydana gelmektedir.



Şekil 2.1. Baş-kuyruk kondenzasyonu

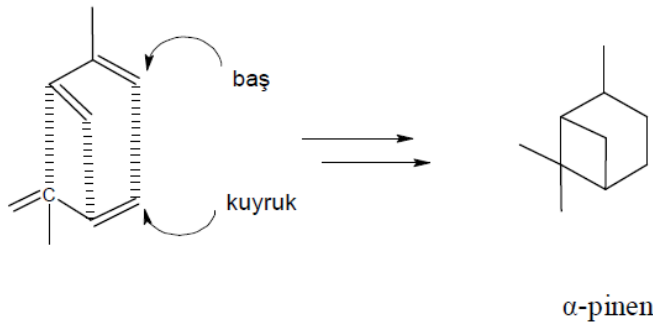
Bu kuralı göre izopren ünitelerindeki 1 nolu karbon (dallanmış taraftaki) baş olarak adlandırılırken, 4 nolu karbon (dallanmanın olmadığı taraftaki) kuyruk olarak adlandırılır.

Örnek olarak, mirsen (2) iki izopren ünitesinin baş-kuyruk kondenzasyonu ile oluşmuştur.



Şekil 2.2. Mirsen

Yine α -pinen (3) de benzer şekilde oluşmuştur.



Şekil 2.3. α -pinen

2.2.1. Terpenoit bileşikler

2.2.1.1. Terpenoitlerin sınıflandırılması

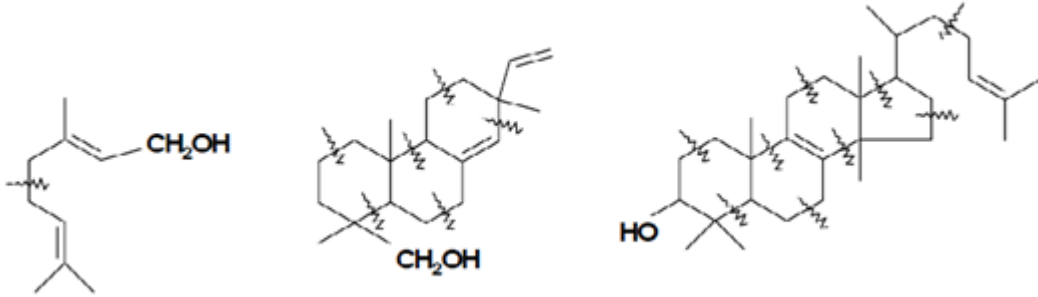
Terpenler içerdikleri karbon atomu sayısına göre sınıflandırılırlar. Bundan dolayı iki izopren ünitesinin biyosentezi yoluyla oluşan 10 karbonlu moleküller monoterpenler, 15 karbonlu moleküller seskiterpenler ve 20 karbonlu moleküller ise diterpenler olarak adlandırılırlar.

Çizelge 1.1. Terpenlerin sınıflandırılması

İzopren sayısı	Sınıfı	Karbon Sayısı
1	Hemiterpenler	5
2	Monoterpenler	10
3	Seskiterpenler	15
4	Diterpenler	20
5	Sesterpenler	25
6	Triterpenler	30
8	Tetraterpenler (karotenoidler)	40
N	Politerpenler	(5) _n

Uçucu yağlarda monoterpen yapısında olan maddelerle bazı seskiterpenlere rastlanmaktadır. Çünkü bunlar uçucu karakterde olan maddelerdir. Seskiterpenlerin bir kısmı ile diterpen ve triterpenler uçucu olmayan maddelerdir. Bunlar da bitkilerdeki uçucu yağ içinde erimiş olarak bulunurlar, ancak su buharı ile sürüklenemediklerinden, elde etme sırasında uçucu yağa geçemezler.

Monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler ve sesterterpenler izopren birimlerin baş-son birleşmesiyle oluşmuşlardır. Triterpenler ve karotenoidler ise sırasıyla C₁₅ ve C₂₀ birimlerinin baş-baş birleşmesiyle oluşmuştur. Şekil 2.4. 'de bazı terpenlerin izopren birimleri gösterilmiştir (Karabacak, 2007).



Şekil 2.4. Terpenlerin izopren birimlerinin gösterilmesi

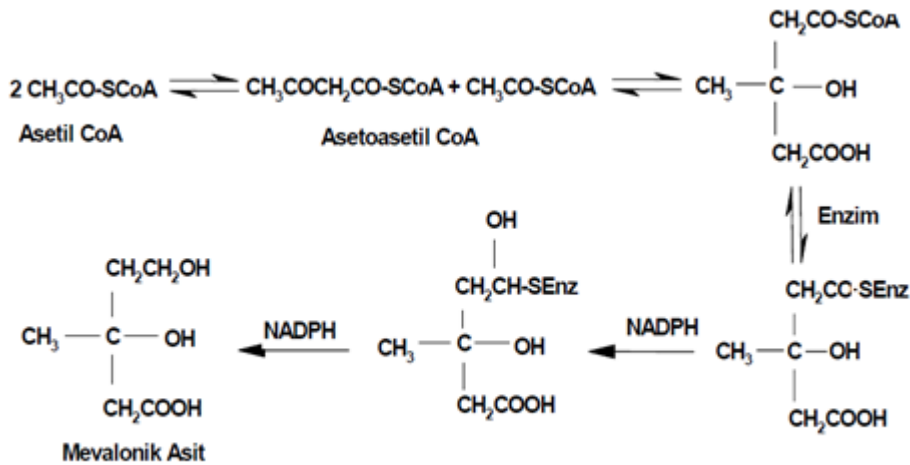
Bitkilerin yapısında serbest halde bulunabildikleri gibi glikozitler, organik asit esterleri ve proteinler ile birlikte bulunurlar.

2.2.1.2. Terpenoitlerin Biyosentezi

Terpenoitlerin biyosentezinde önemli yeri bulunan mevalonik asit 3 mol koenzim A'nın kondenzasyonu ile oluşur. Mevalonik asidin su ve karbondioksit kaybetmesi ile terpenleri oluşturan izopren birimleri meydana gelir.

Şekerlerin oksidasyonu sonucu oluşan asetil CoA, pek çok doğal bileşiğin sentezinde olduğu gibi mevalonik asit sentezinde de başlangıç maddesi olarak kullanılır.

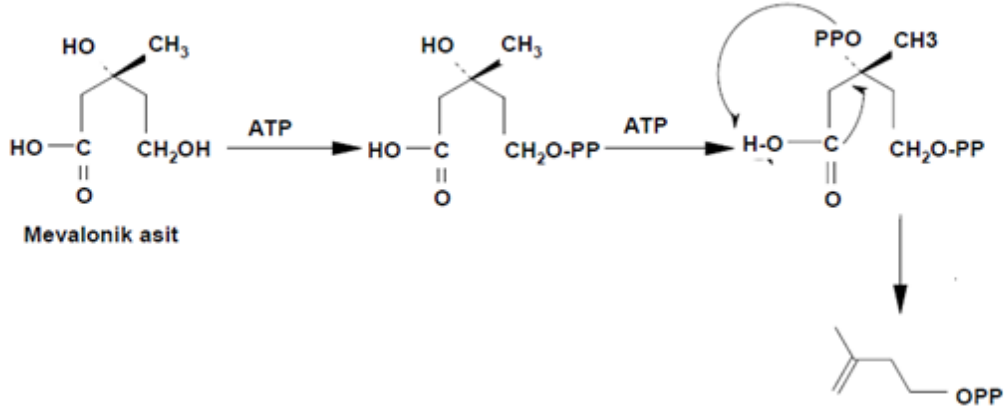
İki mol asetil CoA'nın kondenzasyonundan elde edilen asetoasetil CoA'nın başka bir mol asetil CoA ile birleşmesiyle 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA elde edilir. Bunun ardından enzimatik heterolitik bölünme ve tiyol ester grubunun NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) ile indirgenmesi sonucunda mevalonik asit elde edilir. Bu reaksiyon geri dönüşümsüzdür. Şekil 2.5. 'de mevalonik asidin oluşumu gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Mevalonik asidin oluşumu

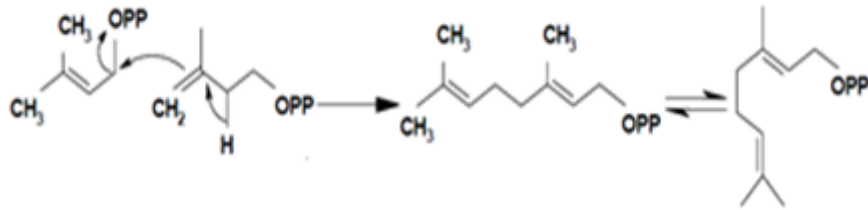
Mevalonik asidin 2 molekül ATP (adenin trifosfat) ile fosfatlanması sonucu mevalonik asit-5-pirofosfat bileşiği oluşur. Bu bileşikteki tersiyer hidroksil grubu da bir mol ATP ile fosfatlanarak daha kolay ayrılabilen bir grup haline gelir. Sonra su ve karbondioksit

çıkmasıyla izopentil pirofosfat molekülü oluşur. Şekil 2.6. 'da izopentil pirofosfatın oluşumu gösterilmektedir.



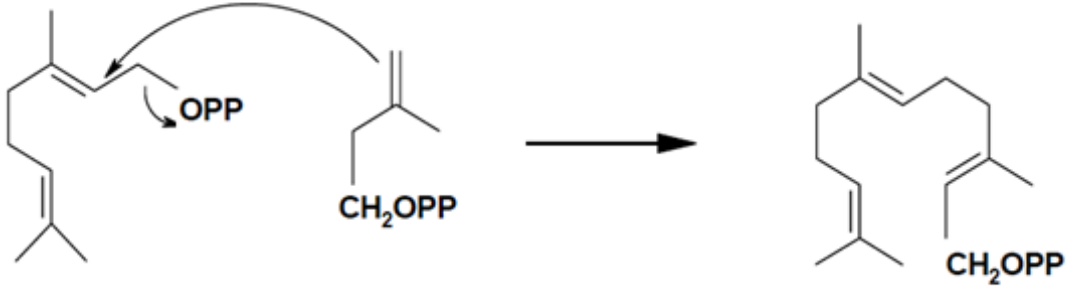
Şekil 2.6. İzopentil pirofosfatın oluşumu

Oluşan izopentil pirofosfatın enzim izomerizasyonu sonucu dimetil allil ester oluşur. Bu iki izomerin birbiriyle olan kondenzasyonu ile geranil pirofosfat oluşur. Bu bileşikte monoterpenleri meydana getirir. Şekil 2.7. 'de geranil pirofosfatın oluşumu gösterilmektedir.



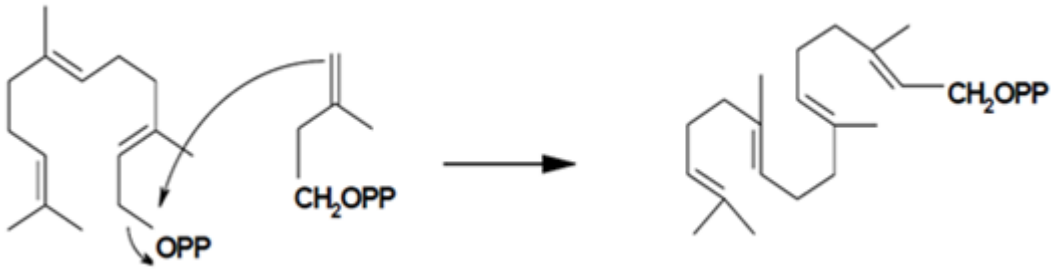
Şekil 2.7. Geranil pirofosfatın oluşumu

Geranil pirofosfatın izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu farnesil pirofosfatı oluşturur. Oluşan bu bileşik seskiterpenlerin geçiş bileşiğidir. Şekil 2.8. 'de farnesil pirofosfatın oluşumu gösterilmektedir.



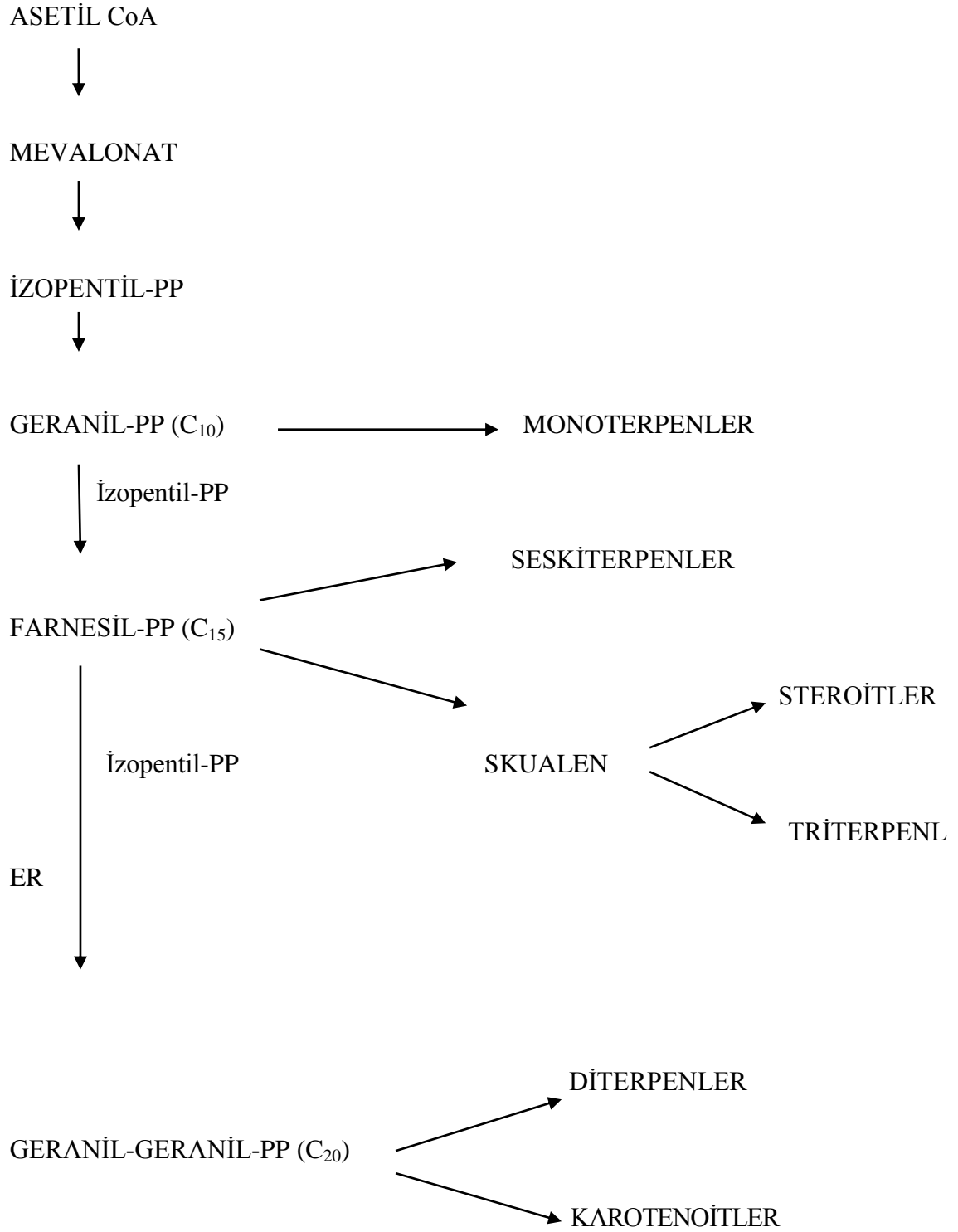
Şekil 2.8. Farnesil pirofosfatın oluşumu

Farnesil pirofosfat yeniden izopentil pirofosfat ile kondenzasyon sonucu diterpenlerin ve karotenoitlerin yapı taşı olan geranil-geranil pirofosfat bileşiğini oluşturur. Şekil 2.9. 'da geranil-geranil pirofosfatın oluşumu gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Geranil-geranil pirofosfatın oluşumu.

İki geranil-geranil pirofosfatın kondenzasyonu ile karotenoitler, iki farnesil pirofosfatın kondenzasyonu ile de triterpenler oluşur. Şekil 2.10. 'da terpen bileşiklerinin oluşumu gösterilmektedir.



Şekil 2.10. Terpen bileşiklerinin oluşumu

2.2.1.3. Terpenoitlerin izolasyonu

Monoterpenler ve seskiterpenler gibi küçük moleküllü terpenoitler su buharı destilasyonu ile, daha büyük moleküllü terpenoitler ise ekstraksiyon yöntemleri ile ayrılabilirler.

Terpenlerin elde edilecekleri materyal kurutularak toz haline getirildikten sonra değişik polaritedeki çözücülerle ekstrakte edilir. Daha sonra uygun kromatografik yöntemlerle saflaştırılır.

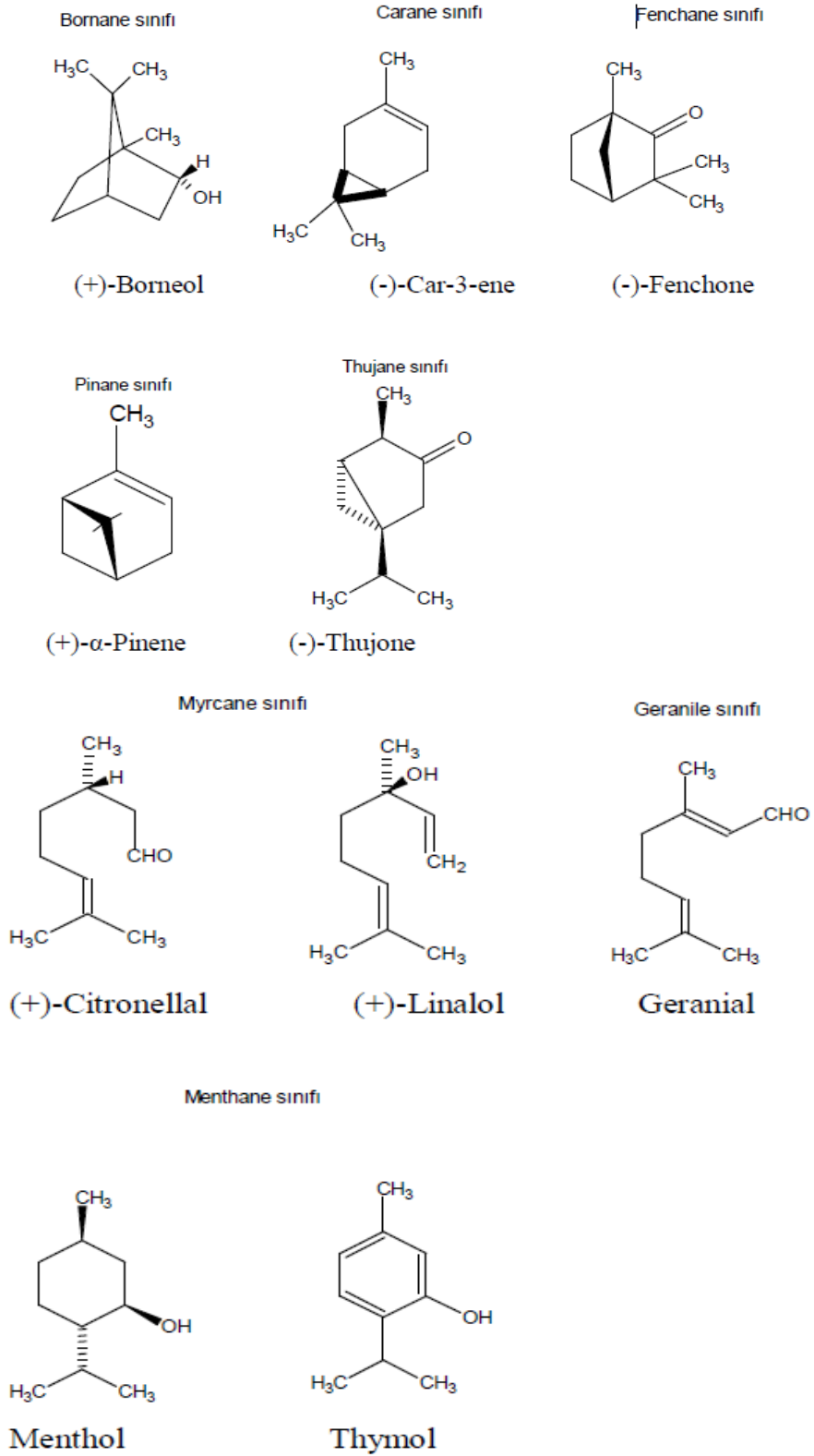
Saflaştırmada genellikle kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri kullanılabildiği gibi MPLC ve HPLC, VLC ve pek çok kromatografik yöntem kullanılabilir (Karabacak, 2007).

2.2.2. Monoterpenler

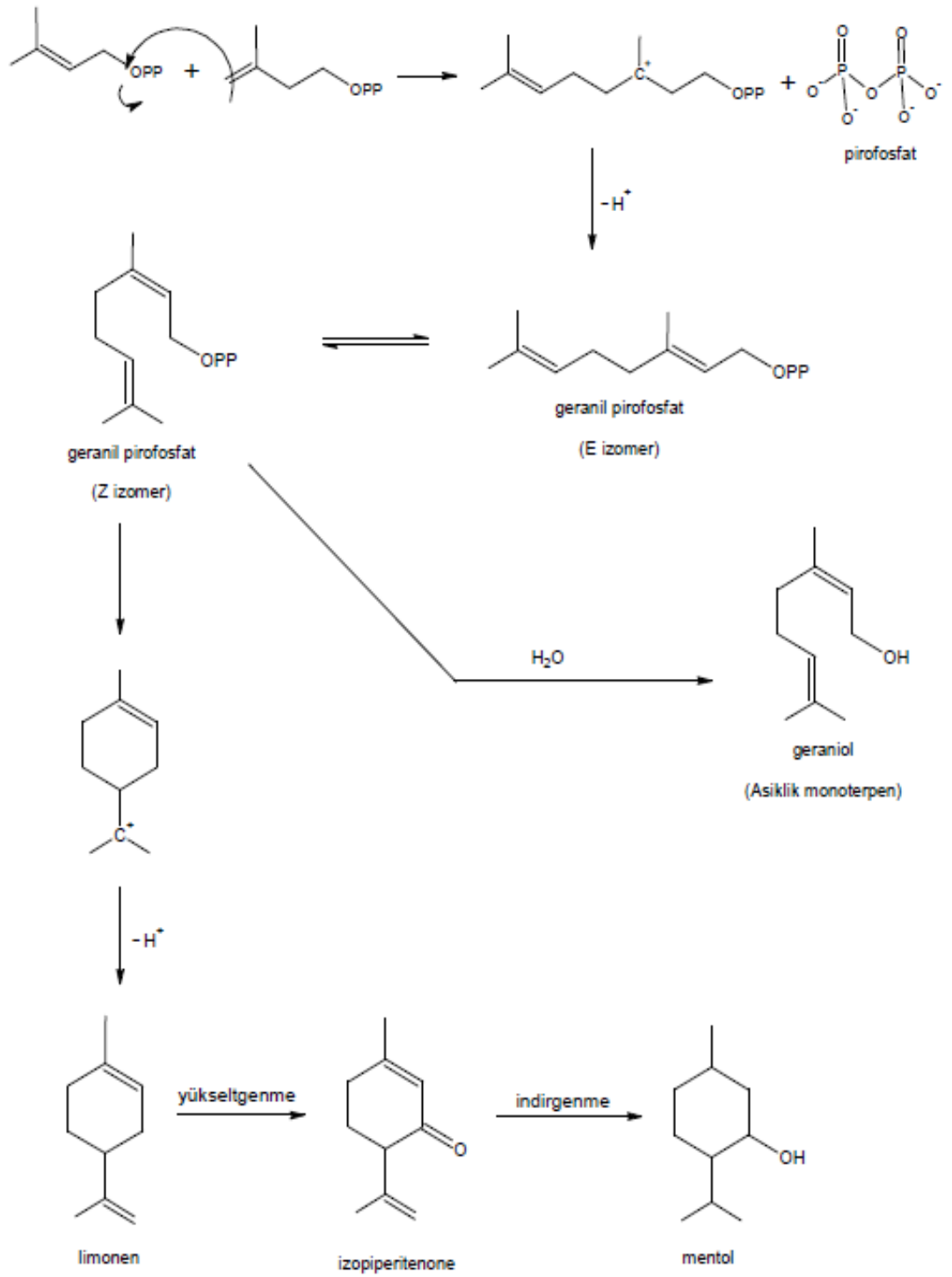
Bir çoğu yüksek bitkilerden izole edilen, 100'den fazla bilinen monoterpen vardır. Ayrıca deniz organizmalarından izole edilmiş halojenli monoterpenler vardır ve monoterpenler bazı böceklerin koruma ve feromon salgılarında da bulunmuştur. Monoterpenlerin öne çıkan karakteristiği, uçuculuğu, keskin kokuları ve bitkilerde bulunan tat ve kokudan sorumlu olan yaygın bileşendir.

Monoterpenler yapısal olarak farklıdır ve yaklaşık 35 farklı yapı vardır. Yapı tipleri asiklik myracene, monosiklik p-menthane ve bisiklik bornane, carane, fechane, pinane ve thujane'yi içerir. Bu grupta ki bir çok monoterpenin optikçe saf formları doğal olarak bulunmasına rağmen bazı bitkilerde her iki enantiyomer bulunabilir (Robbers vd., 1996).

Terpenoidlerin en küçük birimi olan monoterpenler iki izopren izomerinin kondenzasyonu ile monoterpenlerin iskeletinde belirli rol oynayan geranil pirofosfattan oluşur. Şekil 2.11. 'de bazı monoterpenler, Şekil 2.12. 'de monoterpenlerin biyosentezi görülmektedir.



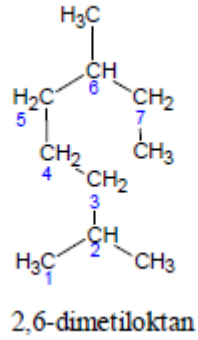
Şekil 2.11. Bazı monoterpenler



Şekil 2.12. Monoterpenlerin biyosentez şeması.

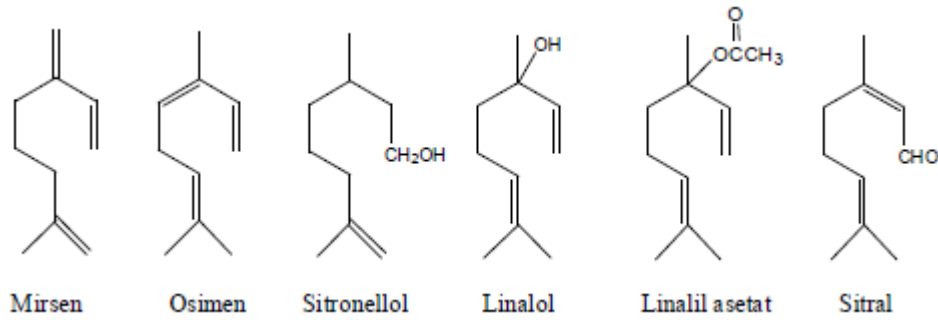
2.2.2.1. Asiklik monoterpenler

Asiklik monoterpenler 2,6-dimetiloktan iskeletini (Şekil 2.13.) taşır ve 3 çifte bağı vardır. Oksijenli türevleri farmakognozi yönünden daha önemlidir. Bu türevler primer alkol, tersiyer alkol, ester ve aldehit grupları taşıyabilir, monoetilenik ya da dietilenik olabilir.



Şekil 2.13. Asiklik monoterpenler

Örneğin; mirsen, osimen, sitronellol, lilanol, linalil asetat ve sitral bileşikleri (Şekil 2.14.) bitkilerden izole edilmiştir.

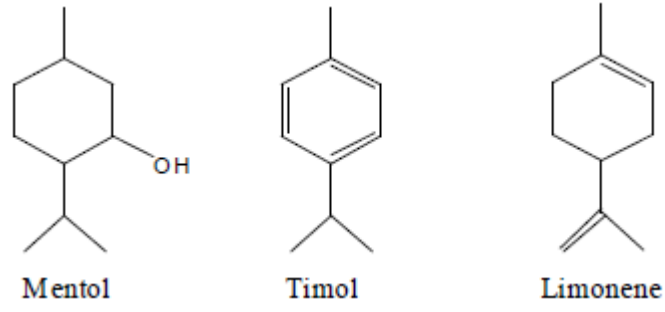


Şekil 2.14. Asiklik monoterpenlere örnekler

2.2.2.2. Monosiklik monoterpenler

Çoğunlukla p-mentan iskeleti taşırlar. Çifte bağı iki tanedir. Oksijenli türevleri sekonder yada tersiyer alkol, ester, keton, epoksit ve peroksit grupları taşıyabilir. Bu bileşikler dietilenik, monoetilenik veya doymuş yapıda olabilir.

Örneğin; mentol, timol ve limonen (Şekil 2.15.) önemli monosiklik monoterpenlerdir.

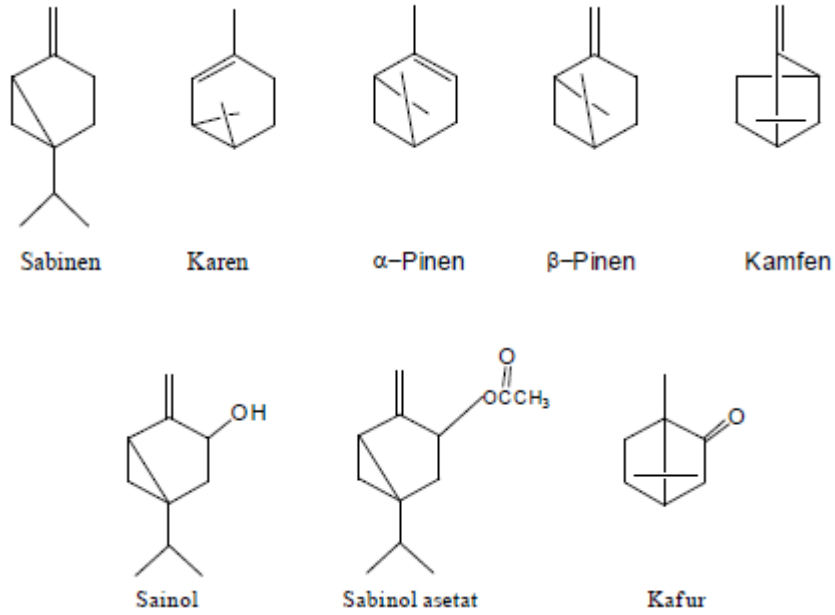


Şekil 2.15. Monosiklik monoterpenler

2.2.2.3. Bisiklik monoterpenler

Bisiklik monoterpenler ya sabinon ya karan ya pinon ya da kamfon iskeletinden türemişlerdir (Şekil 2.16.). Bir çifte bağ taşırlar. Oksijenli türevleri sekonder alkol, ester yada keton grupları taşırlar. Bu bileşikler monoetilenik veya doymuş olabilirler.

Örneğin ; sabinen, karen, α -pinen, β -pinen, kamfen, sabinol asetat ve kafur bileşikleri bisiklik monoterpenlerdir.



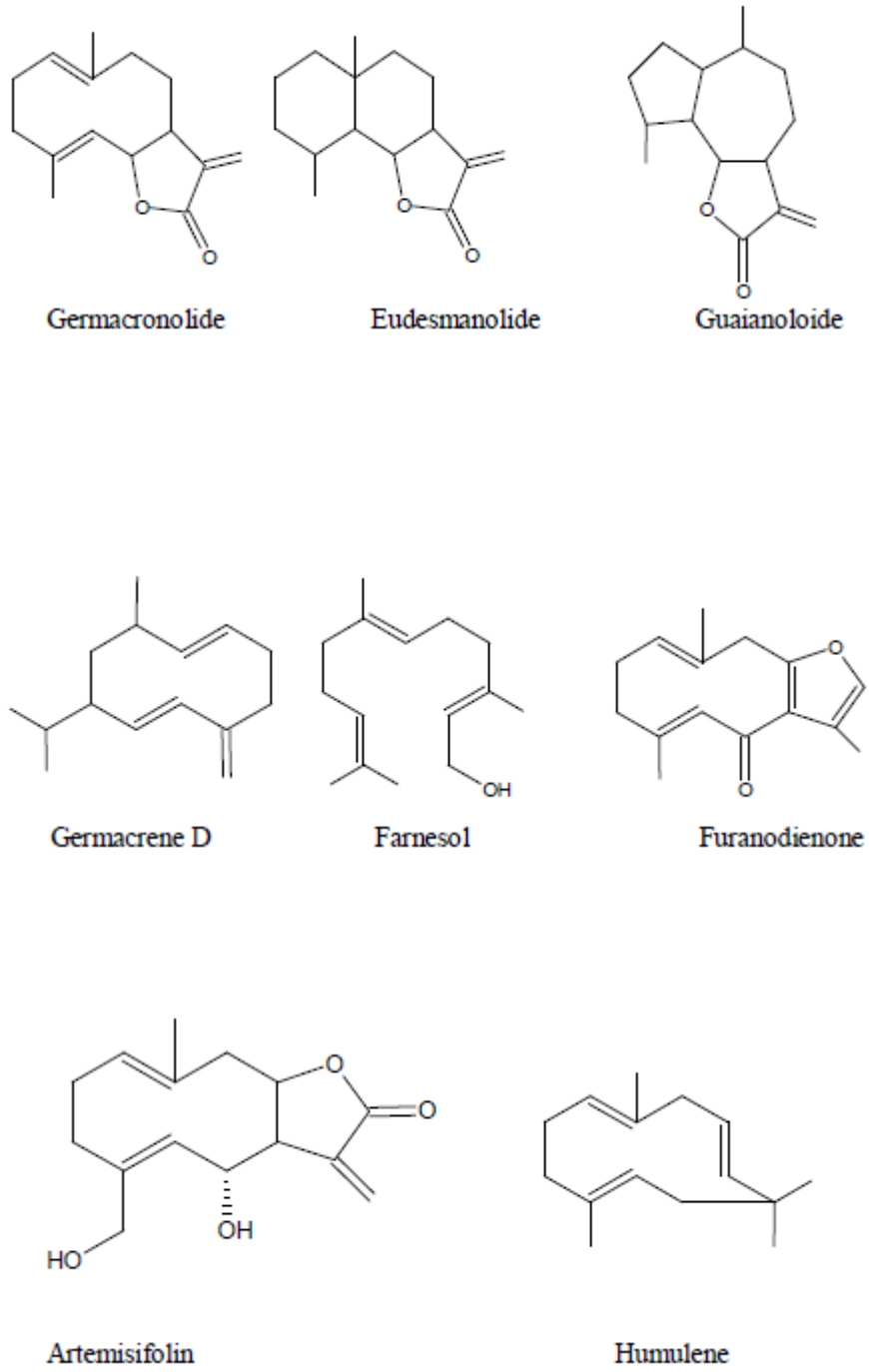
Şekil 2.16. Bisiklik monoterpenler

2.2.3. Seskiterpenler

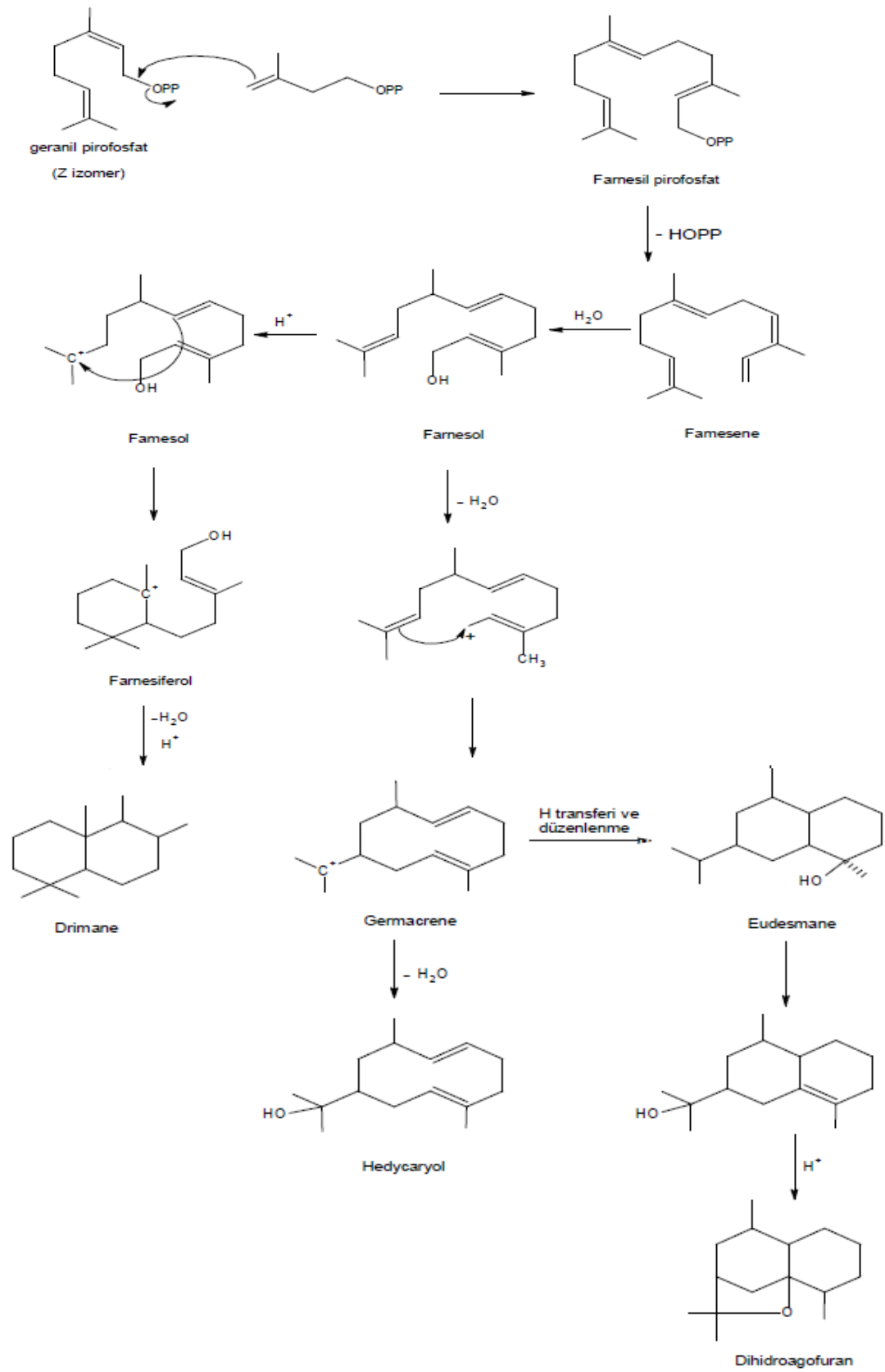
Seskiterpenler 15 karbonlu bileşiklerdir (Şekil 2.17.). Doğada geniş bir dağılıma sahiptir ve terpenlerin en geniş sınıfıdır (Robbers vd., 1996). Monoterpenlerin yapı taşı olan geranil pirofosfat molekülü izopentenil pirofosfat ile kondenzasyona uğrayarak seskiterpenleri oluşturur. Bu yapılar özellikle Compositae familyasında oldukça yaygın olarak bulunurlar. Ülkemizde bu familyaya ait olan Tanacetum ve Inula türleri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Seskiterpenler asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik ve tetrasiklik olarak 5 ayrı formda bulunabilirler. İskelet yapılarının oluşumu sırasında farnesil pirofosfatın trans- ve cis-farnesil katyonlarına dönüştüğü ve farnesil difosfatın siklizasyon ile bir germakradien iskelet oluşturduğu tespit edilmiştir.

Seskiterpenler laktonları diğer seskiterpenlerden bir α -metilen- γ -lakton sistemi varlığıyla farklılık gösterir. Birçoğu, epoksitlerde olduğu gibi α - β doymamış karbon grubu içerir. Bu fonksiyonel grup enzimlerdeki amino grupları ve thiolde olduğu gibi biyolojik nükleofil için reaktif reseptör yeri gibi görev görür (Şekil 2.18.). Sonuç olarak bu bileşikler için geniş bir biyolojik aktivite spektrumu rapor edilmiştir. Örneğin; antimikrobiyal ve antitümör aktivite ve bazıları memeliler için oldukça toksiktir (Robbers vd., 1996).

Seskiterpenler laktonları içerdikleri karboksilik iskelet yapısına göre üç grupta incelenir. 10 üyeli halka germacranolidler, birbirine bağlanmış iki altılı halka eusmonolidler ve yedi üyeli halkaya bağlanmış bir beşli halka guaianolidlerdir.



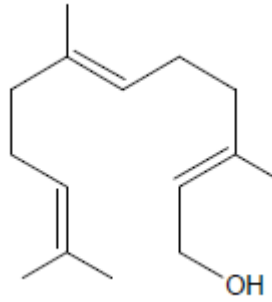
Şekil 2.17. Bazı seskiterpen yapıları



Şekil 2.18. Seskitерpenlerin biyosentezi

2.2.3.1. Asiklik seskiterpenler

Farnesol asiklik seskiterpenlere örnektir (Şekil 2.19.). Ambrette tohumlarının yağında bulunur (Finar, 1975). Leylak kokusundadır. Farnesol aynı zamanda bazı böceklerde hormon ödevi de görür ve kurtçuk şeklinden güve şekline dönüşümü başlar (Solomons ve Fryhle, 2002).

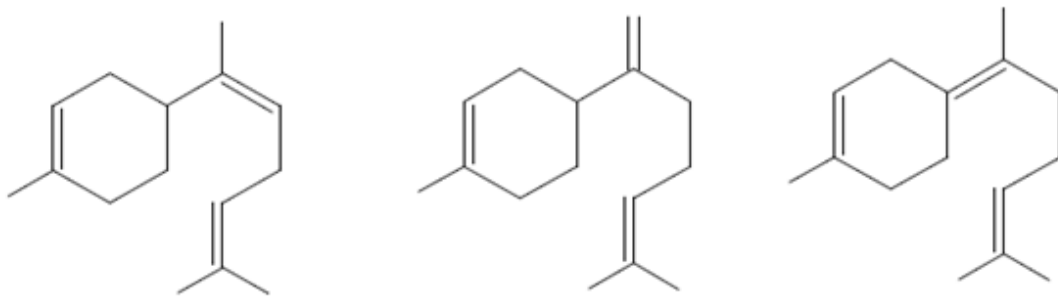


Şekil 2.19. Farnesol

2.2.3.2. Monosiklik seskiterpenler

Dört farklı tip monosiklik seskiterpen yapısı bilinmektedir: bisabalone, elemene, humulane ve germacrene.

Bisabolene mür ve diğer esansiyel yağlarda bulunur. Bisabolene için üç yapı yazmak mümkündür: α -bisabalone, β -bisabalone, γ -bisabalone'dir (Şekil 2.20. Finar, 1975)

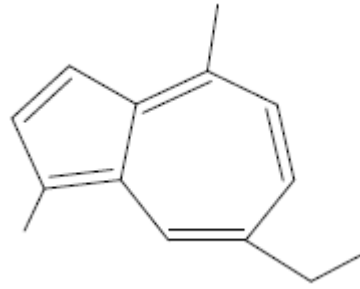


Şekil 2.20. Bisabolene'nin üç yapısı

2.2.3.3. Bisiklik seskiterpenler

Bisiklik seskiterpenler, cadinane, eudesmane ve perhidroazulen grubu olmak üzere üç grupta incelenir (Finar, 1975)

Kamazulen (Şekil 2.21.) mayıs papatyası olarak bilinen bitkiden elde edilen ve boğaz ağrılarında gargara olarak kullanılan bisiklik seskiterpendir (Tanker ve Tanker, 1990).



Şekil 2.21. Kamazulen

2.2.3.4. Trisiklik seskiterpenler

Cedrene ve Longifolene (Şekil 2.22.) olmak üzere iki gruptur (Finar,1975).



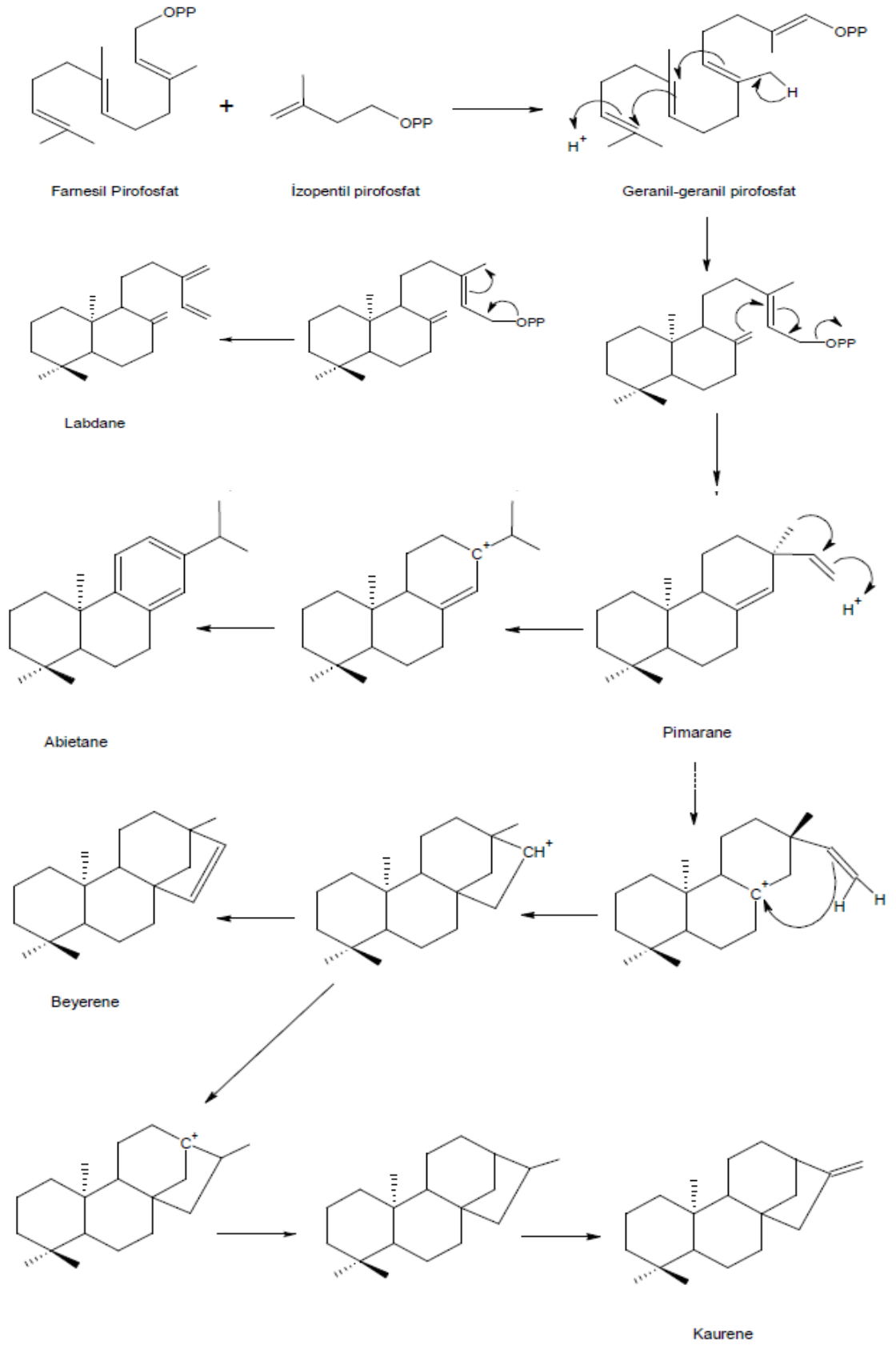
Şekil 2.22. Trisiklik seskiterpenler.

2.2.4. Diterpenler

Diterpenler 2E, 6E, 10E geranil-geranil pirofosfattan türemiş doğal izoprenoid ürünler ailesinin en çok bulunan üyeleridir. Esas olarak bitki ve mantar orijinli olmalarına rağmen deniz ve böcek dünyasında da bulunmaktadır. Triterpen ve steroidlerden farklı olarak diterpenlerde kolay oksitlenme görülür. Bu nedenle diterpenlerde komşu grup desteğinden dolayı yapısal reaksiyonlarda birçok farklılık gözlenir ve bu yüzden önemlidir. Ayrıca bunlardaki gruplar arasında bağ yapmayan iç etkileşmeler, özellikle 1,3 diaksial etkileşmeler bulunmaktadır. Köprülü halka sistemlerinin bulunuşu, özellikle tetrasiklik diterpenlerde non-klasik karbokasyon oluşumunu destekler ve Wagner-Meerwein düzenlenmesi gözlenir.

Doğal ürünler içerisinde, diterpenler en geniş biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerdir. Diterpenler hormonları geliştiren bitkilerde bulunmaktadır. Örneğin Gibberalin; bitki büyüme hormonu, Podolacton; bitki büyüme inhibitörü, Cloradane; acı maddeler, Antifeedantlar; böcekleri, Antitümör; kanser etkisi ve bazı antibiyotiklere benzer özellikleri, bunun yanı sıra yüksek tansiyonu düşürücü etkisi olduğu gibi solerol ürünlerinin parfümeri endüstrisinde kullanıldığı görülmektedir.

Diterpenler arasında bulunan yapı türülüğünün farklılığı fitokimyanın gelişmesini de kolaylaştırmaktadır. Gerçekte diterpenlerin birçoğu kimyasal ayırmalar, incelemeler sonucu bulunmuşlardır. Ayrıca kompleks diterpen karışımının izole edilmesi değişik ekstraksiyon sistemleri ve ayırma yöntemlerinin gelişmelerine yol açmıştır. Ayrıca biyolojik aktivite sıklık diterpenlerde daha fazla görülür (Şekil 2.23.) (McMurry, 1986)



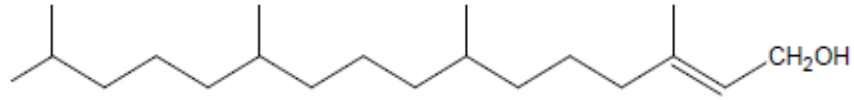
Şekil 2.23. Diterpenlerin biyosentezi için önerilen mekanizmalar.

Biyogenetik çeşitlilik diterpenler için de söz konusudur. Literatürde 70 farklı diterpen iskeleti rapor edilmiştir. Bunların 20 tanesi ana diterpen iskeletleri geri kalan 50 tanesi ise yaygın olmayan diterpen iskeletleri olarak sınıflandırılmışlardır. Yaygın diterpen iskeletleri lineer, totarol, labdan, kauren, pimarane, kasan, abieatan, rozan, beyeren, kaurene, alkaloids, gibbera, taksan, trachyloban, cembran, atisen, kolevan, ericacan, fujinan ve tiglian olarak adlandırılmıştır (Devon ve Scott, 1992).

Sideritis türlerinde genellikle kauren diterpenler yaygın olarak bulunmaktadır. Fakat kauren diterpenlerin yanında labdan, pimarane ve beyeren diterpenler de nadir de olsa bulunmaktadır. Ülkemizde mevcut olan bir diğer Labiatae familyası üyesi Salvia türlerinde abietanlar, Teucrium ve Inula türlerinde ise kloedan ve neokloedanlar yaygın olarak bulunmaktadır (Ulubelen vd., 2000).

2.2.4.1. Asiklik diterpenler

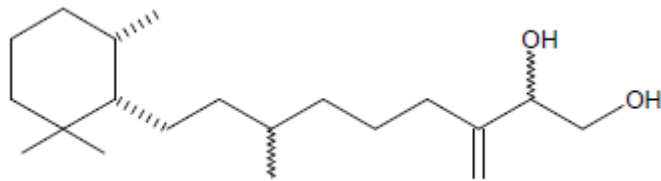
Halkalı olmayan bu diterpenler yapıları 20 karbon ve bağlı süstitüentlere göre yirminin üzerinde karbona sahip olan doymuş ya da doymamış yapılardır. Örnek olarak fitol verilebilir (Şekil 2.24.).



Şekil 2.24. Asiklik diterpenlere örnek (fitol).

2.2.4.2. Monosiklik diterpenler

Karasal bitkilerde çok yaygın olmamakla birlikte bu tür diterpenler özellikle deniz yosunlarından elde edilmişlerdir. Nadir gözlenen bu yapılara örnek olarak bir kırmızı alg olan *Laurencia viridis*'den elde edilen epimerik moleküller viridolis A verilebilir (Şekil 2.25.).

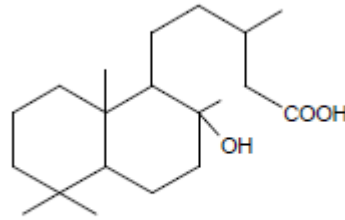


Şekil 2.25. Viridolis A

2.2.4.3. Bisiklik diterpenler

Bisiklik diterpenler labdanlar ve kloedans olmak üzere iki iskelet yapısında incelenir.

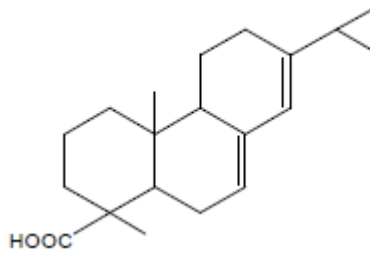
Çam ağacının kabuğundan sızan oleoresinin su buharı destilesinden elde edilen tortu, rosin, bir asit karışımıdır. Bu asitlerin bir kaçı bisiklik diterpenlerdir. Örnek olarak labdanoik asit verilebilir (Şekil 2.26.) (Finar, 1975).



Şekil 2.26. Labdanoik asit

2.2.4.4. Trisiklik diterpenler

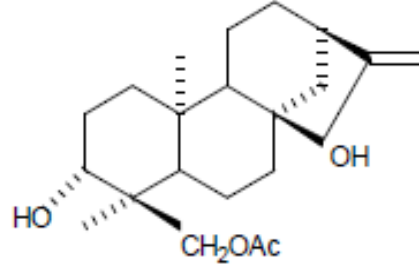
Trisiklik diterpenler pimaralar, abietanlar, kasanlar, rosanlar olmak üzere dört iskelet yapısına sahiptir. Örnek olarak abietik asit verilebilir (Şekil 2.27).



Şekil 2.27. Abietik asit

2.2.4.5. Tetrasiklik diterpenler

Tetrasiklik diterpenleri kaurenler ve beyerenler olarak iki grupta incelenebilir. Linearol bir tetrasiklik diterpen molekülüdür (Şekil 2.28).

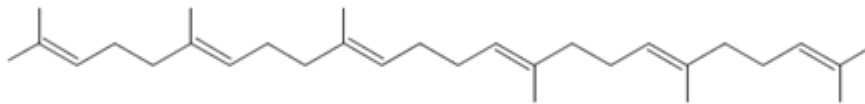


Şekil 2.28. Linearol

2.2.5. Triterpenler

Triterpenler altı izopren ünitesinden biyosentetik olarak elde edilebilir ve ilk asiklik 30 karbonlu üye squalendir. Squalende çeşitli şekilde halka kapanması triterpenlerin çeşitli iskelet yapılarında olmalarına neden olur. Gerçekte 4000 doğal triterpen izole edilmiştir ve 40'dan fazla iskelet tipi belirlenmiştir. Triterpenler iki ana sınıfa ayrılabilirler. Tetrasiklik triterpenler ve pentasiklik triterpenlerdir.

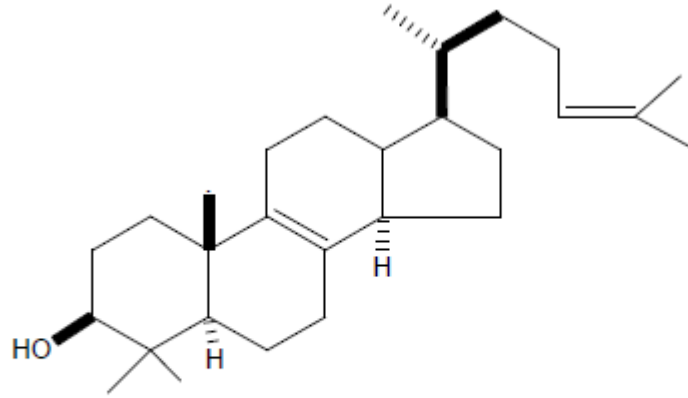
Squalene ($C_{30}H_{50}$) köpekbalığının karaciğer yağından izole edilmiştir. Diğer kaynakları bitkisel yağlar ve zaytinyağıdır. Nikel ile katalitik hidrojenasyon squaleni perhidrosqualene ($C_{30}H_{62}$) dönüştürür, bu yüzden squalenin altı tane çift bağı vardır ve asiklidir. Squalenin ozonolizi, laevulik asidi verir, buda squalende izopren ünitesinin varlığını gösterir. Squalen sodyum ve amil alkollerle indirgenmediğinden molekülde konjuge çift bağ yoktur. Squalenin molekül yapısına bakıldığında (Şekil 2.29.), molekülün merkez bölümünde birbirine kuyruk kuyruğa bağlı iki izopren molekülü olduğuna dikkat edilmelidir (Finar, 1975).



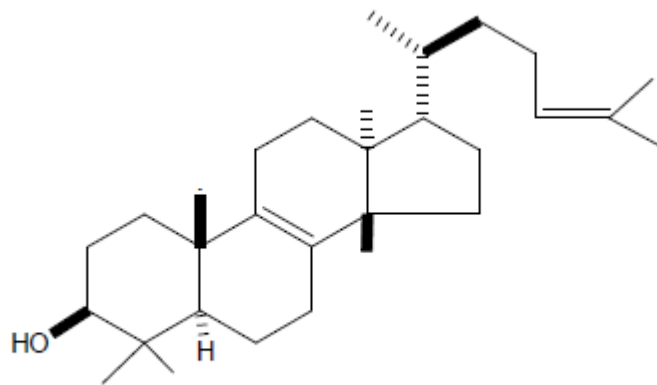
Şekil 2.29. Squalenine

2.2.5.1. Tetrasiklik triterpenler

Steroid karbon iskeleti içeren önemli bir bileşik sınıfıdır. Bu sınıf temelde iki grupta incelenir; lanosterol ve euphol grubudur (Şekil 2.30.).



Lanosterol

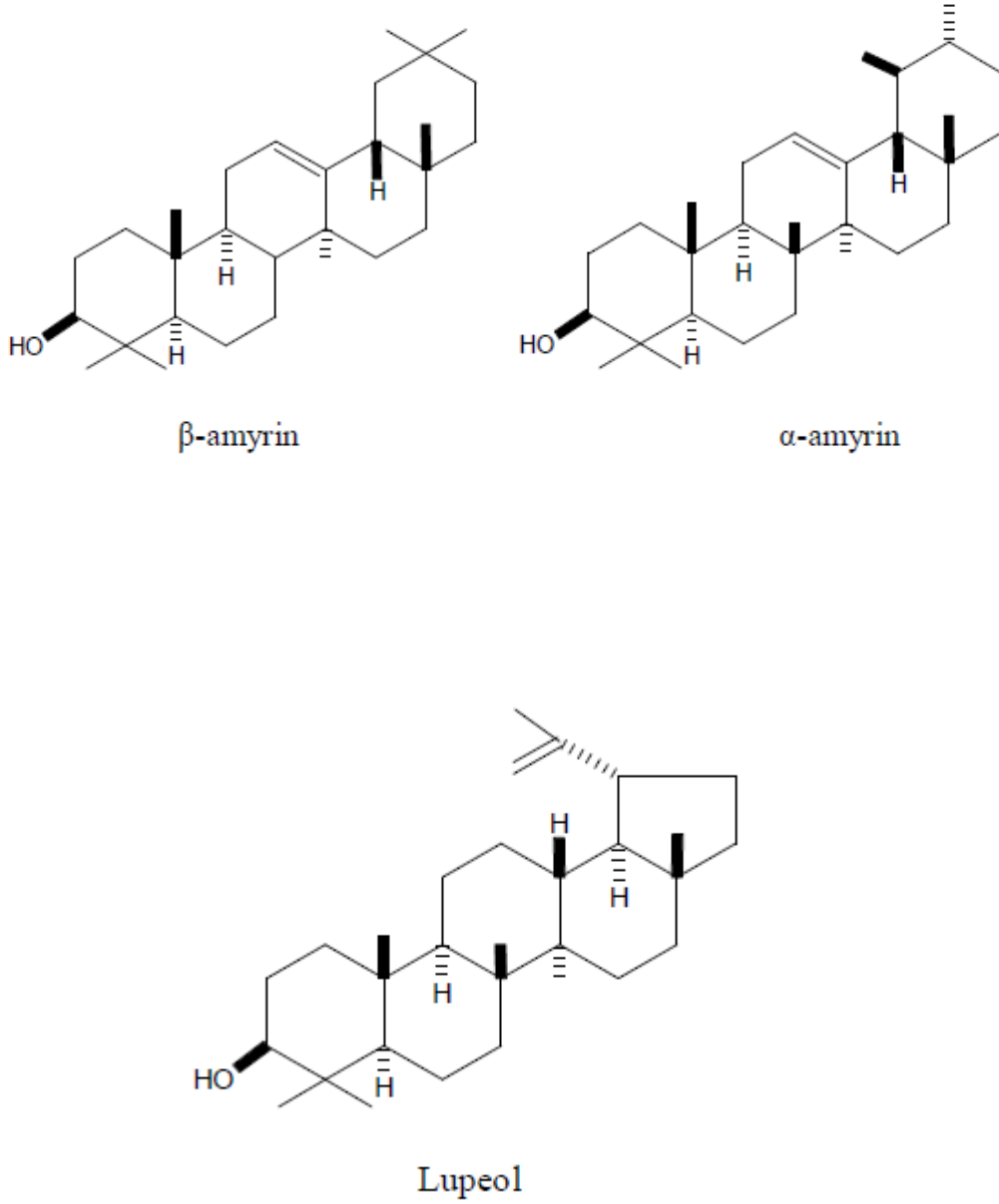


Euphol

Şekil 2.30. Tetrasiklik triterpenler

2.2.5.2. Pentasiklik Triterpenler

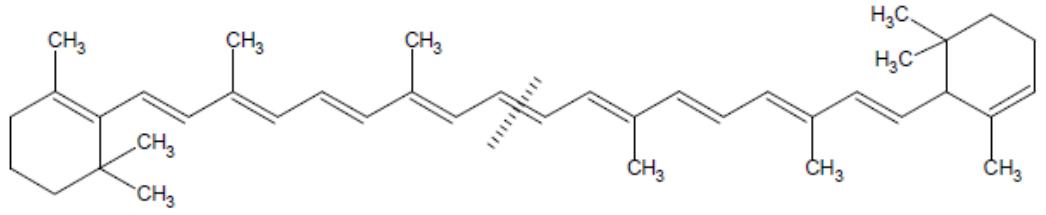
Bunlarda çeşitli alt gruplarda incelenir. Örnek olarak; oleanane grubu, ursane grubu, lupane grubu verilebilir (Şekil 2.31.).



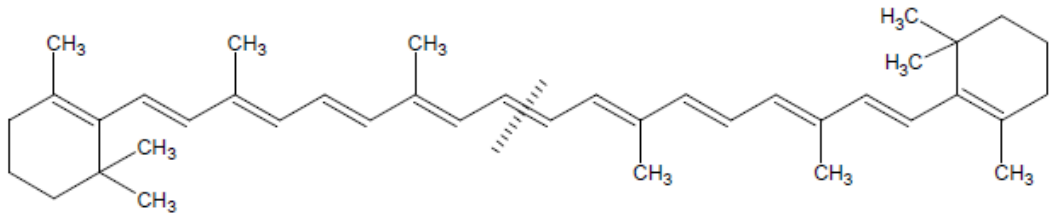
Şekil 2.31. Pentasiklik triterpenler

2.2.6. Tetraterpenler

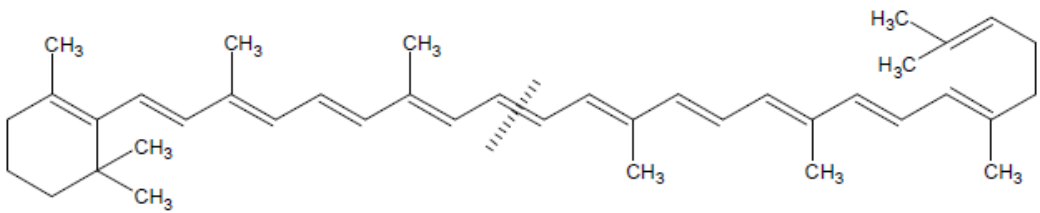
Karotenler, tetraterpenlerdir (Şekil 2.32.). Bunlar kuyruk-kuyruğa bağlanmış iki terpen gibi düşünülebilir.



α - Karoten



β - Karoten



γ - Karoten

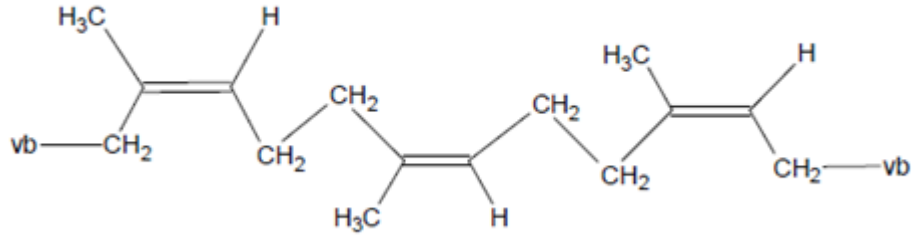
Şekil 2.32. Tetraterpenler

2.2.7. Politerpenler

Politerpenlerin en bilinen üyesi kauçuktur (Şekil 2.33.). Kauçuk diğer adıyla lateks daha çok tropik bölgelerde yetişen ağaçlardan elde edilen bir politerpendir. Ağacın gövdesinde herhangi bir kesik açıldığında lateks buradan sızmaya başlar. Asetik asit ilavesi kauçuğu çözültiden ayrılabilir şekilde pıhtılaştırır ve yapraklara sarılır ve ya bloklara bastırılır. Son olarak ılık hava akımında kurutulur veya tütsülenir (Karahan, 2007).

Kauçuğun yıkıcı destilasyonu ana ürün olarak izopreni verir. Bu kauçuğun izopren bir polimeri olduğu fikrine neden olur ve böylelikle moleküler formül $(C_5H_8)_n$ olur. Bu moleküler yapı saf kauçuğun analizleri ile doğrulanmıştır (Finar, 1975).

Doğal kauçuk, izoprenin 1,4 katılma polimeri olarak görülebilir. Doğal kauçuğun oluşumunda, izopren birimleri baş-kuyruğa bağlanır ve tüm ikili bağlar cis'tir (Robbers vd., 1996).



Şekil 2.33. Doğal kauçuk

2.3. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

2.3.1. Destilasyon yöntemi

Destilasyon, sıvıların kaynama noktalarındaki farklardan yararlanılarak gerçekleştirilen bir ayırma işlemidir. Bu yöntem ile elde edilen uçucu yağlar:

- Yüksek oranda kaynama noktası düşük bileşikleridir.
- Az miktarda kaynama noktası yüksek ve suda çözünen bileşikler içermektedir.

Destilasyon yöntemleri, su destilasyonu, buhar destilasyonu ve vakum destilasyonu olmak üzere 3'e ayrılmaktadır.

2.3.1.1. Buhar destilasyonu

Bu yöntemde cam kap içerisine yerleştirilen bitki materyaline basınç ile uygulanan buhar, yağ damlacıklarını da beraberinde sürükleyerek toplama kabına getirmektedir. Yağ burada yoğunlaştırılarak sudan ayrıştırılmaktadır (Linskens ve Jackson 1997b).

2.3.1.2. Vakum destilasyonu

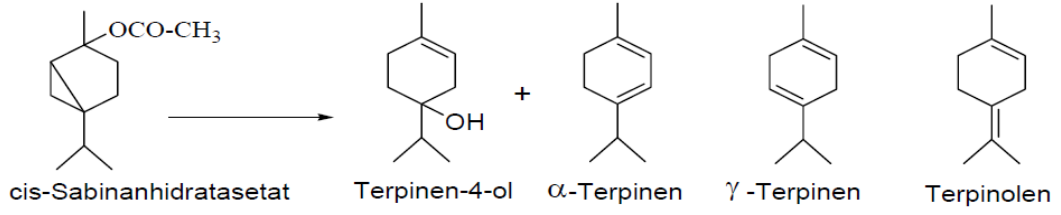
Kaynama noktaları oldukça yüksek olan bileşikleri elde etmek amacıyla sıcaklığı artırmak yerine basıncı düşürmek daha etkilidir. Basınç bir kez bileşiğin buhar basıncının altına indirilirse kaynama ve destilasyon işlemi başlamaktadır.

2.3.1.3. Hidrodestilasyon

Bu yöntem, uçucu türden bileşiklerin elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Küçük ölçekteki üretimlerde Clevenger tipi aparatla yapılan destilasyon işlemi, büyük endüstriyel uygulamalarda destilasyon kazanlarında (farklı büyüklükteki imbikler) gerçekleştirilmektedir.

Yöntemin özü; soğutucuya bağlanan bir cam balonun içerisinde su ile bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılmasına dayanmaktadır. Toplanan uçucu yağ miktarı hacimsel olarak ifade edilir. Bu yöntem, en iyi toz halindeki materyallerde sonuç vermektedir. (Linskens ve Jackson, 1997b).

Elde edilen yağın miktarı çok olmakla birlikte, suyun kaynatılması süresince uygulanan yüksek sıcaklık, termal bazı reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu olayın sonucunda artifak oluşumu, hidroliz ve izomerizasyon olayları meydana gelmektedir. Şekil 2.34. 'de sıcaklık etkisi ile meydana gelen ve destilasyon yöntemlerinde sıkça rastlanılan bir termal degradasyon olayı görülmektedir. Uçucu yağların bileşimi pH'a bağlı olarak değişse de su destilasyonu yönteminde genellikle sıvının pH değeri kontrol edilmemektedir (Fakhari vd, 2005).



Şekil 2.34. Sabinanhydratasetat'ta meydana gelen termal degradasyon (Rowe, 1989)

2.3.2. Ekstraksiyon yöntemi

Ayrıştırma yöntemlerinden bir diğeri de ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntem, geleneksel ve yeni metotlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Sokslet ekstraksiyonu ve maserasyon işlemi geleneksel yöntemler arasındadır. İşlem süresi uzundur ve büyük miktarlarda çözücüler kullanılmaktadır. Süper kritik sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu ise son yıllarda geliştirilmiş hızlı, etkin ve modern yöntemlerdendir. (Moyler, 1993). Etkin bir ekstraksiyon için sıcaklık önemlidir.

2.3.2.1. Çözücü ekstraksiyonu

Geleneksel bir ekstraksiyon yöntemi olup, bitki örneği doğrudan oda sıcaklığında çözücünün içerisine konabileceği gibi Sokslet içerisinde organik çözücü ile kaynatılmaktadır. Endüstriyel çalışmalarda çözücü olarak hekzan ve etanol; analitik laboratuvar çalışmalarında da eter ve pentan-diklormetan yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekstraksiyon sonucunda, çözücü destilasyon ile ortamdaki uzaklaştırılarak geri kazanılmaktadır. Kalan yağimsı kısım içerisinde uçucu bileşikler bulunmaktadır.

Bu yöntemin buhar destilasyonuna göre bazı avantajları vardır. Ekstraksiyon sırasında düşük sıcaklık kullanılması bunlardan birisidir. Genellikle sıcaklık, Sokslet cihazında 60 °C den az ve daldırma yönteminde ise 5-25 °C arasındadır. Düşük sıcaklık, elde edilen uçucu yağın buhar destilasyonuna göre daha doğal bir içerik oluşturmasını sağlamaktadır (Linskens ve Jackson, 1997b).

Bunun yanında çözücü ekstraksiyonunun dezavantajları da vardır. Bunlardan birisi ekstraksiyon sonrasında yoğunlaştırma işleminde molekül ağırlığı düşük uçucu bileşiklerin kaybedilmesi ve artifağın oluşumudur. Diğer birisi ise ekstraksiyon sonrasında artan çözücüdür. Bu sorun hem ekonomik açıdan hem de çevre kirliliği

yönünden çok önemlidir. Saf ve yüksek kalitedeki çözücüler pahalı ve büyük miktarlarda kullanıldığı takdirde maddi bir yük getirmektedir.

2.3.2.2. Süperkritik sıvı ekstraksiyonu

Doğal ürünlerin çözücülerle muamele edilmesi çevre ve sağlık açısından son yıllarda pek istenmeyen bir olgu haline almıştır. Bu anlamda daha az çözücü harcayan, ekstraksiyon süresi daha kısa ve normal şartlarda yüksek sıcaklıkta çözünen bileşikleri ayrıştırma özelliği ile süperkritik sıvı ekstraksiyonu giderek büyük ilgi çekmektedir (Yamani vd., 2007).

Süperkritik sıvı ekstraksiyonu, gerçekte bir çözücü ekstraksiyon yöntemidir. Organik çözücüler yerine, süperkritik sıvı özelliğindeki maddeler çözücü amaçlı kullanılmaktadır. Bir madde, kritik sıcaklık (Tc) ve kritik basınç (Pc) noktasının üzerinde süperkritik sıvı özelliği göstermektedir. Bu durumda, süperkritik sıvı termodinamik özellikleri bakımından sıvı ve gaz arasında yer almaktadır. Sıvı çözücülerin çözme gücü ile birçok maddeyi çözebilirken bunun yanında gazlara yakın difüzyon katsayısı özelliği ile de çözünen maddeyi hızla yaymaktadır (Linskens ve Jackson, 1997b).

Süperkritik sıvıların düşük akışkanlıkları, sıvıların yüksek difüzyon katsayıları ile birleşince bitkiler için ideal bir ekstraksiyon maddesi olarak ortaya çıkmaktadır. (Porta, 1999).

Karbondioksitin süperkritik noktası, 1869'da Andrews tarafından keşfedilmiştir. Çözücü olarak ilk önemli kullanımı ise 1960'lar da Rusya ve A.B.D.'de olmuştur. Güvenli olması, yanıcı olmaması, ucuz ve az bir kokusu olması nedeniyle karbondioksit, düşük viskozitesi sayesinde bitkilere kolayca nüfuz edebilmektedir. Bununla birlikte atık bırakmadan kolayca buharlaşabilmektedir. Süperkritik CO₂, N.Ş.A.'da, 200-300 bar ve 40-50°C'de bitki ekstraksiyonu amacıyla kullanılmaktadır. Ekstraksiyon sırasında değişken sıcaklık ve basınç etkisi ile uçucu yağlara özgü belli bileşikler ayrıştırabilmektedir. Çizelge 2.2. 'de sıvı CO₂ 'de çözünebilir madde grupları görülmektedir (Moyler, 1993; Congiu vd. 2002; Pourmortazavi, 2004).

Çizelge 2.2. Süperkritik sıvı karbondioksitte çözünebilir madde grupları (Moyler, 1993).

Kolay çözünenler	Az çözünenler	Hiç çözünmeyenler
<ul style="list-style-type: none">• Düşük molekül ağırlığa sahip organikler,• Tiyoller, Tiyaziller, Pirazoller• Asetik asit, Benzaldehit, Hexanol ve gliserol asetatlar,• Molekül ağırlığı 250'ye kadar olan bileşikler.	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek molekül ağırlıktaki organikler,• Su, oleikasit, gliserol, decanol• Doymuş yağlar• Molekül ağırlığı 400'e kadar olan bileşikler	<ul style="list-style-type: none">• Şekerler, proteinler• Klorofil, karatenoidler, sitrik ve malik asitler,• Amino asitler, nitratlar, pestisitler, insektisitler• Molekül ağırlığı 400'ün üzerinde olan bileşikler

2.3.2.3. Mikrodalgayla ekstraksiyon

II dünya savaşından bu yana kullanılan mikrodalga teknolojisinin, analitik laboratuvarında kullanımı yüzyılın sonunda olmuştur. Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine bağlıdır. Bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olmaktadır. Polar moleküller ile iyonik türlerin bulunduğu durumlarda daha hızlı bir enerji yayılması gerçekleşmektedir. Mikrodalga yönteminin avantajı moleküllerin kutuplarında ki yükseltgenen zayıf hidrojen bağlarının bozunmasıdır. Klasik temas yoluyla ısı iletimi yöntemlerinin tersine, mikrodalga örneğin tümünü aynı anda ısıtmaktadır. Mikrodalga sayesinde ekstraksiyon iki farklı sistemle gerçekleştirilmektedir. Sıcaklık ve basınç kontrol edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer bir yöntem de atmosferik basınç altında açık kap içinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresi ve çözücü miktarının büyük oranda az olmasıdır. Bu yöntemle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar kolaylıkla ayrıştırılabilmektedir (Kaufmann ve Christen 2002; Kaufmann vd., 2007; Beejmohun vd., 2007).

2.3.2.4. Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyon

Klasik ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen bir yöntemdir. Ekstraksiyon süresi, çözücü tüketimi, verim ve tekrarlanabilirlik gibi avantajları bulunmaktadır.

Yöntemin etkinliğini artırmak amacıyla yüksek basınç ve sıcaklıkta organik çözücüler kullanılmaktadır. Sıcaklığın artması, ekstraksiyonun kinetiğini hızlandırırken, yükseltile basınc da çözücüyu sıvı halde tutar. Böylece güvenli ve hızlı bir ekstraksiyon sağlanır. Bunun yanında yüksek basınç, çözücünün, deney materyalinin iç kısımlarına kadar nüfuz etmesine imkan sağlar. (Kılıç, 2008).

Bu yöntem gereğince, çelik bir kap içine yerleştirilen katı ya da yarı katı örnek çözücü ile bir fırın içerisinde 50-200 °C arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılır. Böylece ısıtma esnasında fırına 500-3000 psi değerleri arasında basınç uygulanır. Ekstraksiyonun beş ve 10. dakikalarında ortama yeni çözücü pompalanarak, örneğin ve kabın yıkanması sağlanmalıdır. (Kaufmann ve Christen, 2002).

2.3.3. Mekanik yöntem (Presleme)

Bazı turunçgillerin kabuklarında ki uçucu bileşikler, destilasyon yöntemi uygulandığında bozunmaya uğramaktadır. Bu nedenle bu tür meyvelerin kabukları bez bir torbaya konup, soğuk hidrolik preslerde sıkılırsa uçucu yağlar elde edilebilmektedir (Ceylan, 1983; Kılıç, 2008).

2.4. Uçucu Yağların Miktar Tayini

Uçucu yağların miktarlarının tayin edilmesi amacıyla birisi volümetrik diğeri gravimetrik olmak üzere iki farklı yöntemden faydalanılmaktadır. Volümetrik miktar tayini yöntemlerinin özü, bitkiden su buharı destilasyonu ile ayrılan uçucu yağı dereceli bir kaptan toplayarak hacmini ölçmektir.

Bu yöntem sonucunda, uçucu yağ miktarı hacim/ağırlık olarak bulunur. Yağın yoğunluğu ölçülerek, ağırlık/ağırlık olarak yüzdesi hesaplanabilir.

Diğeri yöntem olan gravimetrik yöntemde ise, uçucu yağ su buharı destilasyonu ile ayrılmaktadır. Su-yağ karışımından oluşmuş destilat, tuz ile doyurularak organik bir çözücü ile çekilmektedir. Çözücü, darası alınmış bir kaptan uçurularak kalan miktarın ölçümü yapılır ve ağırlık/ağırlık olarak yüzde miktarı hesaplanır (Tanker ve Tanker, 1998; Karadeniz, 2001).

2.5. Uçucu Yağdaki Bileşiklerin Belirlenmesi

Bir karışımdaki organik bileşikler gaz kromatografisi yöntemi ile kolayca ayrılarak tanınabilir. Kütle spektrometrisi, yüksek duyarlılığı ve tarama hızı sayesinde bir gaz kromatografadan elde edilen çok az miktarda maddenin yapısı hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılan uygun bir yoldur. Her iki tekniğin birleştirilmesi ile, doğal ve sentetik organik karışımlarda ki bileşenlerin yapı analizi için oldukça uygun bir yöntem oluşturur. Gaz kromatografisi ile birkaç saniye içerisinde ayrılan nanogram miktardaki bileşiklerin dahi duyarlılığı kütle spektrumları alınabilir.

Ayırma işlemi, geniş yüzeyli katı bir destek üzerindeki hareketsiz faz ile hareketli faz arasında ayrılması istenilen bileşiklerin göç hızlarının farkından yararlanılarak yapılır. Hareketsiz fazı üzerinde taşıyan katıya destek katısı, hareketli faza durucu faz ve hareketli faza taşıyıcı gaz denir. Yöntemde ayrılması istenen karışım, üzeri durucu fazla kaplanmış destek katısıyla doldurulmuş cam veya metal bir kolon içerisinden geçirilerek ayırma işlemi gerçekleştirilir. Ayrılan bileşikler, kolonun diğer kısmından farklı zamanlarda çıkar ve uygun bir dedektör yardımıyla tespit edilir. (Erdik vd., 1993; Esen, 2005).

2.6. Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi (GC/MS)

Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi (GC/MS), gaz kromatografisi tekniği ve kütle spektroskopisinin birleştirilmesi ile oluşmuş bir sistemdir. Bir numunedeki bileşiklerin tanımlanması için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. GC/MS ile bilinmeyen numune, ilaç, çevre, patlayıcı, besin, narkotik madde, kozmetik ve parfüm analizleri yapılabildiği gibi, son zamanlarda hava alanlarında güvenlik kontrollerinde ve astronomik çalışmalarda uzaya gönderilerek gezegenlerin atmosfer ve toprak analizlerini yapmada kullanılmaktadır. GC/MS ile bir numunedeki eser elementler bile tayin edilebilir (http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry, 2008).

Her iki yöntemin birlikte kullanılması ile daha kesin sonuçlar elde edilir. Birden çok bileşik içeren bir numunenin analizinde, bu yöntemlerden sadece birinin kullanılması ile kesin bir sonuca ulaşamayabilir. Kütle spektroskopisinde oldukça saf numunelerin

kullanılması gerekir. Ayrıca bazen, iki molekülün oluşturulduğu iyonlar benzer olabilir. Gaz kromatografisinde ise kullanılan dedektör, bir karışımdaki alıkonma zamanları aynı olan maddeleri ayıramaz. Bu iki yöntem bir arada kullanıldığında, iki farklı molekülün hem gaz hem kütle spektrometrelerinde aynı şekilde davranmaları son derece zor olduğundan, sonuçlar oldukça kesin bir şekilde elde edilir.

Cihaza enjekte edilen numune, enjeksiyon kısmında buhar haline geldikten sonra taşıyıcı gaz ile kolona taşınır. Kolon içinde ilerlerken, numune içindeki maddeler kolon içinde çeşitli sürelerde tutulurlar. Bu tutulma süresi, bileşiğin uçuculuk ve molekül ağırlığı gibi özelliklerine bağlı olup alıkonma süresi (RT) olarak adlandırılır (genelde uçucu ve molekül ağırlığı düşük olan bileşikler kolonda daha az tutulmaya uğrarlar). Kolonun ısısının yükselmesiyle kolonda tutulmuş olan moleküller gaz fazına geçerek taşıyıcı gaz ile kolonun çıkışına ilerlerler. Tutunma sürelerine göre birbirlerinden ayrılıp kolonu terk eden bileşikler, kütle spektrometresine ulaşırlar. Burada bir filamentten elde edilen elektronlarla bombardımana tabi tutulurlar. Bu olaya elektron iyonlaştırması (EI) denir. Elektron iyonlaştırması sonucu oluşan iyonlar, kütle/yük oranlarına göre ayrılarak dedektörde kaydedilir ve veriler bilgisayardan spektrum şeklinde alınır. Bilgisayarda kayıtlı olan veri kütüphanelerindeki bileşiklerin spektrumları ile karşılaştırma sonucu bileşikler tayin edilir (http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry, 2008).

GC/MS cihazı temel olarak 3 kısımdan oluşur, bunlar enjeksiyon, kolon ve kütle dedektörü kısımlarıdır.

2.6.1. Enjeksiyon

Analizi yapılacak örnek, kolona enjeksiyon kısmı aracılığı ile gönderilir. Kolona giden örneğin gaz fazında olması gerekir. Bu nedenle enjeksiyon kısmının en önemli görevi örneği ısıtmaktır. Bu amaç için, enjeksiyon kısmında bir ısıtma çemberi bulunur. Örneği buharlaştırmak için bu kısım genellikle 200–300°C civarında tutulur. Sıcaklık düşük olursa tam buharlaşma olmaz ve pikler yayvan olur, çok yüksek olursa da örnekte bozunmalar oluşabilir. Örneği enjeksiyon kısmında buharlaştıktan sonra sabit akıştaki taşıyıcı bir gaz ile kolona taşınır. Bu amaç için kullanılan taşıyıcı gaz, örnek ve kolonla reaksiyona girmeyecek özellikte olmalıdır. Bu nedenle genellikle helyum, azot gibi inert gazlar kullanılır. Hidrojen de çok iyi bir taşıyıcı gazdır. Ancak örnek ile reaksiyona

girme ihtimali vardır. Taşıyıcı gazın seçimi kullanılan dedektöre de bağlıdır. Örneğin, alev iyonlaştırma dedektörü (FID) kullanılıyorsa hidrojen kullanılması gerekmektedir.

Enjeksiyon kısmının diğer bir görevi de split ve splitless akışlarını düzenlemektir. Split akışta, örneğe ulaşan taşıyıcı gaz numunenin bir kısmını kolona, diğer kısmını farkı bir yol ile cihazın dışına taşır. Yani enjekte edilen numunenin analizci tarafından belirlenen belli bir kısmı kolona taşınmış olur. Bu akışa numunenin çok derişik olduğu durumlarda başvurulur. Splitless akışta ise taşıyıcı gaz tüm numuneyi kolona taşır (http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry, 2008).

2.6.2. Kolon

Kolonlar genellikle cam veya paslanmaz çelik yapıli kapiler veya tüp şeklindedir. İç çapları 5 mm olup, uzunlukları 1 m' den 5 m' ye kadar değişir. Kapiler kolonların 3 çeşidi vardır. Destek kapli kapiler kolonlarda (SCOT), kapiler duvarları ince bir tabaka halinde destek maddesi ile kaplanmıştır ve üzerine sabit faz adsorbe edilmiştir. Gözenek tabakalı kapiler kolonlarda (PLOT), sabit faz olarak gözenekli bir adsorban polimer kullanılır. Duvar kapli kapiler kolonlarda (WCOT) ise, kolon duvarları sıvı bir sabit fazla kaplanmıştır (http://testequipment.globalspec.com/LearnMore/Labware_Test_Measurement/Chromatography_Instruments/GC_Columns About GC Columns. 06.04.2008.).

2.6.3. Dedektör

Gaz kromatografisi cihazlarında amaca göre çok çeşitli dedektörler kullanılır. Bunların bazıları, argon iyonlaştırma dedektörü, alev iyonlaştırma dedektörü, alev yayma dedektörü, termal iletkenlik dedektörü ve elektron tutma dedektörüdür. GC/MS cihazının MS kısmında ise genellikle kütle seçici veya iyon yakalayıcı dedektör kullanılır (http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry, 2008).

2.7. Galium (Rubiaceae)

Rubiaceae familyası 500 cins ve 6000 kadar tür içerir. Ülkemizde 10 cins ve 170 kadar tür ile temsil edilmektedir. Ağaç, çalı ve otsu bitkilerdir, yapraklar simetridir. Çiçekler

ise erdişi, aktinomorf, nadiren simetridir veya başak durumlarında gösterir. Tez çalışmasında materyal olarak kullanılan *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* endemik türlerdir. Orta Anadolu'da yayılış gösterir. *Galium incanum* ise Yunanistan ve Türkiye'de yayılış gösterir (Simson, 2006).

2.7.1. *Galium aladaghense*

Galium aladaghense, çok yıllık kökleri odunsulaşmış, 24-37 cm boylanabilen, tabandan itibaren yoğun dallanan yayık yükselici gövdeye sahip bir bitkidir. Yapraklar şeritsiden dar mızraksıya değişmektedir. iek durumu yalancı şemsiyemsidir, korolla grimsidir. Meyveleri yumurtamsı buruşuk ve parlak kırmızımsıdır. ieklenmeleri 6-8. aylardadır (Fotoğraf 2.1., C5 Niğde, Aladağlar, Yalak Deresi. 2640 m. Parolly. Topotip: C5 Niğde, Aladağlar, Yalak Deresi Kapı, 2300-2600 m. 05.07.2012 Savran 5100).



Fotoğraf 2.1. *Galium aladaghense* Parolly

2.7.2. *Galium dieckii*

Galium dieckii, çok yıllık otsu, kökten itibaren dallanan cüce bitkilerdir. Gövde 10-15 cm. Yapraklar obovat- oblong dan geniş eliptike değişir. iek durumu ovoid veya kısa silindirikdir, korolla yeşilimsi-sarıdır. Meyve geniş elipsoid, düz ve tüysüzdür. ieklenmeleri 5-6. aylardadır (Fotoğraf 2.2., C5 Niğde, Torlar, iftehan 1400 m.

Dieck C5 Niğde, Mazmılı Dağ, Mezarlık doğusundaki tepeler 2000-2100 m. 05.06.2012, Savran 5060).



Fotoğraf 2.2. *Galium dieckii*

2.7.3. *Galium incanum*

Galium incanum, çok yıllık otsu çok gövdeli 2.5-40 cm, gövde yaprakları linear-lanseolat ve korolla beyazdır. Meyveleri yuvarlağımsı veya oval tüsüzdür. Çiçeklenme 5-8. aylardadır (Fotoğraf 2.3., (C5 Niğde, Çiftehan- Ulukışla 4. Km. Kayalıklar. 850m. 05.06.2012 Savran 5065).



Fotoğraf 2.3. *Galium incanum* Sm.

BÖLÜM III

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

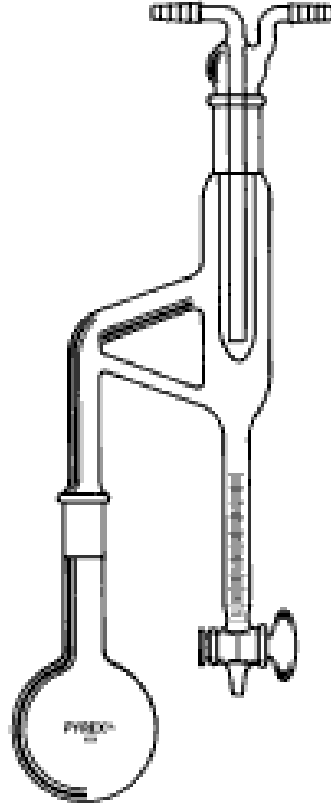
3.1. Materyal

Galium (*Rubiaceae*) cinsine ait *Galium incanum*, *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* türleri Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Ahmet SAVRAN tarafından 2013 yılında toplanmış, teşhis edilmiş ve bize verilmiştir. Bu bitkilerden *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* endemiktir. *Galium incanum* ise endemik değildir, Kuzey Suriye, Kuzey İran ve Transkafkasya’da yayılış göstermektedir. Yunanistan ve Türkiye’nin Orta Anadolu bölgesinde yetişmektedir. Literatür taraması sonucu bu türlere ait daha önceden kimyasal ve antimikrobiyal bir analiz yapıldığına dair bir yayın bulunamamıştır. *Galium* türü, *Rubiaceae* familyasının önemli türlerindedir. Antimikrobiyal aktivite çalışması için gereken gram pozitif (*S. aureus* ATCC 25923), Gram negatif (*E. coli* ATCC 25922) bakterileri Biyoloji Bölümü Öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba ARTAN ONAT ‘tan temin edilmiştir. Bakteriler için kullanılan besiyerleri Luria Bertani sıvı besiyeri ve Müller Hinton agar besiyeri Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Uçucu yağların izolasyonu

Uçucu yağların izolasyonları Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında bulunan Clevenger aparatında gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş ve öğütülmüş her bir bitki türünden tartılarak alınan materyal uygun bir balona konulmuş, üzerine mateylain kütlesinin yedi katı kadar su ilave edilerek Clevenger aparatında (Şekil 3.1.) dört saat süreyle kaynatılmıştır. Bu işlem her örnek için ikişer tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen uçucu yağlar 0.5 ml n-hekzan (HPLC kalitesinde) ile çözülerek alınmış ve Na₂SO₄ ile kurutulup koyu renkli şişeler içinde 4°C ‘de saklanmıştır. Uçucu yağların analizi GC/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Clevenger aparatı

3.2.2. Uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi

Uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi GC/MS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarında bulunan Thermo marka DSQII model GC/MS cihazından faydalanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Thermo marka DSQII model GC/MS cihazı

Cihazın kolonu yine Thermo marka TR-WAXMS 60mx0.32mmx0.25m ve enjeksiyon hacmi 1µL'dir. Enjeksiyon üç tekrarlı yapılmıştır. Örnek kromatogramlarında görülen bağıl bollukları en yüksek bilinmeyen pikler için GC/MS cihazının MAINLIB, WILEY7N ve Replac kütüphanesindeki olası sonuçlar benzerlik indeksi ile birlikte belirlenmiştir. Analiz sonuçlarında elde edilen her bir bileşiğe ait alıkonma sürelerinden alıkonma indeksleri hesaplanmıştır. Doğrulama için bileşiklere ait alıkonma indeksleri literatür verileriyle karşılaştırılmıştır.

Bir maddenin kalitatif analizi için tek bir alıkonma zamanı yeterli olmamaktadır. Çünkü alıkonma zamanı kolon sıcaklığı, akış hızı, basınç ve sabit fazın yapısı gibi çalışma koşullarına göre değişmektedir. Tayin sonucunun kesinlik kazandırılması için analit ve standartın alıkonma zamanları, çalışma koşulları değiştirilerek incelenir. Her ikisindeki alıkonma zamanı benzer bir değişiklik gösteriyorsa, analitin standart ile aynı madde olduğu söylenebilir. Alıkonma indeksi Kovats tarafından çıkarılmış bir parametredir ve kromatografik verilerin tanımlanmasında kullanılır. Bir analitin alıkonma indeksi analit pikini iki veya daha fazla normal parafin piki ile kıyaslayarak bulunmaktadır. Bir normal parafinin alıkonma indeksi, içerdiği karbon atomları sayısının 100 katıdır ve kullanılan kolonlara veya kromatografik koşullara bağımlı değildir. Eşitlik 2.1. 'de verilen formül aracılığı ile alıkonma zamanından alıkonma indeksi hesaplamaları yapılmıştır.

$$I_X = 100 \left[\frac{\log (t'_R)_X - \log (t'_R)_n}{\log (t'_R)_{n+1} - \log (t'_R)_n} \right] + 100 n \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte t'_R , her madde için düzeltilmiş alıkonma zamanıdır ve $t'_R = (t_R - t_M)$ ye eşittir. X analiti, n ve (n+1) karbon sayısına göre parafinleri belirtir (Beşergil, 2002).

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi

Elde edilen uçucu yağlar üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan mikroorganizmalar yine aynı bölümden temin edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite gram pozitif (*S. aureus* ATCC 25923), Gram negatif (*E. coli* ATCC 25922) bakterileri kullanılarak belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için Disk Difüzyon yöntemi uygulanmıştır (NCCLS, 1997). Taze kültürden öze ile alınan mikroorganizmalar Luria Bertani (LB) broth sıvı besi yerinde 0.5 Mc Farland'a eşit

türbidite oluşana kadar 37 °C’de inkübe edilmiştir. Kültürü hazırlanan test mikroorganizmalarından 100 µL alınarak Müller Hinton agar katı besi yerine yayma ekim yapılmıştır. Steril diskler ekim yapılan petrilere eşit aralıklarla yerleştirilmiştir ve hazırlanan *Galium incanum* (A), *Galium dieckii* (B), *Galium aladaghense* (C) bitkilerinin uçucu yağlarından 20 µL alınarak yerleştirilen steril diskler üzerine emdirilmiştir. Petriler 37 ° C’de 24 saatlik inkübasyona bırakılmış ve sonra diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Her test farklı zamanlarda 3 tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 4 BULGULAR VE TARTIŞMA

Rubiaceae familyasına ait olan *Galium* türünden *Galium incanum*, *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* bitkilerinin uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu tez çalışması kapsamında, bitkilerin Clevenger aparatı ile uçucu yağ izolasyonları tamamlandıktan sonra uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi GC/MS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen kromatogramlardan bağlı bollukları en yüksek pikler için GC/MS cihazının kütüphanesindeki olası sonuçlar benzerlik indeksleri ile karşılaştırılarak ve Eşitlik 2.1. 'de verilen formül aracılığı ile alıkonma zamanından alıkonma indeksi hesaplamaları yapılmıştır.

Analiz sonucunda, bu bitkilere ait toplam 61 adet bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Bu bileşikler sırasıyla; trans-2-hekzanal (1), Heptanal (2), Siklopenten (3), 3-oktanon (4), α -terpinen (5), α -pinen (6), n-oktanol (7), Heksanal (8), Linalool (9), β -pinen (10), Kamfor (11), Borneol-L (12), Borneol (13), Miritenal (14), Limonen (15), İzoamilalkol (16), 1,8-sineol (17), Nonanoik asit (18), Karvakrol (19), 2-heptanol (20), Ögenol (21), (Z)-3-heksenol (22), Sipren (23), Nonanal (24), Dodekanal (25), α -sedren (26), β -karyofillen (27), geranil aseton (28), Trans- β -farnesen (29), 1-okten-3-ol (30), α -humulen (31), β -ionen (32), α -kamfole aldehit (33), Benzaldehit (34), Karpofillenoksit (35), Elemisin (36), Oktanol (37), 5-metilfurfural (38), Pinokarvon (39), Kubenol (40), Karvenon (41), Zerumbon (42), Oktadekan (43), cis-kalamenen (44), Heksanoik asit (45), 1-hekzadekanol (46), hekzadekanoik asit (47), Tetradekanal (48), Eikosan (49), Fitol (50), Timol (51), Trikosan (52), Dekanoik asit (53), Pentakosan (54), Metil linoat (55), Heptakozan (56), Tetradekanoik asit (57), Pentadekanoik asit (58), Nonakosan (59), Oleik asit (60), Linoneik asit (61)'dir. *Galium incanum* bitkisi (A), *Galium dieckii* bitkisi (B) ve *Galium aladaghense* (C) bitkisi uçucu yağ bileşenlerine ait veriler Çizelge 4.1. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Uçucu yağ bileşenleri

No	Bileşen	RI*	% A	% B	% C
1	trans-2-hekzanal	801	1,5	2,3	-
2	Heptanal	903	-	1,8	0,7
3	Siklopenten	931	0,9	0,6	-
4	3-oktanon	984	-	0,2	0,2
5	α -terpinen	1019	0,3	-	0,7
6	α -pinen	1032	0,1	0,2	-
7	n-oktanol	1063	-	-	0,3
8	Heksanal	1093	0,7	0,3	0,4
9	Linalool	1098	-	0,2	-
10	β -pinen	1118	0,2	-	0,6
11	Kamfor	1147	1,2	0,2	0,5
12	L-Borneol	1165	3,2	1,8	-
13	Borneol	1171	-	-	0,3
14	Miritenal	1194	-	0,7	0,5
15	Limonen	1203	0,1	-	-
16	İzoamilalkol	1212	0,3	-	0,5
17	1,8-sineol	1213	0,6	-	-
18	Nonanoik asit	1267	0,1	0,3	-
19	Karvakrol	1298	0,4	1,2	2,4
20	2-heptanol	1320	0,1	-	0,3
21	Ögenol	1360	7,8	8,1	6,9
22	(Z)-3-heksenol	1391	0,2	-	-
23	Sipren	1398	-	-	0,4
24	Nonanal	1400	1,2	2,4	0,8
25	Dodekanal	1409	11,5	-	2,6
26	α -sedren	1411	-	-	0,6
27	β -karyofillen	1426	-	0,2	-
28	geranil aseton	1445	-	-	0,7
29	Trans- β -farnesen	1449	0,1	0,2	-
30	1-okten-3-ol	1452	0,7	-	0,4
31	α -humulen	1454	7,8	5,3	3,2
32	β -ionen	1487	-	-	0,2
33	α -kamfolen aldehit	1500	1,1	0,9	0,2
34	Benzaldehit	1541	0,3	0,1	0,2
35	Karpofillenoksit	1555	-	-	0,6
36	Elemisin	1558	-	-	0,2
37	Oktanol	1562	2,7	9,7	0,6
38	5-metilfurfural	1585	0,9	-	0,2
39	Pinokarvon	1586	-	-	0,9
40	Kubenol	1648	0,6	-	0,2

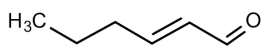
Çizelge 4.1. (devam) Uçucu yağ bileşenleri.

41	Karvenon	1737	0,4	0,3	0,3
42	Zerumbon	1754	-	-	-
43	Oktadekan	1800	0,2	1,9	0,4
44	cis-kalamenen	1853	0,5	-	-
45	Heksanoik asit	1870	0,4	6,8	0,3
46	1-hekzadekanol	1874	0,6	0,4	1,6
47	hekzadekanoik asit	1929	21,6	-	6,4
48	Tetradekanal	1933	1,7	-	0,6
49	Eikosan	1999	0,7	0,3	0,4
50	Fitol	2102	-	-	1,5
51	Timol	2205	7,4	5,7	21,4
52	Trikosan	2300	-	6,8	0,4
53	Dekanoik asit	2300	1,7	2,8	-
54	Pentakosan	2499	-	-	0,2
55	Metil linenoat	2509	0,2	-	0,7
56	Heptakozan	2700	0,9	0,2	-
57	Tetradekanoik asit	2713	-	3,6	-
58	Pentadekanoik asit	2822	0,3	-	0,1
59	Nonakosan	2900	1,7	-	-
60	Oleik asit	3200	1,3	0,2	-
61	Linoneik asit	3290	-	2,1	4,7

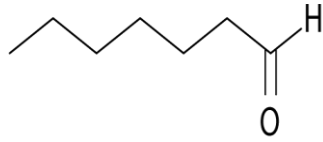
*: RI: Alıkonma indeksi, ** SI: Benzelik indeksi.

Analizi yapılan türler içerisinde; Kamfor (11), Karvakrol (19), Ögenol (21), Nonanal (24), α -humulen (31), α -kamfolen aldehit (33), Benzaldehit (34), Oktanol (37), Karvenon (41), Oktadekan (43), Heksanoik asit (45), 1-hekzadekanol (46), Eikosan (49), Timol (51) bileşiklerinin Galium incanum (A), Galium dieckii (B) ve Galium aladaghense (C) türlerinin her üçünde de ortak olduğu görülmüştür. Dodekanal (25) ve Hekzadekanoik asit (47) Galium incanum (A), Oktanol (37) Galium dieckii türünde (B), Timol (51) Galium aladaghense (C) türünde yüksek miktarda bulunduğu ve Ögenol (21) bileşiğinin her üç türde de yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir.

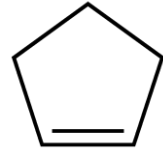
Yapıları aydınlatılan bileşiklerin sırasıyla molekül formülleri ve isimleri aşağıda görülmektedir.



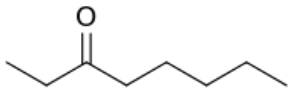
trans-2-hekzanal (1)



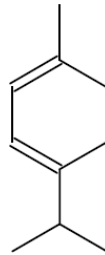
Heptanal (2)



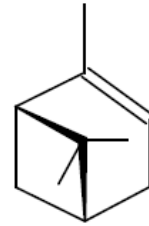
Siklopenten (3)



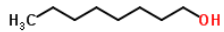
3-oktanon (4)



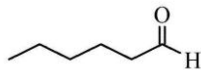
α -terpinen (5)



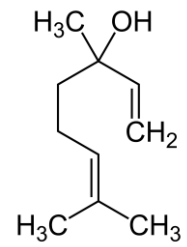
α -pinen (6)



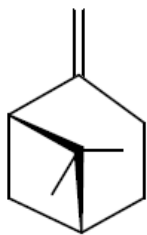
n-oktanol (7)



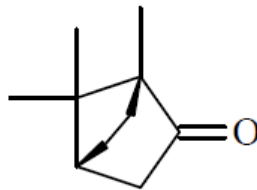
Heksanal (8)



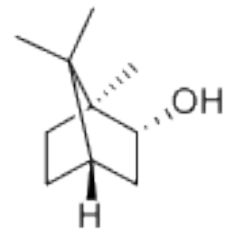
Linalool (9)



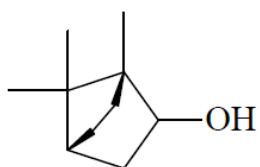
β -pinen (10)



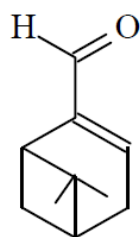
Kamfor (11)



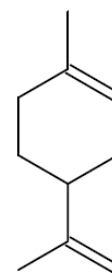
L-Borneol (12)



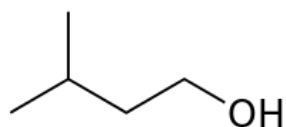
Borneol (13)



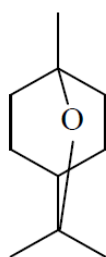
Miritenal (14)



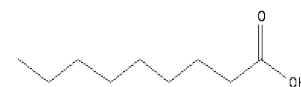
Limonen (15)



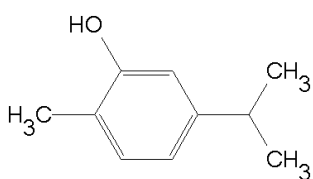
İzoamilalkol (16)



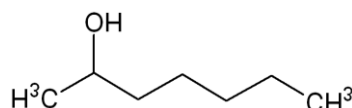
1,8-sineol (17)



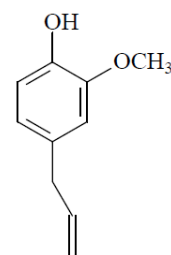
Nonanoik asit (18)



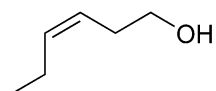
Karvakrol (19)



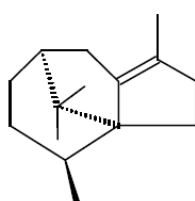
2-heptanol (20)



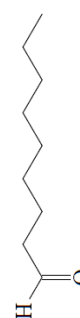
Eugenol (21)



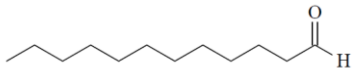
(Z)-3-hekseenol (22)



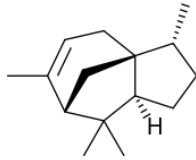
Sipren (23)



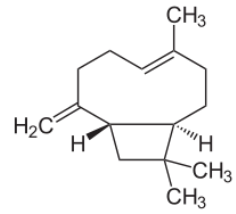
Nonanal (24)



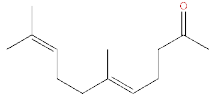
Dodekanal (25)



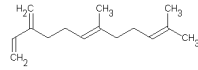
α -sedren (26)



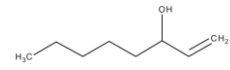
β -karyofilen (27)



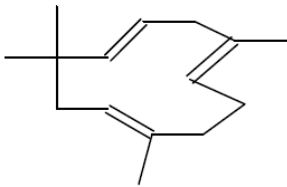
geranyl aseton (28)



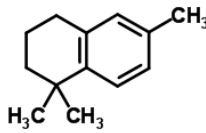
Trans- β -farnesen (29)



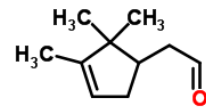
1-okten-3-ol (30)



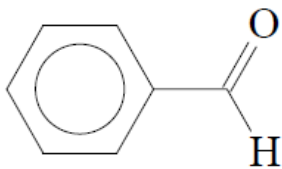
α -humulen (31)



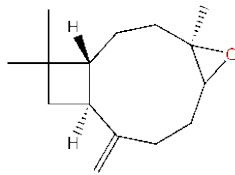
β -ionen (32)



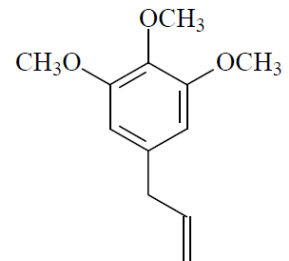
α -kamfolen aldehyd (33)



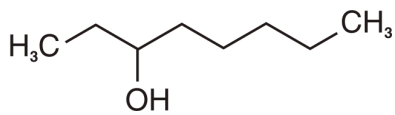
Benzaldehyd (34)



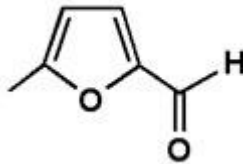
Karyofilenoksid (35)



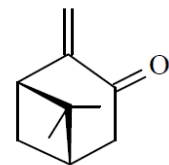
Elemisin (36)



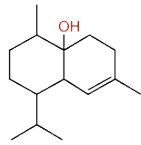
Oktanol (37)



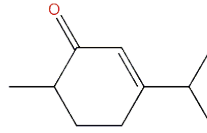
5-metilfurfural (38)



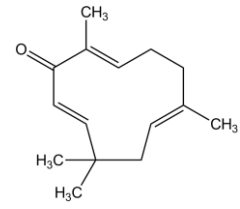
Pinokarvon (39)



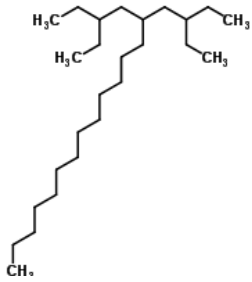
Kubenol (40)



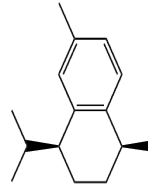
Karvenon (41)



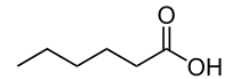
Zerumbon (42)



Oktadekan (43)



cis-kalamenen (44)



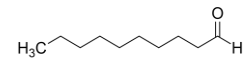
Heksanoik asit (45)



1-hekzadekanol (46)



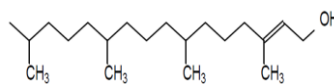
hegzadekanoik asit (47)



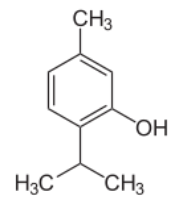
Tetradekanal (48)



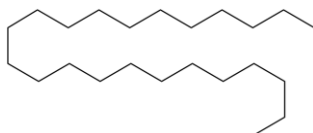
Eikosan (49)



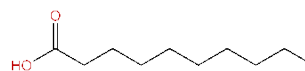
Fitol (50)



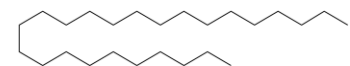
Timol (51)



Trikosan (52)



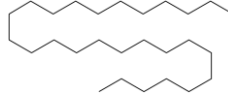
Dekanoik asit (53)



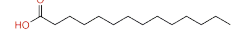
Pentakosan (54)



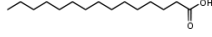
Metil linoat (55)



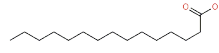
Heptakozan (56)



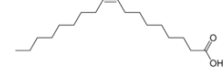
Tetradekanoik asit (57)



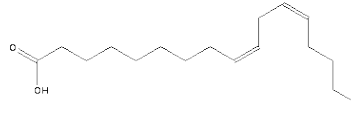
Pentadekanoik asit (58)



Nonakosan (59)



Oleik asit (60)



Linoneik asit (61)

Bileşiklerin yapısı aydınlatılırken, GC/MS analizi ile elde edilen kütle spektrumlarının, cihaz veri tabanında bulunan NIST ve WILEY kütüphanelerindeki kütle spektrumları ile karşılaştırılması yönteminin yanı sıra, literatür verilerinde bulunan bazı saf bileşiklerin, aynı cihazda yapılan analizleri sonucu elde edilen sonuçlarla karşılaştırma yöntemi de kullanılmıştır. Kütüphane karşılaştırmalarında benzeşme oranı %80 ve üzerinde olan bileşikler dikkate alınmıştır. Benzeşme oranlarına göre tespit edilen bileşiklerin doğrulanması için, bu bileşiklere ait alıkonma indeksleri literatür alıkonma indeksleri ile karşılaştırılmıştır.

Bileşiklerin yapısı incelendiğinde beş bileşiğin monoterpen [α -terpinen (5), α -pinen (6), β -pinen (10), Limonen (15), Timol (51)], dokuz bileşiğin monoterpenoid [Linalool (9), Kamfor (11), L-Borneol (12), Borneol (13), Miritenal (14), 1,8-sineol (17), Karvakrol (19), Ögenol (21), Pinokarvon (39)], dokuz bileşiğin seskiterpen [Sipren (23), α -sedren (26), β -karyofillen (27), Trans- β -farnesen (29), α -humulen (31), Karpofillenoksit (35), Kubenol (40), Zerumbon (42), cis-kalamenen (44)] yapısında oldukları belirlenmiştir. Buna göre toplam bileşenlerin %8.2 'si monoterpen, % 14,75'i monoterpenoid, %14,75'i ise seskiterpen yapısındadır. Sınıflandırılmayan bileşikler diğer bileşikler olarak nitelenmiştir.

Antimikrobiyal aktivite gram pozitif (*S. aureus* ATCC 25923), Gram negatif (*E. coli* ATCC 25922) bakterileri kullanılarak belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için Disk Difüzyon yöntemi uygulanmıştır (NCCLS 1997). Elde edilen

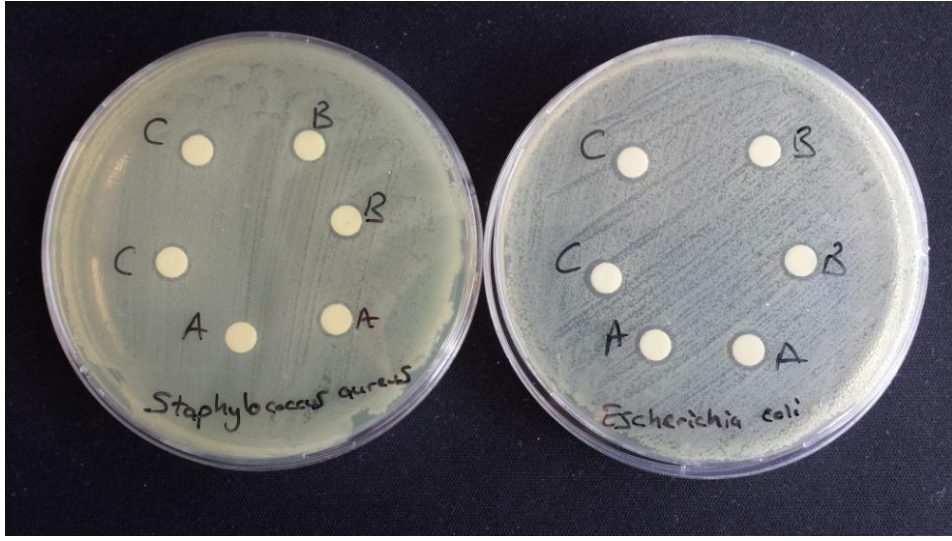
uçucu yağlar üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları Disk Difüzyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu testler için, Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen, *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 mikroorganizmaları kullanılmıştır.

Elde edilen *Galium incanum*'a ait uçucu yağlar, *S. Aureus*'a 7mm, *E. Coli*'ye ise 9 mm inhibisyon zonu oluşturmuştur.

Antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda *Galium aladaghense* bitkisine ait uçucu yağın, *Galium incanum* ve *Galium dieckii* bitkilerinin uçucu yağlarına göre her iki mikroorganizmaya karşı daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Her üç bitkinin uçucu yağının da *E. coli* ATCC 25922 mikroorganizmasına, *S. aureus* ATCC 25923 mikroorganizmasına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 1). *Galium incanum* bitkisine ait uçucu yağ *S. aureus* mikroorganizmasına karşı zayıf aktivite gösterirken *E. coli* mikroorganizmasına karşı daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Galium dieckii* bitkisine ait uçucu yağ hem *S. aureus* hem de *E. coli* mikroorganizmasına karşı yakın bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. *Galium aladaghense* bitkisine ait uçucu yağ ise *E. coli* mikroorganizmasına karşı *S. aureus* mikroorganizmasından daha güçlü aktivite göstermiştir (Tablo 1). Antimikrobiyal aktivitelere ait veriler Çizelge 4.1, Şekil 4.1. 'de görülmektedir.

Çizelge 4.2. *Galium incanum* (A), *Galium dieckii* (B), *Galium aladaghensis* (C) bitkilerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri (İnhibisyon Zon Çapları (mm)).

İnhibisyon Zon Çapları (mm)			
Test Mikroorganizmaları	<i>Galium incanum</i> (A) (0.1 µg/µL)	<i>Galium dieckii</i> (B) (0.1 µg/µL)	<i>Galium aladaghense</i> (C) (0.1 µg/µL)
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7	8.5	8.5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	9	8.5	9.5



Şekil 4.1. *Galium incanum* (A), *Galium dieckii* (B), *Galium aladaghense* (C) bitkilerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri.

Bitkilerin ve uçucu yağlarının antimikrobiyal özelliklerinin bilinmesi, insan sağlığı ve gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak açısından ilaç ve gıda endüstrisine önemli katkı sağlayacaktır. Sonuç olarak; tez çalışmasında analizleri yapılan üç türün uçucu yağları esas bileşenlerinin *E. coli* ve *S. aureus* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri belirlenmiştir.

BÖLÜM V SONUÇLAR

Rubiaceae familyasına ait olan *Galium* cinsinden *Galium incanum*, *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* türlerinin uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu tez çalışması kapsamında, bitki örnekleri Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Yrd. Doç. Dr. Ahmet SAVRAN tarafından toplanmış ve teşhis edilmiştir. Bu bitkilerden *Galium dieckii* ve *Galium aladaghense* endemiktir. *Galium incanum* endemik değildir, Yunanistan ve Türkiye’de yayılış göstermektedir. Literatür taraması sonucu her üç bitki içinde daha önceden yapılmış kimyasal herhangi bir analize rastlanmamıştır. *Galium* türü, *Rubiaceae* familyasının önemli türlerindedir.

Bitki örneklerinin Clevenger aparatı ile uçucu yağ izolasyonları tamamlandıktan sonra uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi GC/MS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarında bulunan Thermo marka DSQII model GC/MS cihazından faydalanılmıştır. Cihazın kolonu yine Thermo marka TR-WAXMS 60mx0.32mmx0.25m ve enjeksiyon hacmi 1µL’dir. Enjeksiyon üç tekrarlı yapılmıştır. Örnek kromatogramlarında görülen bağıl bollukları en yüksek bilinmeyen pikler için GC/MS cihazının MAINLIB, WILEY7N ve Replic kütüphanesindeki olası sonuçlar benzerlik indeksi ile birlikte belirlenmiştir. Analiz sonuçlarında elde edilen her bir bileşiğe ait alıkonma sürelerinden alıkonma indeksleri hesaplanmıştır. Doğrulama için bileşiklere ait alıkonma indeksleri literatür verileriyle karşılaştırılmıştır. Analizler sonucunda bu bitkilere ait toplam 61 adet bileşiğin yapısı aydınlatılmıştır. Bileşiklerin yapısı incelendiğinde beş bileşiğin monoterpen [α -terpinen (5), α -pinen (6), β -pinen (10), Limonen (15), Timol (51)], dokuz bileşiğin monoterpenoid [Linalool (9), Kamfor (11), L-Borneol (12), Borneol (13), Miritenal (14), 1,8-sineol (17), Karvakrol (19), Ögenol (21), Pinokarvon (39)], dokuz bileşiğin seskiterpen [Sipren (23), α -sedren (26), β -karyofillen (27), Trans- β -farnesen (29), α -humulen (31), Karpofillenoksit (35), Kubenol (40), Zerumbon (42), cis-kalamenen (44)] yapısında oldukları belirlenmiştir. Buna göre toplam bileşenlerin %8.2’si monoterpen, % 14,75’i monoterpenoid, %14,75’i ise seskiterpen yapısında. Sınıflandırılmayan bileşikler diğer bileşikler olarak nitelenmiştir.

Antimikrobiyal aktivite gram pozitif (*S. aureus* ATCC 25923), Gram negatif (*E. coli* ATCC 25922) bakterileri kullanılarak belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktiviteyi

belirlemek için Disk Difüzyon yöntemi uygulanmıştır (NCCLS 1997).Elde edilen uçucu yağlar üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları Disk Difüzyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu testler için, Niğde Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen, *E. coli* ATCC 25922 ve *S. aureus* ATCC 25923 mikroorganizmaları kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda *Galium aladaghense* bitkisine ait uçucu yağın, *Galium incanum* ve *Galium dieckii* bitkilerinin uçucu yağlarına göre her iki mikroorganizmaya karşı daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Her üç bitkinin uçucu yağının da *E. coli* ATCC 25922 mikroorganizmasına, *S. aureus* ATCC 25923 mikroorganizmasına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 1). *Galium incanum* bitkisine ait uçucu yağ *S. aureus* mikroorganizmasına karşı zayıf aktivite gösterirken *E. coli* mikroorganizmasına karşı daha güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Galium dieckii* bitkisine ait uçucu yağ hem *S. aureus* hem de *E. coli* mikroorganizmasına karşı yakın bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. *Galium aladaghense* bitkisine ait uçucu yağ ise *E. coli* mikroorganizmasına karşı *S. aureus* mikroorganizmasından daha güçlü aktivite göstermiştir.

Başer ve ark., Ankara ve Kastamonu'dan topladıkları *Galium aparine* ve *Galium odoratum* örneklerinde uçucu yağ bileşenlerini belirlemişlerdir. Bu çalışma da, uçucu yağların izolasyonu sonrasında bileşenler GC/MS ile analiz edilmiştir. Toplam 96 bileşik elde edilirken, *Galium odoratum* örneklerinde bileşenlerin % 89.1'i ve *Galium aparine* örneklerinde bileşenlerin % 64.7'si karakterize edilmiştir. *Galium odoratum*'un uçucu yağ ana bileşenlerini; timol (% 30.6) ve izo timol (% 22.8) olarak belirlemişler, *Galium aparine*'in ise uçucu yağ ana bileşenini heksadekanoik asit (% 22.3) olarak saptamışlardır (Başer ve ark, 2004).

Mirza ve ark. ise 2004 yılında İran'da yaptıkları bir araştırma da, *Galium Verum L.* (Rubiaceae) örneklerinin üst kısımlarından Clevenger tipi aparat kullanılarak hidrodistilasyon yoluyla uçucu yağları izole etmişlerdir. Elde ettikleri uçucu yağların kimyasal bileşenlerini GC ve GC/MS yöntemlerinin bir kombinasyonu ile incelemişlerdir. Araştırma sonucunda bitki örneğine ait 23 bileşen izole edilirken, *Galium* % 93 oranında bileşenleri karakterize etmişlerdir. Ana bileşenleri; kariyofilen

(% 26), kariyofilen oksit (% 16.2) ve germakren-D (% 11.2) olarak tespit etmişlerdir (Mirza ve ark., 2004).

Pakistan'da Shakirullah ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir araştırmada, *Galium tricornutum* subsp. örneklerinin kimyasal bileşenleri ve biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Hidrodistilasyon ve GC/MS analizleri sonucunda bileşenleri; eikosil ester (12.7%), 9-oktadekanoik asit (Z)-, tetradesil ester (12.3%), hegzadekanoik asit (5.6%), 9-oktadekanoik asit (Z), 2-hidroksi-1-(hidroksimetil) etil ester (5.5%), hegzadekanoik asit, 1-(hidroksimetil)-1,2-etanedil ester (5.2%), 4H-1-benzopiran-4-one,2-(3,4-dihidroksifenil)-6,8-di-a-D-glukopiranosil-5,7-dihidroksi-(3.6%) mirtenol (2.3%) ve 9-oktadekanoik asit (Z)-, tetradesil ester (2%) olarak belirlemişlerdir. Antimikrobiyal aktivite incelenmeleri sonrasında *Escherichia coli*' ye karşı aktivite görmüşlerdir. Fitotoksik incelemelerde ise anlamlı bir sonuca ulaşmamışlardır (Shakirullah, 2009).

Ukrayna'da halk arasında tedavi amaçlı olarak ve peynir yapımında yaygın olarak kullanılan *Galium verum* L. (Rubiaceae Juss.) bitkisinin çiçekleri üzerine İl'ına ve arkadaşları 2009 yılında bir araştırma yapmışlardır. Bu araştırma da GC yöntemi kullanılarak bileşenler tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda fenol karboksilik asitler, kumarinler, flavonoidler, tabaklama maddeleri ve saponin türü bileşiklere rastlamışlardır. Bileşenler sınıflandırıldığında; dokuz tane terpen, beş tane aromatik bileşik ve dört tane de yağ asiti içerdiğini görmüşlerdir. Diğer tespit edilen bileşikleri ise organik bileşiklerin çeşitli sınıflarına ait olduklarını bildirmişlerdir (İl'ına ve ark, 2009).

Sırbistan'da iki farklı lokasyondan toplanan *Galium verum* L., Rubiaceae örneklerinin metanol ekstraktlarında Lakić ve ark. tarafından antioksidan özelliklerin araştırıldığı bir çalışma da ise, kurutulmuş ekstraktın toplam fenolik madde içeriği, flavonoidler ve klorofil içeriği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda farklı antioksidan özelliklere rastlanırken bunun nedeni olarak da fenolik bileşenlerdeki değişiklikler gösterilmiştir (Lakić ve ark., 2010).

Tez çalışmasına konu olan *Galium* cinsine ait literatürde farklı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak yapılan az sayıda diğer galium cinslerini içeren çalışmalarda özellikle monoterpen ve seskiterpen türü bileşikler göze çarpmaktadır. Bu kapsamda tez çalışması sonucunda elde edilen bileşikler de bu çalışmalarla uyum içerisindedir. Ayrıca

bazı çalışmalarda görülen antimikrobiyal özelliklerinde tez çalışması ile karşılaştırıldığında benzer özelliklerde olduğu görülmektedir.

Terpen ve terpenoidler, çoğu bitki ve çiçekteki esans yağlarının başlıca bileşenlerindedir. Bu tür bileşenler gıdalara tatlandırıcı katkısı olarak, parfümeride, koku tedavisinde, ayrıca geleneksel ve alternatif tıpta kullanılırlar. Doğal terpenlerin sentetik değişiklikleri ve türevleri, parfümeri ve gıda tatlandırıcı katkı maddelerindeki çeşitliliği çok arttırmıştır. Tez çalışması sonucunda belirlenen terpen ve tepenoid türü bileşenlerin de bu yönde eczacılıkta ve özellikle kozmetikte kullanılabileceği ön görülmektedir.

Bitkilerin yapısında uçucu yağlar ile birlikte yüzlerce bileşik daha bulunmaktadır. Farklı ekstraksiyon ve izolasyon yöntemleri ile bu bileşikler de incelenebilir ve antimikrobiyal aktiviteleri araştırılabilir. Bu tür çalışmalar farklı bitkiler üzerinde de denenerek biyolojik açıdan çok daha aktif bileşikler tespit edilmeye çalışılabilir. Elde edilen uçucu yağların büyük bir kısmını terpen türü bileşikler oluşturmaktadır. Bu bileşikler, hem hoş kokularıyla hem de biyolojik aktivitelerinin oldukça yüksek olması nedeniyle ilaç, kozmetik, parfümeri, gıda gibi pek çok alanda kullanılmaktadırlar. Yüksek oranda faydalı bileşen içeren bitkileri bulmak için benzeri çalışmaların yapılması ve artırılması gerekmektedir. Antimikrobiyal madde dirençliliği bakterilerde hızlı bir şekilde artmaktadır. Böylece bakteriler, antimikrobiyal özellik gösteren bitkilere ve bitkisel ürünlere karşı direnç kazanmamaktadır. Bunun nedeni, sentetik olarak üretilen ilaçların bitkilerdeki herhangi bir aktif maddenin izole edilmesi suretiyle yapılmasıdır. Bakteriler tek bir yapı içeren sentetik ilaçlara karşı kısa zamanda dayanıklı ırklar oluşturarak ilaçları etkisiz hale getirebilmektedir. Buna karşılık, bitkilerdeki aktif maddeler diğer maddelerle birlikte kompleks bir yapı halinde bulduklarından bakterilerin bu yapılar karşı direnç geliştirmesini güçleştirmektedir. Bu yüzden antibiyotiklere alternatif olarak bitkilerin ve bitkisel ürünlerin geleneksel antimikrobiyaller olarak kullanılmaları için araştırmaların artırılması uygun olabilir. Aynı zamanda sentetik kökenli maddelerin yan etkilerinin daha fazla olması nedeniyle bitki ve bitkisel ürünlerin kullanılması bu yönden avantajlıdır. Fakat daha detaylı ve özellikle uçucu yağ bileşenlerinin veya ana gruplarının saf olarak elde edilerek mikroorganizmalar üzerinde test edilmesi ile elde edilecek sonuçlar daha da aydınlatıcı olabilir.

KAYNAKLAR

Alma, M.H., Mavi, A., Yıldırım, A., Dıgrak, M. and Hirata, T., ‘‘Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey’’, *Biol, Pharm, Bull*, 26, 1725, 2003.

Alzoreky, N. S. and Nakahara, K., ‘‘Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia’’, *International Journal of Food Microbiology*, 80, 223, 2003.

Araujo, H.C., Lacerda, M.E.G., Lopes, D., Bizzo, H.R. and Kaplan, M.A.C. ‘‘Studies On The Aroma Of Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Using Headspace Solid-Phase Microextraction. Phtochemical Analysis’’. 18, 469-474, 2007.

Başer, K.H.C., Özek, T., Kırimer, N., Deliorman D. and Ergun F., Composition of the Essential Oils of *Galium aparine* L. And *Galium odoratum* (L.) Scop. From Turkey, *J. Essential Oil Res.*, 16(305), 2004.

Baytop, T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, İstanbul Üniv. Yay. No. 3637, Eczacılık Fakültesi, No.40, İstanbul, 240-376, 1984.

Baytop, T., *Farmakognozi*, 1, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3399, Ecz. Fak., 51, İstanbul, 1986.

Baytop, T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, Nobel Tıp Kitapevleri, İkinci Baskı, 1999.

Beejmohun, V., Flinaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Flinaux, M. and Mesnard. F. Microwave-Assisted Extraction Of The Main Phenolic Compounds In Flaxseed Phtochemical Analysis, 18, 275-282, 2007.

Başer, K.H.C., Aromatic Biodiversity Among the Flowering Plant Taxa of Turkey, *Pure Appl. Chem.*, 74, 527–545 2002.

Berk, A., *Esanslar (Eterik Yağlar)*, Hüsnu Tabiat Matbaası, İstanbul, , 4, 1953.

Beşergil Birsnel, *Enstrümantal Analiz* (C.B.Üniversitesi, Çeviri, Cilt I, II, Manisa, 2002.

Ceylan, A. , *Tıbbi Bitkiler-II*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını No:481, Bornova-İzmir, 1983.

Chaintreau, A., Simultaneous Distillation-Extraction: Birth To Maturity-Review. Flavour and Fragrance J.16:136-148, 2001.

Congiu, R., Falconieri, D., Marongiu, B., Piras, A. and Porcedda, S., Extraction and Isolation of Pistacia lentiscus L. Essential Oil Be Supercritical CO₂. Flavour and Fragrance J, 17,239-244, 2002.

Cox, P. A., Ethnopharmacology and The Search For New Drugs, In Bioactive Compounds From Plants, CIBA Foundation Symposium 154., Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore, 40, 1990,

Çubukçu, B., Meriçli, A. H., Mat, A., Sarıyar, G., Sütülpınar, N. ve Meriçli, F., Fitoterapi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İstanbul, 2002.

Davis, J., ‘‘Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes’’, Science, 264, 375, 1994.

Devon, T.K. and Scott, A.I., Handbook of Naturally Occuring Compounds, Volume II, Terpenes, Academic Press, 1992.

Dormon, H. J. D. and Deans S.G., ‘‘Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils’’, Journal of Applied Microbiology, 88, 2000.

Eloff, J. N., ‘‘Which Extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?’’, J.Ethnopharmacology, 60, 1, 1998.

Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T. ve İhsanoğlu, E., Denel organik kimya, Erdik, E., Ankara Üniversitesi Fen fakültesi yayın., no:145, 1993.

Esen G., ‘Origanum vulgare subsp. Hirtum Ietswaart’un doğal ve kültür formlarından elde edilen uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal aktivite özellikleri’., Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Balıkesir, 2005.

Finar, J.L., D.Sc., Ph.D., ARIC, Organic Chemistry, Vol.2, Chp:8, ‘‘Stereochemistry and The Chemistry of Natural Products’’, Longman, Fifth Edition, p:354-358,440-441,451,459, 1975.

Fakhari, A.R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S.N. and Haddad, P. R., Hydrodistillation-Headspace Solvent Microextracti On, A New Method For Analysis Of The Essential Oil Components Of *Lavandula angustifolia* Mill. J.of Chromatography A, 1098, 14-18, 2005.

G. Bourdy, L.R.C. de Michel, A. Roca-Coulhard, Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceno–Guarani (Bolivian Chaco), J. Ethnopharmacol., 91 pp. 189–208, 2004.

Galipo, R. C., Canhoto, A.J., Walla, M.D. and Morgan, S.L., Analysis Of Volatile Fragrance And Flavor Compounds By Headpace Solid Phase Microextraction Combined With Gas Chromatography/Mass Spectrometry. An instrumental analysis experiment. University of South Carolina, 2002.

Gören, A.,C., Bazı Sideritis (*Sideritis Argyrea*, *Sideritis Dichotoma*, *Sideritis Trojana*) Türlerinin Diterpenik Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2002.

http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry

Gas Chromatography –Mass Spectrometry, From Wikipedia, The Free Encyclopedia 04.04.2008.

Il'ina, T. V. , Kovaleva, A. M. , Goryachaya, O. V. and Aleksandrov, A. N., Essential Oil from *Galium verum* Flowers, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 45, No. 4, 2009.

Karabacak, Ç., ‘‘ Bazı *scutellaria orientalis* türlerinin içerisindeki ekstraktif bileşiklerinin araştırılması’’, Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Isparta, 2007.

Karahan, A., ‘‘Sideritis gülendami H.Duman ve F.A., Karavelioğlu bitkisinin diterpen bileşiklerinin izolasyonu ve yapılarının tayini’’, Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Balıkesir, 2007.

Kaufmann, B., Christen, P., Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave-Assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction. Phytochemical Analysis, 13,105-113, 2002.

Kaufmann, B., Rudaz, S., Cherkaoui, S., Veuthey, J.L. and Chisten, P., Influence of Plant Matrix on Microwave-Assisted Extraction Process. The Case of Diosgenin Extracted From Fenugreek. *Phytochemical Analysis*. 18, 70-76, 2007.

Keleş, O., Ak, S., Balırel, T. ve Alpınar, K., ‘‘ Türkiye’ de Yetişen Bazı Bitkilerin Antibakteriyel Etkisinin İncelenmesi’’, *Türk J Vet Anim Sci*,25,(2001), 559.

Kılıç, A., ‘‘Uçucu yağ elde etme yöntemleri’’, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, Cilt:10, Sayı:13, Bartın, 2008.

Küpelı E., İlkay O., Gulnur T. ve Erdem Y., Anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandenone and auriculasin, *Journal of Ethnopharmacology* 107, 169–174, 2006.

Lakić, N.S., Mimica-Dukić, N.M., Isak, J. M. and Božin, B. N., Antioxidant roperties of *Galium verum*L. (Rubiaceae) extracts, *Central European Journal of Biology*, Volume 5, Issue 3, pp 331-337, 2010.

Lee Sang-Jun, Angela R. Wood, Camelia G.-A. Maier, Richard A. Dixon and Tom J., Mabry Prenylated Flavonoids From *Maclura pomifera*, *Phytochemistry* Vol. 49, No. 8, pp. 2573±2577, 1998.

Linskens, H. F. and Jackson, J.F., *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 12: Essential Oils and Waxes, Springer, Germany, 1997.

Loper, J.E., Henkels, M.D., Robert. R.G., Grove, G.G., Willett, M.J. and Smith T.J., ‘‘Evaluation of streptomycin, oxytetracycline and copper resistance of *Erwinia amylovora* isolated from pear orchards in Washington State’’, *Plant Disease*, 75,(1991), 287.

McMurry. J., *Organic chemistry*, fourth edition, brooks cole publishing company, chapter 28, 1099-1123, 1986.

Menekar, A., Kravets, M., Koel, M. and Orav, A., ‘‘Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs’’, *Comptes Rendus Chimie*, 7, 629, 2004.

Miguel, G., Simoes, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Carcalho, L., ‘‘Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitosus*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*’’, *Food Chemistry*, 86, 183, 2004.

Mirza, M., Navaei, M. N. and Dini M., Essential oil of *Galium verum* L. from Iran, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3(2), pp: 88, 2004.

Moyler, D.A., Extraction of essential oils with carbon dioxide. *Flavour and Fragrance J.* Vol.8, 235-247, 1993.

NCCLS, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA, 1997.

Orhan, I., Kusmenoglu, S. and Sener, B., Fatty acid composition of *Maclura pomifera* seed oil. *Gazi Univ. Pharm. Fac. Rev.* 18, 1–3, 2001.

Peterson and Brockmeyer, C.F. Peterson, E.W. Brockmeyer The antifungal activity of an aqueous extract of osage orange wood, *Am. J. Pharm. Sci. Suppl. Pub. Hlth.*, 125 (1953), pp. 303–310, 1953.

Philipson, J.D., Plants as sources of valuable products, Charlwood B.V., Rhodes, M.J., Clarendon Press, Oxford. 1990,1.

Porta, G.D., Porcedda, S., Marangiu, B., Reverchon, E., Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction *Flavour and Fragrance J.* 14, 214-218, 1999.

Pourmortazavi, S.M., Baghaee, P. and Mirhosseini, M.A., Extraction of volatile compounds from *Juniperus communis* L. Leaves with supercritical fluid carbon dioxide: Comparison with hydrodistillation. *Flavour and Fragrance J.* 19, 417-420, 2004.

Robbers, J.E., Speedie, M.K. and Tyler, V.E., *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, Ed. Balado, D., Williams and Wilkins, USA, p:81-107, 1996.

Rowe, J.W., *Natural products of woody plants* Vol.2, Springer, Germany, 1989.

Sakar, M.K. ve Tanker, M., ‘‘Fitokimyasal analizler’’, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Yayın no:67, 1991, s:181, 1991.

Saloua et al., F. Saloua, N.I. Eddine, Z. Hedi, Chemical composition and profile characteristics of Osage orange *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider seed and seed oil Ind. Crops Prod., 29 (2009), pp. 1–8, 2009.

Service, R.F., ‘‘Antibiotics that resist resistance’’, Science, 270, 1995, 724, 1995.

Shakirullah, M., Jan, A. K., Mahmood, T., Ahmad, I., Ishaq, M. and Ahmad, H., Biological activities and composition of the essential oil from the fruits of *Galium tricornutum* subsp. *tricornutum*, International Journal of Essential Oil Therapeutics Vol. 3, No. 2/3 pp. 81-83, 2009.

Simson, M.G., Plant Systematics. Elsevier Academic Pres. California, 2006.

Solomons, G. and Fryhle, C., Organik kimya, 7. Basımından çeviri, Ed. Okay, G. ve Yıldır, Y., İstanbul ,1152-1155, 2002.

Sökmen, A. ve Gürel, E., Bitki biyotekolojisi, Babaoğlu M., Gürel E. ve Özcan S., 374, Selçuk Üniversitesi vakıf yayımları, Konya, 211, 2001.

Sökmen, A., Güllüce, M., Akpulut, H.A., Daferara, D., Tepe, B., Polissiou, M., Sökmen, M. and Şahin, F., ‘‘The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus Spathulifolius*’’, Food and Control, 15, 627, 2004.

Sternberg, Guy, Osage Orange (*Maclura pomifera* (Raf.) Schneider): Species Character, vol. 6. Division of Special Services, Illinois Department of Conservation, Springfield, IL, pp. 1–6, 1989.

Svigar, A.A. and Silverstein, R.M., Monoterpenes: Infrared, Mass, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra and Kovats indices, Aldrich chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, 1981.

Tanker, M. ve Tanker, N., Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi. Yayın no:65, s:282-284, 287, 300, 317, 1950.

Tanker, M. ve Tanker, N., Farmakognozi ders kitabı, 65, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 269, 1998.

Ulubelen, A., Topçu, G. And Kolak, U., ‘‘Chemical and Biological evaluation of Genus Teucrium’’ Bioactive natural products (part D) in ‘‘ Studies in natral product chemistry’’, Vol. 23, Elsevier Science, p:591-648, 2000.

Valero, M. and Salmeron, M.C., ‘‘Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth’’, International journal of food microbiology, 85, 73, 2003.

Vas, G. and Vekey, K., Solid-Phase Microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. J.of Mass spectrometry, 39:233-254, 2004.

Yamani, Y., Khajeh, M., Ghasemi, E., Mirza, M. and Javidnia, K., Comparison of essential oil compositions of salia mirzayanii obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods, Food Chemistry, 108,341-346, 2007.

ÖZ GEÇMİŞ

Filiz YAĞIZ 13.10.1990 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlk orta ve lise öğretimini İstanbul'da tamamladı. 2008 yılında girdiği Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden Haziran 2012'de mezun oldu. 2012 yılında yüksek lisans öğrenimine başladı. O tarihten beri yine aynı bölümde yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.