



**ÇAŞIRIN (*Ferula orientalis* L.) ESANSİYEL YAĞI İLE
FARKLI EKSTRAKTLARININ ANTiOKSİDAN,
ANTİMİKROBİYAL VE İN VİTRO NÖROPROTEKTİF
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif Feyza TOPDAŞ

**Doktora Tezi
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL
2018
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ÇAŞIRIN (*Ferula orientalis* L.) ESANSİYEL YAĞI İLE FARKLI
EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN ANTİMİKROBİYAL VE İN
VİTRO NÖROPROTEKTİF AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif Feyza TOPDAŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

ÇAŞIRIN (*Ferula orientalis* L.) ESANSİYEL YAĞI İLE FARKLI
EKSTRAKTLARININ ANTİOKSİDAN ANTİMİKROBİYAL VE İN VİTRO
NÖROPROTEKTİF AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL danışmanlığında, Elif Feyza TOPDAŞ tarafından hazırlanan bu çalışma 27/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (5./5) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ

İmza :

Üye : Prof. Dr. M. Fatih ERTUGAY

İmza :

Üye : Prof. Dr. Mehmet AKBULUT

İmza :

Üye : Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Bülent ÇETİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .05./07./2018 tarih ve .27./..39..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:2016/251

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

ÖZET

Doktora Tezi

ÇAŞIRIN (*Ferula orientalis* L.) ESANSİYEL YAĞI İLE FARKLI EKSTRAKTLARININ ANTIOKSİDAN ANTIMİKROBİYAL VE İN VİTRO NÖROPROTEKTİF AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif Feyza TOPDAŞ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL

Apiaceae familyasından yenilebilir yabani bir bitki cinsi olan *Ferula*, aynı zamanda aromatik bileşimi ve tıbbi özellikleri ile de dünya çapında tanınmaktadır. Bu çalışmada, Doğu Anadolu Bölgesi halkı tarafından yaygın şekilde tüketilen *Ferula orientalis* L. salamuraşının hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen esansiyel yağı ve liyofilize salamuraşının klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktları üzerinde çalışılmıştır. DPPH• ve ABTS** radikali giderme aktiviteleri ile Cu⁺² iyonları indirgeme kapasitesi verileri, esansiyel yağın en yüksek antioksidan aktiviteye (sırasıyla; 50,040 µg/ml; 80,777 µg/ml ve 0,530) sahip olduğunu göstermektedir. Tespit edilen en yüksek toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ultrasonik metanol: su ekstraktına aittir (sırasıyla; 117,222 mg GAE/g ekstrakt ve 21,325 mg KE/g ekstrakt). Ekstraktların LC-MS/MS ile tespit edilen fenolik bileşenleri arasında klorojenik asit ve diosmin majör bileşenler olarak tespit edilmiştir. GC-MS ile uçucu yağda ana bileşikler olarak α-pinen (%20,55), osimen (%18,83), terpinolen (%7,63), D-limonen (6,19), β-karyofilen (%5,44), bornil asetat (%5,28) saptanmıştır. ICP-MS ile belirlenen mineral madde kompozisyonuna göre, ultrason uygulamasının ekstraktlara mineral madde geçişini belirgin şekilde artırdığını göstermiştir (p<0,01). Ekstraktlar ve esansiyel yağda, kuyu difüzyon yöntemi ve MİK testi ile belirlenen antimikrobiyal aktivite değerleri mikroorganizmalara göre değişen zayıf ya da orta derecede aktiviteyi göstermektedir. En yüksek antimikrobiyal aktivite *Streptococcus mutans*'a karşı etanol: su ekstraktlarında (31,25 µg/ml) belirlenmiştir. Korteks nöronları kullanılarak saptanan glutamat indüklü nörotoksosite verileri, esansiyel yağın nöroprotektif etkisinin belirgin şekilde yüksek olduğunu göstermiştir. Bu araştırma, salamura *Ferula orientalis* L., esansiyel yağı ve ekstraktlarının mineral madde kompozisyonu, antimikrobiyal aktivitesi, in vitro nöroprotektif aktivitesinin belirlenmesi açısından ilk olma özelliği taşımaktadır.

2018, 260 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Ferula orientalis* L., antioksidan aktivite, fenolik bileşikler, nöroprotektif aktivite, antimikrobiyal aktivite, mineral.

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND IN VITRO NEUROPROTECTIVE ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL AND DIFFERENT EXTRACTS OF CASIR

Elif Feyza TOPDAS

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Memnune SENGUL

Ferula is an edible wild plant genus from the *Apiaceae* family, is also recognized with its aromatic profile and medicinal properties. In this study, pickled *Ferula orientalis* L. which is widely consumed by the people of Eastern Anatolia Region was used. Its essential oil was obtained by hydrodistillation method and lyophilized water, ethanol: water, methanol: water, chloroform and n-hexan extracts were obtained by ultrasonic and classical extraction methods. DPPH• and ABTS•• radical scavenging activities and Cu²⁺ ions reduction capacity data show that essential oil has the highest antioxidant activity (50,040 µg/ml, 80,777 µg/ml and 0,530, respectively). The highest total amount of phenolic and flavonoid substances were found in ultrasonic methanol: water extract (117,222 mg GAE / g extract and 21,325 mg KE / g extract, respectively). The major phenolic components of the extracts were determined by LC-MS/MS as chlorogenic acid and diosmin. The main compounds of volatile oil were identified as α-pinene (20.55%), ocimene (18.83%), terpinolene (7.63%), D-limonene (6,19%), β- caryophyllene (5,44%) and bornyl acetate (5,28%). The mineral substance composition results showed that ultrasound application significantly increased the mineral migration into extracts (p<0,01). In extracts and essential oil, the antimicrobial activity values which were determined by well diffusion method and MIC test, showed weak or moderate activity depending on microorganisms. The highest antimicrobial activity was determined against *Streptococcus mutans* in ethanol: water extracts (31,25 µg/ml). Glutamate induced neurotoxicity data detected using cortex neurons have shown that the neuroprotective effect of essential oil is markedly high.

This study is the first to determine the mineral composition, antimicrobial activity and in vitro neuroprotective activity of pickled *Ferula orientalis* L., essential oil and extracts.

2018, 260 pages

Keywords : *Ferula orientalis* L., antioxidant activity, phenolic compounds, neuroprotective activity, antimicrobial activity, mineral.

TEŞEKKÜR

Berber çalışmaya başladığımız ilk günden itibaren güler yüzü ve canayakın tavırlarıyla daima yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini büyük bir keyif ve sonsuz bir sabırla paylaşmaktan çekinmeyen, doktora tezimin her aşamasında büyük katkısı, desteği ve emeği olan çok sevgili hocam, danışmanım Sayın Prof. Dr. Memnune ŞENGÜL'e,

Yüksek lisans eğitimim ve doktora ders dönemim boyunca tecrübesi, pozitif enerjisi ve bilgi birikimiyle yanımda olan hocam, Sayın Prof. Dr. M. Fatih ERTUGAY'a,

Tez çalışmalarına tavsiye ve önerileriyle yol gösteren Tez izleme Komitesi üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ ve Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e, Antimikrobiyal aktivite analizimin gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar imkânlarını, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bülent ÇETİN'e,

2016/251 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında maddi desteklerinden dolayı Atatürk Üniversitesi'ne, İn vitro nöroprotektif aktivite analizimin yapılmasında laboratuvar imkânı sağlayan, sonuçların değerlendirilmesinde büyük emekleri olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alı TAGHIZADEHGHALEHJOUGHİ'ye,

Birbirinden güzel ve değerli sayısız anıları paylaştığım, her zaman destek ve yakınlıklarını gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Elif DAĞDEMİR ve laboratuvar arkadaşlarım Doktora Öğrencisi Melek ZOR ile Yüksek Lisans Öğrencisi Hacer ÜNVER'e,

Hayata henüz gözümü açmadan benim için fedakârlık yapmaya başlayan ve hala yapmaya devam eden annem Hacer EROĞLU ve babam Mustafa EROĞLU'ya, her zaman yanımda olan kardeşlerim Gülsüm Hale, Sümeyye Zeynep ve Adil Tarık'a; desteği ve hoşgörüsünü benden hiç esirgemeyen eşim Adem TOPDAŞ'a ve elbette hayatıma mutluluk katan, bana şükretmeği öğreten oğlum Enes Furkan'a; tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Elif Feyza TOPDAŞ

Haziran, 2018

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xvi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER..... | 11 |
| 2.1. Ekstraksiyon | 11 |
| 2.1.1. Klasik ekstraksiyon yöntemleri | 11 |
| 2.1.1.a. Soxhlet ekstraksiyonu | 12 |
| 2.1.1.b. Maserasyon..... | 14 |
| 2.1.1.c. Hidrodistilasyon..... | 15 |
| 2.1.2. Modern ekstraksiyon yöntemleri | 19 |
| 2.1.2.a. Ultrason yardımlı ekstraksiyon..... | 19 |
| 2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri | 32 |
| 2.3. Antioksidanlar | 36 |
| 2.3.1. Sentetik antioksidanlar | 37 |
| 2.3.2. Doğal antioksidanlar..... | 39 |
| 2.3.2.a. Enzimatik antioksidanlar | 40 |
| 2.3.2.b. Enzimatik olmayan antioksidanlar | 41 |
| 2.4. Fenolik Bileşikler | 45 |
| 2.4.1. Flavonoidler..... | 46 |
| 2.4.1.a. Flavonlar | 48 |
| 2.4.1.b. Flavonoller..... | 49 |
| 2.4.1.c. Flavanonlar | 49 |
| 2.4.1.d. İzoflavonoidler | 50 |
| 2.4.1.e. Neoflavonoidler | 50 |
| 2.4.1.f. Flavon-3-ol'ler (Kateşinler) | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.1.g. Antosiyaninler | 51 |
| 2.4.1.h. Kalkonlar | 51 |
| 2.4.2. Fenolik asitler | 53 |
| 2.4.2.a. Hidroksibenzoik asitler | 54 |
| 2.4.2.b. Hidroksisinnamik asitler..... | 56 |
| 2.4.3. Tanenler | 57 |
| 2.4.4. Stilbenler | 58 |
| 2.4.5. Lignanlar | 58 |
| 2.5. Antimikrobiyal Aktivite Analizinde Test Edilen Mikroorganizmalar | 59 |
| 2.6. Esansiyel Yağlar, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri | 62 |
| 2.7. Beyin Dokusu ve Serbest Radikaller | 70 |
| 2.8. Glutamat | 73 |
| 3. MATERYAL ve METOT | 77 |
| 3.1. Materyal..... | 77 |
| 3.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar | 78 |
| 3.3. Analizlerde Kullanılan Cihaz ve Aletler | 80 |
| 3.4. Metot | 81 |
| 3.4.1. Çaçırların salamura edilmesi | 81 |
| 3.4.2. Esansiyel yağ eldesi..... | 82 |
| 3.4.3. Liyofilizasyon..... | 82 |
| 3.4.4. Ekstraktların hazırlanması | 83 |
| 3.4.4.a. Klasik ekstraksiyon..... | 83 |
| 3.4.4.b. Ultrasonik ekstraksiyon | 83 |
| 3.4.5. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması | 84 |
| 3.4.6. Renk yoğunluğu | 85 |
| 3.4.7. ICP/MS ile mineral madde kompozisyonunun belirlenmesi..... | 87 |
| 3.4.8. Esansiyel yağ ve ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi | 88 |
| 3.4.9. Esansiyel yağ ve ekstraktların toplam flavonoid bileşik miktarlarının belirlenmesi | 88 |
| 3.4.10. Ekstraktların fenolik bileşen profilinin belirlenmesi..... | 88 |
| 3.4.11. Antioksidan aktivite | 90 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.11.a. Esansiyel yağ ve ekstraktların DPPH• serbest radikal giderme ativitesinin belirlenmesi..... | 90 |
| 3.4.11.b. Esansiyel yağ ve ekstraktların ABTS ^{•+} giderme ativitesinin belirlenmesi..... | 91 |
| 3.4.11.c. Esansiyel yağ ve ekstraktların Cu ²⁺ -Cu ⁺ indirgeme kapasitesinin belirlenmesi (Kuprak Metodu)..... | 92 |
| 3.4.12. <i>Ferula orientalis</i> L. bitkisinin uçucu yağ kompozisyonunun belirlenmesi.... | 92 |
| 3.4.13. Antimikrobiyal aktivite | 93 |
| 3.4.13.a. Bakteri, maya ve küf izolatlarının geliştirilmesi | 94 |
| 3.4.13.b. Esansiyel yağ, ekstrakt ve antibiyotiklerin dozlarının ayarlanması | 95 |
| 3.4.13.c. Kuyu difüzyon yöntemi | 95 |
| 3.4.13.d. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmesi..... | 96 |
| 3.4.14. İn vitro nöroprotektif aktivite | 99 |
| 3.4.14.a. Glutamat toksisitesi ile beyin hipoksi modelinin oluşturulması..... | 102 |
| 3.4.14.b. Ekstraktların uygulanması | 102 |
| 3.4.14.c. MTT analizi | 103 |
| 3.4.14.d. Toplam antioksidan kapasitesi (TAK), toplam oksidan sayısı (TOS) ve hücrelerdeki oksidatif stresin varlığının tespiti..... | 104 |
| 3.4.14.e. Hücrenin Ca ⁺² düzeyinin belirlenmesi..... | 105 |
| 3.4.14.f. Apoptoz etkisinin belirlenmesi | 106 |
| 3.4.15. İstatistiksel analizler | 106 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA..... | 107 |
| 4.1. Ekstraktlar ve Esansiyel Yağın Ekstraksiyon Verimi | 107 |
| 4.2. Ekstraktlar ve Esansiyel Yağın Renk Yoğunluğu | 109 |
| 4.3. ICP-MS ile Belirlenen Mineral Madde Kompozisyonu..... | 114 |
| 4.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı | 126 |
| 4.5. Toplam Flavonoid Miktarı | 131 |
| 4.6. LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşen Profili..... | 134 |
| 4.7. Antioksidan Aktivite | 152 |
| 4.7.1. DPPH• radikali giderme aktivitesi | 152 |
| 4.7.2. ABTS ^{•+} radikal giderme aktivitesi | 158 |
| 4.7.3. Cu ⁺² -Cu ⁺ indirgeme kapasitesi (Kuprak Metodu)..... | 163 |

| | |
|---|------------|
| 4.8. GC-MS ile Belirlenen Uçucu Bileşen Kompozisyonu..... | 167 |
| 4.9. Antimikrobiyal Aktivite | 174 |
| 4.10. İn Vitro Nöroprotektif Aktivite | 185 |
| 4.10.1. Ekstraktlar ile esansiyel yağın MTT sitotoksosite sonuçları..... | 185 |
| 4.10.2. Esansiyel yağ ile muamele edilmiş hücre sıvılarının toplam antioksidan kapasitesi (TAK), toplam oksidan sayısı (TOS) seviyeleri | 196 |
| 4.10.3. Apoptoz bulguları..... | 198 |
| 4.10.4. Hücre ortamı sıvılarının Ca ⁺² düzeyleri | 200 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 206 |
| KAYNAKLAR | 210 |
| EKLER..... | 255 |
| EK 1..... | 255 |
| EK 2..... | 259 |
| EK 3..... | 260 |
| ÖZGEÇMİŞ | 261 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|------------|---|
| a | Kırmızı/yeşil renk değeri (+a=kırmızı, -a= yeşil) |
| b | Sarı/mavi renk değeri (+b=sarı, -b=mavi) |
| C | Kroma Değeri |
| cm | Santimetre |
| dk | Dakika |
| g | Gram |
| Ghz | Gigahertz |
| Hz | Hertz |
| kg | Kilogram |
| KHz | Kilohertz |
| L | Litre |
| L | Koyuluk/açıklık renk değeri (0=siyah, 100=açık) |
| mg | Miligram |
| Mhz | Megahertz |
| ml | Mililitre |
| ° | Derece |
| s | Saniye |
| W | Watt |
| α | Alfa |
| β | Beta |
| ΔE | Toplam Renk Farkı |
| μ l | Mikrolitre |

Kısaltmalar

| | |
|----------|---|
| ADP | Adenozin Difosfat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | Adenozin Trifosfat |
| AÜHADYEK | Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu |
| BHA | Butylated Hydroxyanisole |
| BHT | Butylated Hydroxytoluene |
| CAT | Katalaz |
| CIE | International Commission on Illumination |
| DMSO | Dimethyl Sülfoksid |
| DNA | Deoksirübo Nükleik Asit |
| EPA | United States Environmental Protection Agency |
| F | İstatistiksel Önem Faktörü |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GC-MS | Gaz kromatografisi- Kütle spektrometresi |
| GPx | Glutasyon Peroksidaz |
| GSH | Glutasyon |
| HMDB | The Human Metabolome Database |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| JECFA | Joint of Expert Committee on Food Additives |
| KO | Kareler Ortalaması |
| Kob | Koloni Oluşturan Birim |
| LC-MS/MS | Sıvı Kromatografisi-Kütle /Kütle Spektrometresi |
| MS | Multiple Skleroz |
| NAD | Nikotinamid Adenin Dinükleotit |
| NADPH | Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat |
| NMDA | N-Metil-D-Aspartat |
| PG | Propil Gallat |
| R | Serbest Radikal |

| | |
|---------|---|
| ROT | Reaktif Oksijen Türleri |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| TAK | Total Antioksidan Kapasitesi |
| TBHQ | Tert-Butylhydroquinone |
| TOS | Total Oksidan Sayısı |
| TÜBİVES | Türkiye Bitkileri Veri Servisi |
| USDA | United States Department of Agriculture |
| UV | Ultraviyole |
| WHO | World Health Organization |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Çaşır bitkisi (<i>Ferula orientalis</i> L.)..... | 7 |
| Şekil 1.2. <i>Ferula orientalis</i> L.'in Türkiye üzerindeki dağılımı | 8 |
| Şekil 2.1. Soxhlet düzeneği..... | 13 |
| Şekil 2.2. Clevenger düzeneği | 17 |
| Şekil 2.3. Kavite oluşum ve çöküşü | 22 |
| Şekil 2.4. Ekstraksiyonda kullanılan ultrasonik banyo modeli..... | 26 |
| Şekil 2.5. Probu ultrasonik sistem | 27 |
| Şekil 2.6. Sentetik antioksidanların kimyasal yapıları..... | 39 |
| Şekil 2.7. Askorbik asidin kimyasal yapısı | 42 |
| Şekil 2.8. Glutasyonun kimyasal yapısı | 42 |
| Şekil 2.9. Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapıları | 43 |
| Şekil 2.10. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları..... | 44 |
| Şekil 2.11. Serbest radikal fenolik bileşikler tarafından delokalizasyonu..... | 46 |
| Şekil 2.12. Flavanoidlerin kimyasal yapıları | 48 |
| Şekil 2.13. Elajik asit ve gallik asidin kimyasal yapıları | 55 |
| Şekil 2.14. Kafeik asit ve ferulik asidin kimyasal yapıları | 56 |
| Şekil 2.15. Tanenlerin kimyasal yapıları | 58 |
| Şekil 2.16. İzopren molekülünün kimyasal yapısı..... | 63 |
| Şekil 2.17. a) Nöron hücrelerinin toplu halde görünümü, b) Tek nöron hücresinin kısımları..... | 71 |
| Şekil 3.1. Çaşır bitkisi (<i>Ferula orientalis</i> L.) | 77 |
| Şekil 3.2. Çaşır bitkisinden salamura çaşır üretimi..... | 81 |
| Şekil 3.3. Clevenger düzeneği ve çaşır bitkisine ait esansiyel yağ | 82 |
| Şekil 3.4. Salamura çaşırın liyofilizasyonu ve toz haline dönüşümü | 82 |
| Şekil 3.5. CIE renk sisteminde Hue ve Kroma değerleri..... | 86 |
| Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan indüktif olarak eşleştirilmiş plazma - kütle spektrometresi (ICP-MS) | 87 |
| Şekil 3.7. Uçucu yağ kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılan alkan karışımını içeren kromatogram..... | 93 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 3.8. Antimikrobiyal aktivite analizinde kullanılan bakteri, maya ve küflere ait saf izolatlar | 95 |
| Şekil 3.9. Petri deneme planı | 96 |
| Şekil 3.10. Tek mikroorganizmaya ait 96 kuyucuklu plaka deneme planı..... | 97 |
| Şekil 3.11. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu plakalar | 98 |
| Şekil 3.12. Antimikrobiyal aktivite ölçümlerine ait veri örneği | 99 |
| Şekil 3.13. Korteks bölgesinden nöron hücrelerinin elde edilme aşamaları..... | 101 |
| Şekil 3.14. Nöron hücrelerinin sayımı | 101 |
| Şekil 4.1. Ekstrakt resimleri..... | 111 |
| Şekil 4.2. Ekstraktların a^* renk değeri üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi | 112 |
| Şekil 4.3. Toplam fenolik madde miktarı tayini için gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafik..... | 127 |
| Şekil 4.4. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağın toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması | 128 |
| Şekil 4.5. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi | 128 |
| Şekil 4.6. Toplam flavonoid tayini için hazırlanmış olan standart grafik..... | 131 |
| Şekil 4.7. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağın toplam flavonoid madde miktarlarının karşılaştırılması | 132 |
| Şekil 4.8. Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi | 132 |
| Şekil 4.9. Ekstraktların klorojenik asit miktarları üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi | 139 |
| Şekil 4.10. Klorojenik asitin moleküler yapısı | 140 |
| Şekil 4.11. Gentsik asitin moleküler yapısı | 141 |
| Şekil 4.12. Kafeik asitin moleküler yapısı | 141 |
| Şekil 4.13. p-kumarik asitin moleküler yapısı | 142 |
| Şekil 4.14. Hesperidin ve diosmin molekülleri..... | 147 |
| Şekil 4.15. Ekstraktların diosmin miktarları üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi | 149 |
| Şekil 4.16. Apigeninin kimyasal yapısı | 149 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4. 17. Apigenin-7-O-glikozitin kimyasal yapısı | 150 |
| Şekil 4.18. Luteolin 7-O-glikozitin kimyasal yapısı..... | 151 |
| Şekil 4.19. DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik | 153 |
| Şekil 4.20. Klasik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH• serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması | 154 |
| Şekil 4.21. Ultrasonik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH• serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması | 154 |
| Şekil 4.22. Esansiyel yağın farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH• serbest radikali giderme aktivitesinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması | 154 |
| Şekil 4.23. Ekstraktların DPPH• radikali giderme aktiviteleri üzerine işlem x çözücü interaksyonunun etkisi | 156 |
| Şekil 4.24. ABTS ⁺ serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik | 159 |
| Şekil 4.25. Klasik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS ⁺ serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması | 160 |
| Şekil 4.26. Ultrasonik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS ⁺ serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması | 160 |
| Şekil 4.27. Esansiyel yağın farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS ⁺ serbest radikali giderme aktivitesinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması | 160 |
| Şekil 4.28. Ekstraktların ABTS ⁺ radikali giderme aktiviteleri üzerine işlem x çözücü interaksyonunun etkisi | 162 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.29. Klasik yöntemle elde edilen ekstraktlar ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu ⁺²) indirgeme aktivitelerinin karşılaştırması..... | 164 |
| Şekil 4.30. Ultrasonik yöntemle elde edilen ekstraktlar ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu ⁺²) indirgeme aktivitelerinin karşılaştırması..... | 164 |
| Şekil 4.31. Esansiyel yağ ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu ⁺²) indirgeme aktivitelerinin karşılaştırması..... | 164 |
| Şekil 4.32. <i>Ferula orientalis</i> L. uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS kromatogramı | 167 |
| Şekil 4.33. <i>Ferula orientalis</i> esansiyel yağının başlıca uçucu bileşenleri | 169 |
| Şekil 4.34. α -pinenin moleküler yapısı | 170 |
| Şekil 4.35. Osimen izomerlerinin moleküler yapıları..... | 170 |
| Şekil 4.36. Terpinolenin moleküler yapısı..... | 171 |
| Şekil 4.37. <i>D</i> -limonenin moleküler yapısı | 172 |
| Şekil 4.38. β -karyofilenin moleküler yapısı..... | 172 |
| Şekil 4.39. Klasik yöntemle elde edilmiş su ekstraktının 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri | 186 |
| Şekil 4.40. Klasik yöntemle elde edilmiş etanol: su ekstraktının 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 186 |
| Şekil 4.41. Klasik yöntemle elde edilmiş metanol: su ekstraktının 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 187 |
| Şekil 4.42. Klasik yöntemle elde edilmiş n-hekzan ekstraktının 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 188 |
| Şekil 4.43. Klasik yöntemle elde edilmiş kloroform ekstraktının 10 ⁻¹ , 10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 189 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.44. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 190 |
| Şekil 4.45. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş etanol: su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 191 |
| Şekil 4.46. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş metanol: su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 192 |
| Şekil 4.47. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş n-hekzan ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 193 |
| Şekil 4.48. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş kloroform ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri..... | 194 |
| Şekil 4.49. Çadır esansiyel yağının glutamat indüklü nörotoksisiteye karşı etkisi | 195 |
| Şekil 4.50. Hücre sıvılarının toplam antioksidan kapasiteleri (TAK) | 197 |
| Şekil 4.51. Hücre sıvılarının toplam oksidan seviyeleri (TOS)..... | 198 |
| Şekil 4.52. Kontrol ve deney grupları apoptoz bulguları..... | 199 |
| Şekil 4.53. ICP-MS analizi ile belirlenmiş hücre dışı ortamda bulunan Ca^{+2} seviyeleri | 202 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|-----|
| Çizelge 2.1. Bazı flavonoidler, sınıfları ve buldukları gıda kaynakları | 52 |
| Çizelge 3.1. Klasik ve ultrasonik ekstraksiyonda kullanılan çözücülere ait bazı fiziksel özellikler..... | 83 |
| Çizelge 3.2. Ekstraktlara ait kodlamalar | 84 |
| Çizelge 3.3. Antimikrobiyal aktivite analizinde kullanılan test mikroorganizmaları | 94 |
| Çizelge 3.4. İn vitro nöroprotektif aktivite analizinde kullanılan dozlar | 100 |
| Çizelge 4.1. Farklı yöntem ve çözücülerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağa ait % ekstraksiyon verimi değerleri | 107 |
| Çizelge 4.2. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktların renk parametrelerine ait varyans analiz sonuçları..... | 110 |
| Çizelge 4.3. Çaçır, salamura çaçır, liyofilize salamura çaçır tozu, ekstraktlar ve esansiyel yağa ait renk değerleri | 114 |
| Çizelge 4.4. ICP-MS cihazı ile çalışılan elementlere ait ölçüm limitleri..... | 115 |
| Çizelge 4.5. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktların mineral madde değerlerine ait varyans analiz sonuçları | 116 |
| Çizelge 4.6. Ekstraktlar ve esansiyel yağa ait mineral madde değerleri (ppm)..... | 119 |
| Çizelge 4.7. Ekstraktlar ve esansiyel yağda bulunan toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları | 129 |
| Çizelge 4.8. Toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde değerlerine ait varyans analiz sonuçları | 130 |
| Çizelge 4.9. Standart fenolik bileşiklere ait LC-MS/MS parametreleri..... | 135 |
| Çizelge 4.10. Su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi | 136 |
| Çizelge 4.11. Çaçır ekstraktlarının fenolik bileşenlerine ait varyans analiz sonuçları . | 138 |
| Çizelge 4.13. Ekstraktların IC ₅₀ değerlerine ait varyans analiz sonuçları | 157 |
| Çizelge 4.14. 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarda esansiyel yağ ve ekstraktların kuprik (Cu ⁺²) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla karşılaştırılması | 165 |
| Çizelge 4.15. <i>Ferula orientalis</i> L. uçucu yağ bileşenleri..... | 168 |

| | |
|---|-----|
| Çizelge 4.16. Ekstraktlar ve esansiyel yağın antimikrobiyal aktivitesi | 176 |
| Çizelge 4.17. Çadır ekstraktlarının çalışmada kullanılan bakteri, maya ve küflere karşı oluşturduğu inhibisyon zonu değerlerine ait varyans analiz sonuçları | 179 |



1. GİRİŞ

Doğada bulunan bitkiler, insanlar tarafından gıda, boya ham maddesi, süs veya baharat olarak değerlendirilmelerinin yanı sıra, insanlık tarihi boyunca deneme yanılma ile elde edilen bulgular vasıtasıyla hastalıklardan korunma veya tedavi amacıyla da kullanılmışlardır. Bu amaçla bitkilerin tohum, yaprak, gövde, kabuk, çiçek veya kök kısımlarından ‘öz’ olarak nitelendirilen çeşitli ekstraktlar hazırlanmış ve tedavi amacıyla kullanılmıştır. Günümüzde kullanılan birçok ilaç ekonomik oluşu, zaman- mekân tasarrufu sağlaması gibi sebeplerle; bitkilerde keşfedilen etken maddelerin laboratuvar ortamında sentetik olarak üretilmesi sonucunda elde edilmektedir. Bitkiden ilaç aşamasına geçiş serüveninde bilim dünyasının, halkın sahip olduğu ve çağlar boyunca bazen yazılı, çoğunlukla sözlü olarak aktarılan bilgi birikiminden yararlanması en önemli basamağı oluşturmaktadır. Bu bilgi birikiminin modern tekniklerle birleştirilerek insanlık yararına sunulması; gıda, kimya, botanik ve farmakoloji gibi birçok bilim dalının kombine bir şekilde çalışması ile mümkün olacaktır.

Yenilebilir yabani bitkiler artan dünya nüfusunun önemli gıda kaynaklarından ve vücudun sağlıklı işleyişine katkıda bulunmaktadır (Unuofin *et al.* 2017). FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) raporları özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaklaşık 1 milyar kişinin beslenmesinin yabani bitkilere dayalı olduğunu göstermektedir (Taylor *et al.* 2015). Birçok ülkede favori lezzetler arasında sayılan ve sevilerek tüketilen yenilebilir yabani bitkilerin bazıları aynı zamanda sağlık üzerine faydalı etkileri sebebiyle tedavi amacıyla da kullanılmaktadır (Ubwa *et al.* 2014). Yapılan etnobotanik bir çalışmada, özellikle kırsal alanda yaşayan halkın beslenme ve tıbbi amaçlarla yenilebilir yabani bitkileri çokça kullandıkları ve onlar için bu bitkilerin adeta hayati bir rol oynadığı rapor edilmektedir (Bhogaonkar *et al.* 2010).

Türkiye yaklaşık olarak 10000 bitki türü ile ılıman iklim kuşağının en önemli bitki alanlarından biri olarak bilinmektedir. Ülkemizin sahip olduğu bitki çeşitliği, ekonomimize katma değer sağlayacak gıda ve ilaç sanayi gibi birçok sektörde kullanılmayı bekleyen doğal bir hazine niteliğindedir. Bu durum, araştırmacıları bitkilerin

birer gıda veya ilaç hammaddesi olarak kullanımına yönelik yeni araştırmalar yapmaya sevk etmektedir.

Son 15 yılda bilim dünyasında adeta bir ilgi odağı haline gelmiş olan yenilebilir yabancı bitkiler üzerine yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalarda, bitkilerin geleneksel beslenmedeki yerleri (Heinrich *et al.* 2005; Unuofin *et al.* 2017), elementel kompozisyonları (Renna *et al.* 2015; Konieczynski *et al.* 2016), esansiyel yağ kompozisyonları (Khajeh *et al.* 2005; Pavlovic' *et al.* 2012), pişirme sonrası besin değerleri (Boari *et al.* 2013; Sengül *et al.* 2014), antioksidan aktiviteleri (Ercisli *et al.* 2012; Tupec *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017), fenolik bileşen profilleri (Cappellari *et al.* 2017; Skendi *et al.* 2017), antimikrobiyal aktiviteleri (Yuan *et al.* 2017; Ramdane *et al.* 2017), sitotoksik aktiviteleri (Shayganni *et al.* 2016; Al-Muniri and Hossein 2017; Karakas *et al.* 2017) ve çeşitli hastalıklar üzerine etkileri (Abushouk *et al.* 2017; Fatima *et al.* 2017) gibi çeşitli konular üzerine odaklanılmıştır. Dolayısıyla yenilebilir yabancı bitkiler, başta Avrupa ve Asya olmak üzere neredeyse tüm dünya ülkelerinde sağlıklı ve doğal olmaları sebebiyle ilgi görmektedir (Pereira *et al.* 2011; Sánchez-Mata *et al.* 2012; Renna and Gonnella 2013).

Shirin *et al.* (2010)'a göre, yenilebilir özellikteki yabancı, tıbbi ve aromatik bitkiler çeşitli hastalıklarda mücadelede etkin rol oynayan iz elementlerce zengindir. Bu bitkilerin elementel bileşiminin tespiti; demir, magnezyum, kalsiyum, potasyum, çinko, bakır ve fosfor gibi metabolizmanın işleyişinde etkin esansiyel rol oynayan elementler (Kumar *et al.* 2005) ile civa, kurşun, kadmiyum ve alüminyum gibi sağlık üzerine potansiyel olarak olumsuz etkiye sahip elementlerin (Mamani *et al.* 2005) seviyelerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Esansiyel elementler insan organizmasında başta enzim aktivatörlüğü (Fe, Zn, Mn vs..) olmak üzere birçok metabolik faaliyette rol almaktadırlar (Razic *et al.* 2005). Ayrıca bazı elementler flavonoidler gibi sekonder metabolitlerle etkileşime girerek insan organizmasına dâhil olabilmekte ve etkileşime girdiği bileşiklerin aktivitesini etkileyebilmektedirler (Weber 1988).

Flavonoidler; bitkiler tarafından üretilen, bitki büyüme ve gelişiminde önemli olan çeşitli süreçlerde (UV koruması, pigmentasyon, nitrojen sabitleme nodüllerinin uyarılması ve hastalıklara karşı direnç) (Pierpoint 2000) aktif rol oynayan ve ayrıca antioksidan, antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivite gibi potansiyel biyolojik faydalar sağlayan sekonder metabolitlerdir (Zakaryan *et al.* 2017). Flavonoidler (flavanoller, flavonlar, flavon 3-oller, antosiyaninler, falavanonlar, izoflavonoidler, neoflavonoidler, kalkonlar) ve flavonoid olmayanlar (fenolik asitler, tanenler, stilbenler, lignanlar) olarak iki gruptan oluşan fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubunun bağlandığı en az bir aromatik halka ile karakterize edilmektedirler (Crozier *et al.* 2006). Middleton *et al.* (2000), fenolik maddelerin meyve, sebze, bitkiler, tohumlar, baharatlar ve çayda en büyük sekonder metabolit gruplarını oluşturduğunu ifade etmektedir. Fenolik bileşiklerin sekonder metabolitler olarak adlandırılmalarının nedeni, aromatik amino asit metabolizması sırasında ara bileşikler olarak oluştuğunun düşünülmesi (Naczki and Shahidi 2004) ve bu bileşiklerin bitkinin tamamı veya belirli kısımları için yaşamsal zorunluluğunun olmamasından dolayıdır (Artık vd 2016).

Fenolik bileşikler, önemli antioksidan kaynakları olduklarından reaktif oksijen veya azot türlerinin olumsuz etkilerini nötralize ederek; kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve kanser gibi dejeneratif hastalıkların önlenmesine yardımcı olmaktadır (Henderson *et al.* 2000). Bu dejeneratif hastalıklardan biri olan nörolojik hastalıklar, beyinin belli bölgelerinde bulunan ortak özelliklerdeki nöron gruplarının ölümü ile ortaya çıkmaktadır (Şahan 2010). Nörodejeneratif hastalıkların çoğu reaktif oksijen türlerinin fazlaca üretimi veya oksidatif stres kaynaklıdır (Behl and Moosmann 2002). Basli *et al.* (2012)'ye göre polifenolik maddeler, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve böylece Parkinson, Alzheimer ve iskemi gibi oksidatif strese bağlı nörodejeneratif bozuklukların oluşum riskini sınırlandıran güçlü antioksidanlardır.

Beyin dokusunda doymamış yağ asitleri, demir konsantrasyonu ve oksijen tüketimi fazla iken; antioksidatif enzim aktivitesinin (özellikle glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz) düşük (Alejandro and Nuria 2009; Padurariu *et al.* 2013) olması, beyni oksidatif stresten en fazla etkilenen doku haline getirmektedir. Ortamda serbest radikal

üretimimin artması; antioksidan tüketimini artırmakta, böylece antioksidan kapasitesi azalmakta ve oluşan kısır döngü vücudu oksidatif atağa karşı savunmasız bırakmaktadır (Padurariu *et al.* 2013).

Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların çoğu tedavi sürecinde güçlü etkilerinin yanı sıra; bir dizi yan etkilere de sahiptir. Bu yüzden, tedavide sentetik ilaçların yerine daha az yan etkiye sahip olan doğal kaynaklı ilaçların tercih edilmesi gerektiği rapor edilmektedir (Verpoorte 1999). Doğal kaynaklı ürünler, içerdikleri çeşitli biyokimyasal bileşikler sayesinde organizmalar üzerinde çeşitli biyolojik etkilere sahiptir (Brahmachari 2013) ve bu sebeple binlerce yıldır geleneksel tıp adı altında tedavi amacıyla birer diyet takviyesi olarak kullanılmaktadırlar (Ekor 2014). Güvenilir bileşen profilleri, kolay ulaşılabilir ve ucuz olmaları sebebiyle fenolik bileşikler içeren bitki türleri yeni birer umut verici nutrasötik veya farmakolojik araç olarak görülmekte (Vauzour 2014) ve beyindeki nörodejeneratif bozuklukların önlenmesi veya geciktirilmesi için koruyucu ve/veya tedavi edici yollar izledikleri rapor edilmektedir (Bensalem *et al.* 2016).

Fenolik ve polifenolik maddelerin yanı sıra; tanenler, sülfür içeren bileşikler, terpenler, alkaloidler ve asetilenler de bitkilerde bulunan biyolojik aktiviteleri yüksek olan sekonder metabolit gruplarıdır (Crozier *et al.* 2006). Yenilebilir yabani ve tıbbi bitkilerin içerdiği sekonder metabolitler ve organizmadaki etkileri üzerine yapılmış pek çok çalışma mevcuttur (Katiki *et al.* 2013; Abdelaaty *et al.* 2014; Verma *et al.* 2015; Peng *et al.* 2016; Barrett *et al.* 2017; Brandão *et al.* 2017; Poojary *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017).

Sekonder metabolitler ve/veya diğer biyoaktif bileşenleri içeren meyve, çiçek, bitki veya tohum ekstraktları; doğal olmaları ve biyokimyasal değerlerinin yüksek olması nedeniyle gelişen dünya pazarında rağbet gören ürünlerdir. Coğrafi konumu sayesinde zengin bir bitki örtüsüne sahip olan ülkemizde, doğal olarak yetişen 9000'in üzerindeki bitki türünün etkin bileşenlerinin ekstrakte edilmemesi; bu ürünlerin ticari açıdan değerlendirilememesine ve dolayısıyla gıda, ilaç veya kozmetik endüstrilerinde

kullanılabilecek biyoaktif özellikli ürünlerde dış ÷lkere bağımlı hale gelmemize sebep olmaktadır.

Ekstraksiyon; bitkilerden pigmentler, polifenoller, pektin vs.. gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin izolasyonunda uygulanan ilk basamaktır (Adetunji *et al.* 2017; Rezende *et al.* 2017). Tarihte Mısırlı ve Fenikeliler, Yahudi ve Araplar, Hintli ve Çinliler, Yunanlı ve Romalılar hatta Maya ve Azteklerin; parfüm, kozmetik ürünleri ve gıdalar için kullanılan ekstraksiyon ve distilasyon sistemlerine sahip oldukları bilinmektedir (Chemat *et al.* 2017). Günümüzde ise; gıda, ilaç, kozmetik, nutrasötik ve biyoenerji endüstrilerinde maserasyon (yumuşatma), solvent ekstraksiyonu, kaynatma, buhar veya su distilasyonu, soğuk presleme ve soxhlet ekstraksiyonu (Adetunji *et al.* 2017) gibi klasik ekstraksiyon yöntemlerinin yanı sıra; ultrason yardımlı ekstraksiyon, mikrodalga yardımlı ekstraksiyon, basınçlı çözücü ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi ekstraksiyon işlemlerinin kullanılmadığı bir üretim hattı hemen hemen yok gibidir (Barba *et al.* 2016).

Ekstraksiyonda kullanılan yöntemlerin çoğu; toksik solventlerin kullanımı sebebiyle sağlık üzerine olumsuz etkileri, yüksek sıcaklık uygulamaları ile uzun ekstraksiyon süreleri gibi biyoaktif bileşenlere zarar veren olumsuz ve sınırlayıcı etkilere sahiptir (Garcia *et al.* 2015). Ultrason yardımlı ekstraksiyon işlemi, verimli, hızlı, basit, ucuz ve sürdürülebilir bir sistem olması sebebiyle diğer ekstraksiyon yöntemlerine alternatif bir teknolojidir (Chemat *et al.* 2011; Rezende *et al.* 2017). Bu yöntem kullanılarak bitkiler, hayvan dokuları, mikroalgler ve mayalardan; aroma maddeleri (Caldeira *et al.* 2004; Xia *et al.* 2006; Canales *et al.* 2017) pigmentler (Chen *et al.* 2007; Barbero *et al.* 2008; Zhu *et al.* 2017) antioksidanlar (Ma *et al.* 2009; Viroto *et al.* 2010), fenolik bileşenler (Caleja *et al.* 2017; Chen *et al.* 2018; Nipornram *et al.* 2018) ve diğer organik maddeler (Preece *et al.* 2017; Guo *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017) ile mineral maddelerin (Santos *et al.* 2017) de içerisinde bulunduğu bazı gıda bileşenleri yüksek verimle ekstrakte edilmektedir. Ultrason yardımlı ekstraksiyon uygulamasının biyoaktif bileşenler ve antosiyaninlerin ekstraksiyon verimini %6-35 arasında artırdığı rapor edilmektedir (Vilkhu *et al.* 2008).

Ultrason uygulamasının esası; 20 kHz ile 10 MHz arasındaki ses dalgalarının sıvı ortamda ilerlerken oluşturduğu mikron ebatındaki oyukcukların, hücre duvarında bozunmaya ve parçacık boyutlarında küçülmeye neden olması ve böylece kütle transferini hızlandırarak ekstraksiyon oranlarının artırılmasıdır (Chemat *et al.* 2011). Ultrason uygulaması ile hücre duvarı parçalanarak ortadan kaldırıldığı için diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha hızlı bir ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir (Bayraktaroğlu ve Obuz 2006). Ayrıca, sistemde daha az solvente ihtiyaç duyulması, ultrason yardımlı ekstraksiyonu çevreci bir teknoloji olarak da karşımıza çıkmaktadır (Vilkhu *et al.* 2008; Jadhav *et al.* 2009). Belirtilen nedenlerle ultrason yardımlı ekstraksiyon işleminin gelecekteki uygulamalar için önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir (Er 2014).

Ekstraksiyon yoluyla *Ferula* cinsinden seskiterpenler, seskiterpen kumarinler ve kükürt içeren bileşikler gibi birkaç biyoaktif sınıf izole edilmiştir (Buddrus *et al.* 1985; Appendino *et al.* 1993; Bandyopadhyay *et al.* 2006; Iranshahi *et al.* 2010a; Iranshahi *et al.* 2010b). *Ferula* cinsinin ana bileşeni olan seskiterpen kumarinler; antienflamatuar, sitotoksikite, p-glikoprotein inhibe edici, kanser kemopreventif, antibakteriyel ve antiviral etkiler göstermektedir (Nazari and Iranshahi 2011).

Yenilebilir yabani bir bitki cinsi olan *Ferula*, aynı zamanda aromatik bileşimi ve tıbbi özellikleri ile de dünya çapında tanınmaktadır. *Ferula* cinsi *Apiaceae* familyasından olup genellikle Avrasya'nın kurak bölgeleri, Kanarya Adaları, Kuzey Afrika (Pavlovic *et al.* 2012), İran ve Türkiye'de yetişen 170 türü içermektedir (Downie *et al.* 2000). Cinsin çeşitlilik merkezi Asya'dadır (Drude 1898). Çağlar öncesinden günümüze dek bu cinsin birçok türü gıda olarak veya tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Örneğin; *Ferula orientalis* L. Türkiye'de turşu aroma maddesi olarak (Kartal *et al.* 2007) veya salatalarda kullanılmaktadır. *F. hermonis* Boiss bazlı bitkisel ürünler afrodisyak aktiviteleri dolayısıyla ABD'de gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (Hadidi *et al.* 2003). *F. assa-foetida* L. kökünden elde edilen bir oleogum reçinesi Asya ülkelerinden Hindistan, Nepal, İran ve Afganistan'da baharat olarak kullanılmaktadır (Eigner and Scholz 1999; Teuscher 2006). İran geleneksel tıbbında, *F. assa-foetida* ekstraktları kurt düşürücü olarak kullanımının yanı sıra; karın ağrısı, kabızlık ve ishal tedavisinde kullanılmaktadır (Fatehi

et al. 2004). Benzer şekilde *F. gummosa*'nın oleogum reçinesi ishal tedavisinde kullanılırken (Sadraei *et al.* 2001), toprak üstü ve toprak altı kısımlarının çeşitli ekstraktları ile esansiyel yağının ileum düz kasının kasılmalarını önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir (Sadraei *et al.* 2001). Ayrıca bu bitkinin kökleri tıbbi amaçlı olarak; tonik, ishal önleyici, mide ağrısı, epilepsi ve yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Iranshahi *et al.* 2010b; Nabavi *et al.* 2012). *F.heuffelii* esansiyel yağının spazm giderici, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Pavlovic' *et al.* 2012). İtalya'da *F. communis* antiseptik (Sanna *et al.* 2006) olarak kullanılmaktadır. *F. narthex* Pakistan'da halk arasında öksürük, astım, diş ağrısı, gastrik problemler, kabızlık, boğmaca ve akrep sokmasından kaynaklanan rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Srinivasan 2005; Khan *et al.* 2011; Mahendra and Bisht 2012). Ayrıca, bu bitkinin ekstraktları ile izole edilen bileşenlerinin de kanser ve diyabet önleyici etkileri bilinmektedir (Saleem *et al.* 2001; Iranshahy and Iranshahi 2011). *Ferula* cinsinin sergilediği yüksek biyoaktivite yapılan bu araştırmada bölgemiz coğrafyasında yetişen *Ferula orientalis* L. türüne yönelmemize sebep olmuştur.

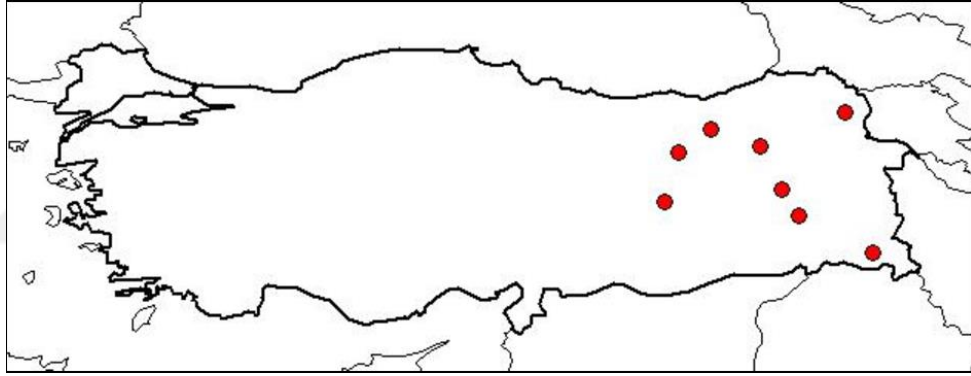
Ferula cinsine ait bir tür olan *Ferula orientalis* L. Doğu Anadolu Bölgesi'nin kayalık yamaçlarında 1600-2900 m rakımda (Tübives 2017) yetişmektedir (Şekil 1.1). Bölge halkı arasında 'Çaşır' olarak adlandırılan bu bitki, nisan ve mayıs aylarında toplanmakta ve salamura edilerek muhafaza edilmektedir.



Şekil 1.1. Çaşır bitkisi (*Ferula orientalis* L.)

Ferula orientalis L.'in sistematikteki yeri (Tübives 2017):

- Alem: *Plantae*
- Alt alem: *Tracheobionta*
- Şube: *Magnoliophyta*
- Sınıf: *Magnoliopsida*
- Alt sınıf: *Rasidae*
- Familya: *Apiaceae*
- Cins: *Ferula*
- Tür: *Ferula orientalis* L. olarak tespit edilmiştir.



Şekil 1.2. *Ferula orientalis* L.'in Türkiye üzerindeki dağılımı (Tübives 2017)

Ferula orientalis L. bitkisi ile ilgili yapılan literatür taramalarında sınırlı sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Yapılan bu çalışmaya en yakın çalışma Kartal *et al.* (2007) tarafından Sivas ilinde yetişen *Ferula orientalis* L. bitkisi ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma kapsamında; bitkinin soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilmiş aseton oleoresin, deodorize aseton oleoresin, deodorize su, metanol ve n-hekzan ekstraktlarının DPPH• radikal giderme aktivitesi ve β -karoten ağartma yöntemleri ile antioksidan aktivite tayini ve GC-MS ile esansiyel yağının kompozisyonu belirlenmiştir. İran'da yetişen *Ferula orientalis* L. köklerinden soxhlet ekstraksiyonu ile n-hekzan, diklorometan ve metanol ekstraktlarının elde edildiği farklı bir çalışmada ise, Razavi *et al.* (2016) ekstraktlardan Ferulone A ve Ferulone B isimli iki yeni kumarin esteri izole etmiştir. Ozkan *et al.* (2014)

ise, *Ferula orientalis* L. bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden elde edilen esansiyel yağların genotoksik ve antigenotoksik özelliklerini değerlendirmişlerdir.

Bu araştırmanın başlangıcında amaç, Doğu Anadolu Bölgesinde halkın faydalı olduğuna inanarak kış aylarında sıklıkla tükettikleri *Ferula orientalis* L. (çaşır) salamurasının esansiyel yağı ile klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen liyofilize su ekstraktlarının; antioksidan, antimikrobiyal ve in vitro nöroprotektif aktivite analizleri ile LC-MS/MS ile fenolik bileşen kompozisyonu ve ICP-MS ile mineral madde kompozisyonunun belirlenmesi idi. Fakat yapılan analizler sonucunda genel olarak su ekstraktlarının analiz sonuçlarının oldukça düşük, esansiyel yağa ait sonuçların ise yüksek olması; bize klasik ve ultrasonik etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının eldesi fikrini vermiş ve analizler tüm ekstraktlar ve esansiyel yağda tekrarlanmıştır. Çalışma amaçları genel olarak özetlenecek olursa;

✓ *Ferula orientalis* L. salamurasında su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan çözücülerinin yanı sıra uygulanan; çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyon, hidrodistilasyon ve ultrason yardımlı ekstraksiyon tekniklerinin; antioksidan, antimikrobiyal ve in vitro nöroprotektif aktivite ile fenolik bileşen, mineral madde ve uçucu yağ kompozisyonları üzerine etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

❖ Bu doğrultuda gerçekleştirilen analizlerden biri olan antioksidan aktivite analizinde, birçok çalışmada kullanılan, uygulamaları basit ve maliyetleri düşük yöntemlerden olan DPPH• ile ABTS•+ serbest radikal giderme aktiviteleri ve Cu^{2+} - Cu^{+} indirgeme kapasitelerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

❖ Ayrıca tüm ekstraktlar ve esansiyel yağda toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarının belirlenmesinin yanı sıra; su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında fenolik asitler ve flavonoidlerden oluşan 19 standart fitokimyasal bileşiği içeren fenolik bileşen profillerinin LC-MS/MS cihazı ile kantitatif olarak belirlenmesi ve çalışmanın bu konuda yapılmış olan ilk araştırma olması hedeflenmiştir.

❖ Hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilmiş esansiyel yağın kimyasal kompozisyonunun GC-MS yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

- ❖ Günümüzün önemli sağlık sorunlarından olan nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik ilaçların çoğu tedavi sürecinde güçlü etkilerinin yanı sıra; bir dizi yan etkilere de sahiptir. Bu çalışmada, polifenolik maddelerce zengin doğal kaynaklı bir ürünün kullanımı düşünülmüş ve oluşturulan glutamata bağlı beyin hipoksi modelinde ekstraktlar ile esansiyel yağın hücre canlılık oranları üzerine etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışma, bu bitki ile nöroprotektif aktivite konusunda yapılan ilk araştırma olma niteliği taşımaktadır.
- ❖ Ekstraktlar ve esansiyel yağa ait mineral madde kompozisyonlarının ICP/MS cihazı ile kantitatif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede kullanılan farklı çözücü ve yöntemlerin mineral madde kompozisyonu üzerine etkileri görülebilecektir. Ayrıca, in vitro nöroprotektif aktivite analizinden elde edilen hücre sıvılarında nöron iletiminde önemli rolü olan ve miktarındaki değişimin hücrelerin canlılık oranları üzerinde oldukça belirleyici olduğu Ca^{+2} iyonu seviyelerinin belirlenmesi de hedeflenmiştir.
- ❖ Antimikrobiyal aktivite analizlerinde; *Escherichia coli* BC 1402, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Streptococcus mutans* ATCC 35668 bakterileri ile *Saccharomyces cerevisiae* BC 6541, *Candida albicans* ATCC 1223, *Aspergillus niger* ATCC 16888 ve *Penicillium roqueforti* BC 111 maya ve küfleri ile kuyu difüzyon metodu kullanılarak ekstraktlar ve esansiyel yağ tarafından oluşturulan inhibisyon zonlarının belirlenmesi ve inhibisyon zonunun gözlenmesi durumunda minimum inhibisyon konsantrasyonlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.
- ✓ Yapılan bu araştırma kapsamında *F. orientalis* L. bitkisinin özellikle esansiyel yağının yüksek antioksidan, antimikrobiyal ve in vitro nöroprotektif aktiviteleri sayesinde fonksiyonel özellikli bu ürünün gıda ve/veya ilaç katkısı olarak ekonomiye kazandırılması hedeflenmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, seçici çözücüler kullanılarak bitki veya hayvan dokularındaki biyoaktif bileşenlerin inört veya inaktif kısımlardan ayrılmasını içeren işlemler bütünüdür (Handa *et al.* 2008). Bitkisel ekstraktlar ise; bitkilerin yaprak, çiçek, tohum, kök veya kabuk kısımlarından bir ekstraksiyon prosedürü uygulanarak elde edilmiş aktif bileşenler veya bileşenlerin karışımı olarak tanımlanabilmektedir. Bitkisel materyallerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu özellikle kozmetik, bitkisel kaynaklı ilaç ve gıda endüstrilerini ilgilendirmektedir (Vinatoru *et al.* 2017). İdeal bir ekstraksiyon yöntemi basit, ucuz, hızlı ve çevreci olmanın yanı sıra; istenen bileşenin yüksek verimde elde edilmesini de sağlamalıdır (Chemat *et al.* 2011). Ayrıca, ekstrakte edilen biyoaktif bileşenler kayıp ve bozunmaya uğramadan ve ilave saflaştırma gerektirmeden elde edilmelidir (Demir *et al.* 2015). Katı: sıvı ekstraksiyonunda verim; çözücü türü, pH, katı-sıvı oranları, partikül boyutu, sıcaklık ve süre gibi faktörlerden etkilenmektedir (İlbay 2016).

Bitkilerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler, klasik ve modern ekstraksiyon yöntemleri olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadır.

2.1.1. Klasik ekstraksiyon yöntemleri

Biyoaktif bileşikler, bitkilerin yaprak, çiçek, sap, kök veya tohum gibi kısımlarından çeşitli klasik ekstraksiyon yöntemleri uygulanarak ekstrakte edilebilmektedirler. Bu tekniklerin çoğu; kullanılan farklı çözücülerin sıcaklık ve/veya karıştırma uygulamaları ile artırılan ekstraksiyon gücüne dayanmaktadır. Klasik ekstraksiyon yöntemlerinde ekstraksiyonun etkinliği temelde çözücü seçimine bağlıdır (Cowan 1999). Hedeflenen bileşiğin polaritesi çözücü seçiminde önemli bir faktördür. Bununla birlikte; çözücü ve çözünen madde arasındaki moleküler çekim, kütle transferi, yardımcı çözücü kullanımı,

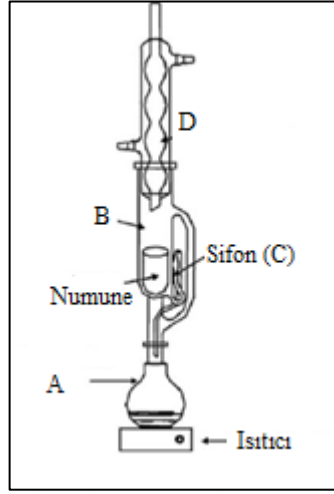
çevre ve insanlar açısından çözücünün güvenliği ve mali açıdan ekonomikliği de dikkate alınması gereken parametrelerdir (Azmir *et al.* 2013).

Bitkilerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan klasik teknikler genel olarak: (1) Soxhlet ekstraksiyonu, (2) Maserasyon (Yumuşatma) ve (3) Hidrodistilasyon olarak sınıflandırılmaktadır (Azmir *et al.* 2013). Aşağıda, bu teknikler hakkında bilgi verilmiştir.

2.1.1.a. Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraktörü ilk defa 1879 yılında Alman kimyager Franz Ritter Von Soxhlet tarafından önerilmiştir. Sistem başlangıçta sadece lipid ekstraksiyonu için tasarlanmış olup zamanla kullanım alanı genişletirek çeşitli doğal kaynaklardan değerli biyoaktif bileşenlerin ekstrakte edilmesinde de yararlanılan bir uygulama haline gelmiştir.

Genellikle az miktarda kuru numunenin içerisine yerleştirildiği güçlü bir filtreden üretilmiş olan timbıl soxhlet aparatının B bölümüne yerleştirilmektedir (Şekil 2.1). A balonunda bulunan çözücü ısıtılmakta ve buharı D kondenserinde yoğunlaşarak numunenin bulunduğu timbıl üzerine damlamaktadır. B bölümündeki sıvı seviyesi C'nin üst kısmına kadar yükseldiğinde yani taşma seviyesine ulaştığında, çözücü sifon yaparak biyoaktif bileşence zengin çözelti aspire edilerek A balonuna aktarılmaktadır. Çözünen bileşenler damıtma balonunda (A) kalırken; çözücü tekrar katı numune üzerine gönderilmektedir. Süreç, kesintisiz bir şekilde devam ederek numunede istenen bileşenler kalmayana kadar devam ettirilmektedir (Azmir *et al.* 2013).



Şekil 2.1. Soxhlet düzeneği

Yöntemin avantajlarından biri, numunenin sürekli çözücü ile temas halinde olmasından dolayı bitki matrisinden uzaklaştırılan biyoaktif bileşenlerin miktarının artmasıdır. Ekstraksiyon sonrası ek bir filtrasyona gerek kalmadan ekstraktın elde edilebilmesi sistemin diğer avantajıdır. Ayrıca, sistem maliyeti düşük ve işlem oldukça basittir (Büyüktuncel 2012). Ancak, diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslandığında, çalkalama işlemi gibi herhangi bir yardımcı uygulama içermediğinden ekstraksiyon oldukça uzun sürmekte ve fazla miktarda solvent kullanılmaktadır. Bu durum çevre kirliliğinin yanı sıra, solventin zararsız hale getirilebilmesi için ek bir maliyet de demektir. Sıcaklık, solventin kaynama noktasına kadar yükselmekte ve dolayısıyla ısıya karşı hassas bileşenler zarar görebilmektedir. Bununla birlikte sistemin optimizasyonu zor ve çözücü seçiciliği ile sınırlıdır (de Castro *et al.* 2010). Sistem küçük ölçekte kesikli olarak çalışsa da orta ve büyük ölçekte sürekli bir ekstraksiyon uygulamasına dönüşmekte ve ekonomik hale gelmektedir (Handa *et al.* 2008).

Son yıllarda çalışma prensibi temelde aynı olan modern soxhlet uygulamaları geliştirilmiştir. Basınçlı soxhlet ekstraksiyonu, ultrason destekli soxhlet ekstraksiyonu, mikrodalga destekli solvent ekstraksiyonu bu uygulamalardan bazılarıdır (Büyüktuncel 2012).

2.1.1.b. Maserasyon

Maserasyon, oda sıcaklığında gerçekleştirilebilen ve dolayısıyla ısıya duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunda rahatlıkla kullanılabilen klasik bir ekstraksiyon yöntemidir (Ngamwonglumlert *et al.* 2017). Eskiden ev yapımı toniklerin hazırlanmasında kullanılırken, günümüzde biyoaktif bileşenler ve esansiyel yağların elde edilmesinde ucuz ve popüler bir yol haline gelmiştir.

Küçük ölçekli ekstraksiyonlarda maserasyon genelde bir kaç adımdan oluşmaktadır. Bu adımlardan ilki, bitki materyalinin küçük parçalara ayrılması ve böylece yüzey alanı büyütülerek çözücü ile düzgün bir şekilde karışmasının sağlanmasıdır. İkinci adım, uygun çözücü ve parçalanmış bitki materyali kapalı bir kap içinde birleştirilmesinden oluşmaktadır. Bekletme sonrası üçüncü aşamada materyale uygulanan baskı ile çözücü ve içerisine geçen biyoaktif bileşenlerin bitki kalıntılarından uzaklaştırılması sağlanmakta ve ardından filtre edilmektedir (Azmir *et al.* 2013).

Maserasyon işleminde içerisinde çözücü ve numunenin bulunduğu kabın ara sıra çalkalanması ekstraksiyonu kolaylaştırmaktadır. Bunun durum, çalkalama işlemi ile numunenin yüzeyinde birikmiş olan aktif bileşenlerce zengin çözeltinin yerine yeni solvent geçişinin sağlanması ve difüzyonun artmasından kaynaklanmaktadır (Azmir *et al.* 2013). Maserasyon ile ekstraksiyonun uzun sürmesi ve fazla miktarda çözücü kullanılması yöntemin en büyük dezavantajlarıdır (Handa *et al.* 2008).

Cha *et al.* (2010), *Chlorella vulgaris* mikroalginden klorofil degradasyonunun indikatörü olan feofitini içeren ekstraktları elde etmek için soxhlet ekstraksiyonu ve maserasyon tekniklerini kullanmış ve 25°C'de 6 saatte maserasyon ile elde ettiği ekstraktı solvent ekstraksiyonu ile 100°C'de 2 saatte elde ettiğini rapor etmiştir.

2.1.1.c. Hidrodistilasyon

Hidrodistilasyon, bitkilerden biyoaktif bileşikler ve esansiyel yağların eldesinde kullanılan klasik bir yöntemdir. İşlem esnasında herhangi bir organik çözücü kullanılmamaktadır. İşlem; su distilasyonu, su ve buhar distilasyonu ve direkt buhar distilasyonu olmak üzere üç şekilde uygulanabilmektedir (Mohammadhosseini 2016). Bitki materyalinin hidrodistilasyonu esnasında hidrodifüzyon, hidroliz ve termal ayrışma olmak üzere üç fizikokimyasal işlem meydana gelmektedir (Azmir *et al.* 2013);

Hidro-difüzyon: Esansiyel yağlar ve sıcak suyun bitki membranından difüzyonu hidro-difüzyon olarak adlandırılmaktadır. Teorik olarak, buhar kuru bitki materyalinde bulunan yağ taşıyan hücrelerden dolayı kuru hücre membranına nüfuz edememektedir. Bitki hücre zarları uçucu yağlar için neredeyse geçirimsizdir. Buharın etki edebilmesi için öncelikle yağ taşıyan hücrelerden uçucu yağın tamamının uzaklaştırılması gerekmektedir. Yalnızca parçalanmış bitki materyali suya batırıldığında buhar dokuya nüfuz edebilmektedir. Bu durumda, dokudaki buhar alış verişi bitki hücrelerinin şişmiş durumdaki geçirgenliklerine dayanmaktadır.

Gerçek süreçte, suyun kaynama sıcaklığında uçucu yağların bir kısmı salgı bezleri içerisindeki suda çözünmektedir. Bu yağ-su karışımı ozmoz yoluyla şişmiş membranlardan difüze olmakta ve son olarak karışım yağın sıcak buhar geçirilerek buharlaştırıldığı farklı bir yüzeye ulaşmaktadır. Hidro-difüzyonun diğer bir yönü de, yağ buharlaşma hızının yağ bileşenlerinin uçuculuğuna değil, onların sudaki çözünürlük derecelerine bağlı olmasıdır. Bu nedenle sistem, yüksek kaynama derecesine sahip fakat suda çözünürlüğü yüksek olan bileşenleri, düşük kaynama noktasına sahip ancak sudaki çözünürlüğü düşük olan bileşenlerden önce bitki dokusundan ayrıştırmaktadır. Parçalanmamış materyallerin hidro-difüzyon oranları oldukça düşük olduğundan esansiyel yağ eldesi parçalanmış materyallere kıyasla daha uzun sürmektedir (Handa *et al.* 2008).

Hidroliz: Mevcut durumda hidroliz, bazı uçucu yağ bileşenleri ve su arasındaki kimyasal reaksiyon olarak tanımlanmaktadır. Uçucu yağ bileşenleri olan esterler su varlığında özellikle yüksek sıcaklıklarda su ile tepkimeye girerek asit ve alkollerini oluşturmaya meyillidirler. Su miktarı fazla ise, alkol ve asit miktarı da fazla olacak ve bu durum da uçucu yağ veriminin azalmasına neden olacaktır. Ayrıca, gerçekleşen reaksiyon zamana bağlı olduğundan; hidrolizin derecesi su ve yağın temas süresine bağlıdır. Bu durum su distilasyonu için bir dezavantajdır (Handa *et al.* 2008).

Termal ayrışma: Hemen hemen tüm uçucu yağ bileşenleri yüksek sıcaklıkta dengesizdir. Buhar distilasyonunda uygulanan sıcaklık derecesi tamamen uygulanan basınca bağlı iken; su distilasyonu ile su-buhar distilasyonunda uygulanan basınç genelde atmosferik basınç olup, basınçtan bağımsızdır.

Daha önce ifade edilen hidro-difüzyon, hidroliz ve termal ayrışma etkileri aynı anda gerçekleşen ve birbirlerini etkileyen fizikokimyasal olaylardır. Difüzyon hızı, esansiyel yağların sudaki çözünürlüğü gibi genellikle sıcaklık arttıkça artmaktadır. Aynı durum, hidroliz oranı ve derecesi için de geçerlidir. Bununla birlikte, sıcaklığı olabildiğince düşük tutarak, buhar distilasyonunda mümkün olduğu kadar az su kullanarak ve bitki materyalini iyice parçalayıp homojen hale getirdikten sonra paketleyerek yüksek verim ve kalitede esansiyel yağ elde etmek mümkündür (Handa *et al.* 2008).

- Su distilasyonu

Su distilasyonu, suya batırılmış kuru veya yaş bitki parçalarının doğrudan ateş uygulaması, kapalı veya açık buhar ceketini ya da kapalı veya açık buhar sarmalı ile ısı uygulanarak kaynatılması yoluyla gerçekleştirilmektedir (Vankar 2004). Yöntemin temel özelliği organik solventlere gerek duyulmaksızın kaynar su ile bitki materyalinin doğrudan temas halinde olmasıdır (Alexandre *et al.* 2017). Kapalı buhar ceketini veya buhar sarmalının aşırı ısınma tehlikesi daha düşüktür. Ancak, doğrudan ateşle ısıtma yapılması durumunda aşırı ısınmayı önleyici tedbirler alınmalıdır. Doğrudan ateş uygulamalarında bitki materyalinin bulunduğu balon, alt kısımda meydana gelebilecek çökeltme ve termal

bozunmaları önlemek için ara sıra çalkalanmalıdır. Ancak, diğer uygulamalarda materyal ve suyun uygun oranlarda karıştırılması durumunda kaynama ile yeterli çalkalama yapıldığından ilave çalkalamaya gerek yoktur ve sistem sabit tutulmalıdır. Materyal mümkün olduğunca parçalanmalı ve yüzey alanı artırılarak çözünen bileşenlerin su ile daha fazla temas etmesi sağlanmalıdır (Handa *et al.* 2008). Su distilasyonunda kullanılan örnek bir sistem olan Clevenger sistemi Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. Clevenger düzeneği

Su distilasyonunda ekstrakte edilcek bitki materyali balon içerisinde kaynayan su ile birlikte. Sıcak su, bitki dokularından biyoaktif bileşenlerin serbest kalmasında ana faktördür. Kaynama sonrası buharlaşan su ve esansiyel yağ karışımı, içerisinden su geçirilen yoğunlaştırıcıya bağlı bir kolona gelmekte ve yoğunlaşmaktadır (Majekodunmi 2015). Daha sonra kolondan biyoaktif bileşenlerce zengin olan esansiyel yağ ve su ayrı ayrı alınmaktadır.

Distilasyon esnasında bitkinin tüm parçalarının kaynayan su içerisinde seyreltik şekilde bulunması ve canlı haldeki buhar ile direkt ve sürekli temas halinde olması yöntemin en büyük avantajıdır. Sistem kurulumunun ucuz ve kolay olması ise sistemin diğer avantajlarıdır (Alexandre *et al.* 2017). Bununla birlikte yüksek ekstraksiyon sıcaklıkları bazı uçucu bileşenlerde kayıplara sebep olabilmektedir. Bu durum, yöntemin sıcaklığa karşı hassas bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanımını sınırlandırmaktadır (Cheok *et al.* 2014).

- Su ve buhar distilasyonu

Su distilasyonu gibi su ve buhar distilasyonu da yaygın olarak kullanılan bir ekstraksiyon yöntemidir. Buhar, sürekli buhar kazanları yardımı ile üretilmektedir. Sistemde kullanılan ekipmanlar su distilasyonunda kullanılan ekipmanlara benzerdir. Ancak su distilasyonundan farklı olarak, bitki materyalinin su üzerinde kalmasını sağlamak amacıyla delikli bir aparat kullanılmaktadır. Kullanılan delikli ızgara veya plaka kapasiteyi azaltmakta ancak esansiyel yağ kalitesini artırmaktadır. Kazanın alt kısmını dolduran su, su distilasyonunda olduğu gibi direkt alev, direkt buhar, buhar çeketi veya buhar halkası ile ısıtılmaktadır. Bitki materyali su üzerinde bulunmakta ve su ile değil sürekli doymuş ve ıslak halde bulunan buhar ile temas halindedir.

Yöntem genellikle küçük işletmeler tarafından tercih edilen bir ekstraksiyon yöntemidir. Diğer ekstraksiyon yöntemlerinde olduğu gibi bitki materyali mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılmalıdır. Aksi takdirde buharın bitki ile tam olarak temas etmesi söz konusu olamamaktadır. Su ve buhar distilasyonunun en büyük dezavantajı, sistemde buhar basıncının düşük olması sebebiyle yüksek kaynama noktasına sahip yağların buharlaşabilmesi için daha fazla buhara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum, distilasyon süresini uzatmaktadır (Handa *et al.* 2008).

- Buhar distilasyonu

Buhar distilasyonu, bitki materyalinin sistem dışında bulunan bir kazanda üretilen buhar ile direkt teması ile gerçekleşmektedir. Su- buhar distilasyonunda olduğu gibi bitki materyali buhar girişi üzerindeki delikli bir ızgara veya plaka üzerine konmaktadır. Su buharı deliklerden püskürtülerek bitki içerisine nüfuz etmektedir. Bitki hücre zarı içerisindeki uçucu yağ sulu çözeltiye difüze olmakta ve ardından buharlaşarak taşınmaktadır. Sistemin en büyük avantajı buhar miktarının kolayca kontrol edilebilmesidir. Ayrıca, su buharı ortamdaki yağların oksidasyonunu önlemektedir. Buhar ayrı bir kazanda üretildiğinden, numune hiçbir zaman 100°C üzerinde bir sıcaklık ile muamele görüp termal bozunmaya maruz kalmamaktadır. Buhar distilasyonu büyük

ölçekli esansiyel yağların üretiminde en çok kabul gören prosestir. En büyük dezavantajı ise büyük ölçeklerde kurulumu için yüksek sermaye gerektirmesidir.

2.1.2. Modern ekstraksiyon yöntemleri

Klasik ekstraksiyon yöntemlerinin; uzun ekstraksiyon süresi, yüksek saflıkta solvent ihtiyacı, büyük miktarlarda solventin buharlaştırılma zorunluluğu, yüksek maliyet, düşük ekstraksiyon seçiciliği ve sıcaklığa hassas bileşenlerin termal bozunumu (Chemat 2017) gibi olumsuz yönlerinin giderilme çabaları, yeni ve umut verici ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesini sağlamıştır (Azmir *et al.* 2013). Bu teknikler, modern ekstraksiyon teknikleri olarak adlandırılmakta ve ultrason yardımlı ekstraksiyon, enzim yardımlı ekstraksiyon, mikrodalga yardımlı ekstraksiyon, darbeli elektrik alanı yardımlı ekstraksiyon, süperkritik akış ekstraksiyonu ile basınçlı sıvı ekstraksiyonu olarak sınıflandırılabilir.

Modern ekstraksiyon tekniklerden bazıları, ABD Çevre Koruma Kurumu tarafından belirlenen standartlara uyduğu için 'yeşil teknikler' olarak adlandırılmaktadır (EPA 2017). Günümüzde geliştirilen yeni tekniklerde aranan özellikler; daha güvenilir kimyasalların kullanımı, enerji verimliliği tasarımı, yenilenebilir hammadde kullanımı, kirliliğin önlenmesi, kısaltılmış ekstraksiyon süresi, düşük maliyet ve kazaların önlenmesi şeklinde sıralanabilmektedir (Chemat 2017).

Bahsedilen modern ekstraksiyon tekniklerinden tez çalışmasında yararlanılmış olduğumuz ultrason yardımlı ekstraksiyon tekniği aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır;

2.1.2.a. Ultrason yardımlı ekstraksiyon

Ultrason yardımlı ekstraksiyon, ısı-kütle transferini hızlandıran ve ekstraksiyon uygulamalarında başarıyla kullanılmakta olan çevreci potansiyel bir teknolojidir. Bu ekstraksiyon yönteminde kullanılan ultrasonik dalgalar, elastik bir ortamda yayılan mekanik dalgalardır. Ses dalgaları ve ultrasonik dalgalar arasındaki fark dalga frekans

aralığıdır. İnsanların algılayabildiği ses dalgaları 16 Hz ile 16-20 kHz arasında iken; insanların duyma eşiğinin üzerinde fakat mikrodalga frekansının altında olan ultrasonik dalgalar ise, 20 kHz ile 10 MHz aralığında yer almaktadır (Chemat *et al.* 2011).

- Ultrasonik dalgaların etki mekanizması

Diğer ses dalgaları gibi, ultrasonik dalgalar da bir ortamdan geçerken parçacıkların boylamasına yer değiştirmelerinden dolayı (Mason 1990) sıkıştırma ve gevşetme fazlarının oluşmasına sebep olmaktadır (Vinatoru *et al.* 2017). Ses dalgası kaynağı ortamda adeta bir piston görevi görmektedir. Piston açık pozisyonda iken ortamda sıkıştırma fazı meydana gelirken; kapalı konumda olduğunda gevşetme fazı vuku bulmaktadır. Gevşetme fazları sırasında negatif bir basınç oluşmakta ve bu basınç molekülleri ayrı ayrı çekmektedir (Suslick 1989). Negatif basıncın büyüklüğü sıvının niteliği ve saflığına bağlıdır (Mason and Lorimer 2002). Sıkıştırma fazında, sıvı fazı oluşturan moleküller geçici olarak yerlerinden koparak çevredeki diğer moleküllerle çarpışabilmektedirler (Chemat *et al.* 2017). Yeterince yüksek yoğunlukta olan bir ses dalgasında gevşetme fazında çekici kuvvetler arası çekim gücü aşılabilmekte ve sıvı içerisinde boşluklar meydana gelmektedir (Mason and Lorimer 2002). Oluşan boşluklar kavitasyon kabarcıkları olarak adlandırılmaktadır. Ortamda çözünmüş halde bulunan buhar veya gazlar gevşetme safhasında kabarcık içine girmekte ve sıkıştırma çevrimi sırasında da tamamen dışarı atılmamaktadırlar. Bu yüzden kavitasyon kabarcıkları birleşerek büyümektedirler (Ashokkumar 2011; Leong *et al.* 2011).

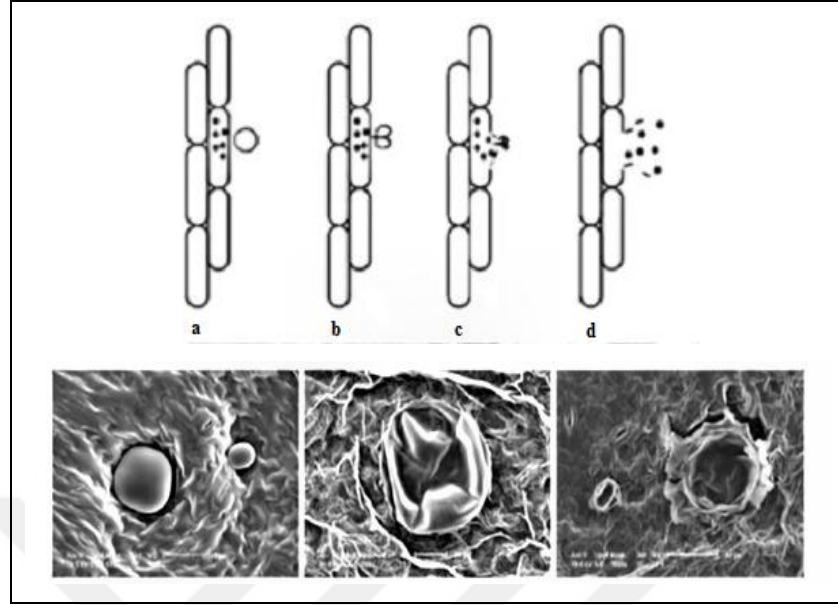
Kavitasyon kabarcıkları kararlı ve geçici kabarcıklar olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadır (Mason and Lorimer 2002; Leong *et al.* 2011). Kararlı kavitasyon kabarcıkları, birçok sıkıştırma-gevşetme döngüsüne maruz kalarak bir denge boyutu etrafında çoğunlukla lineer olmayan bir şekilde salınmaktadırlar. Geçici kavitasyon kabarcıkları ise, bir veya birkaç akustik döngüye maruz kalarak şiddetle çökmeye başlamadan önce başlangıç büyüklüğünü iki katına çıkarmaktadırlar (Mason and Lorimer 2002; Leong *et al.* 2011). Geçici kavitasyon kabarcıkları 'aktif kabarcıklar' olarak kabul

edilmektedir. Ashokkumar (2011), her iki baloncuğun da yüksek enerji ile çöktüğünü vurgulamaktadır.

Kabarcık boyutları kritik bir değere ulaştığında sıkıştırma çevrimi sırasında çökmekte ve çöktükleri yerlerde yaklaşık 50-1000 atm basınç (Suslick 1999) ile 5000 K civarında sıcaklık (Flint and Suslick 1999) açığa çıkarak geçici sıcak noktalar oluşmaktadır (Flint and Suslick 1999). Oluşan sıcak noktalar kimyasal reaksiyon oranını önemli ölçüde hızlandırmaktadır (Suslick *et al.* 1999).

Akustik kabarcıklar katı materyalin yüzeyinde ya da yakınında çökerse bir takım fiziksel etkiler gerçekleşmektedir (Chemat *et al.* 2017). Kabarcıklar katı bir materyalin yüzeyinde çöktüğünde oluşan yüksek basınç ve sıcaklık, mikrojetlerin oluşmasını sağlamaktadır. Mikrojetler, gıda endüstrisinde bitkisel bileşiklerin ekstraksiyonunda ve malzemelerin temizlenmesinde kullanılan ilginç ve etkili bir araçtır (Chemat *et al.* 2011).

Şekil 2.3’de kavitasyon kabarcığının oluşum ve çöküşü gösterilmektedir. Görüldüğü gibi kavitasyon kabarcığı bitki yüzeyinin yakınında üretilmekte (a), ardından sıkıştırma döngüsü sonucu kabarcık çökmekte (b) ve bitki matriksine yönlendirilen bir mikrojet oluşmaktadır (b ve c). Bu işlemde yüksek basınç ve sıcaklık, bitki matrisinin hücre duvarını yok ederek içeriği ortam içerisine boşaltabilmektedir (d).



Şekil 2.3. Kavitasyonun oluşum ve çöküşü

Ultrason uygulaması ile oluşan mikron ebatındaki oyukcuklar hücre duvarında bozunmaya ve parçacık boyutlarında küçülmeye neden olmakta ve böylece kütle transferini hızlandırarak ekstraksiyon oranlarının artmasını sağlamaktadır. Ayrıca, ultrason yardımlı ekstraksiyon işlemi, ekstraksiyon işlem süresini kısaltmakla birlikte daha yüksek saflıkta ürün eldesi sağlamakta, enerji sarfiyatını azaltmakta ve daha az solvent kullanımı ile çevreci bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (Vilkhu *et al.* 2008; Jadhav *et al.* 2009).

Gıda, kozmetik ve ilaç endüstrileri için önemli olan biyoaktif maddelerin ultrason yardımlı ekstraksiyon tekniği ile ekstrakte edilmesi, günümüzde oldukça ilgi çeken bir alan haline gelmiştir. Bu konuda yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Caldeira *et al.* 2004; Xia *et al.* 2006; Chen *et al.* 2007; Barbero *et al.* 2008; Ma *et al.* 2009; Virot *et al.* 2010; Canales *et al.* 2017; Zhu *et al.* 2017; Caleja *et al.* 2017; Chen *et al.* 2018; Nipornram *et al.* 2018).

Bu çalışmalardan biri de Xu *et al.* (2017) tarafından *Limonium sinuatum* çiçeklerinden doğal antioksidanların ekstraksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla ultrason yardımlı ekstraksiyonun kullanımına yöneliktir. Araştırmacılar, 40°C’de %60’lık etanol

kullanarak, 56:9.1 ml/g çözücü: numune oranında, 9.8 dk boyunca gerçekleştirilen ultrason uygulamasının klasik maserasyon ve soxhlet ekstraksiyon metodlarına göre antioksidan aktivite ile verimi artırdığını ve ayrıca ekstraksiyon süresini önemli ölçüde kısalttığını belirtmiştir. Ma *et al.* (2008) ve Hossain *et al.* (2012) ultrason yardımcı ekstraksiyon ile elde edilmiş fenolik maddelerce zengin ekstraktlarda antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu bildirmiş ve bu durumu; ultrason uygulamasının katı fazdan sıvı faza kütle transferini artırmasına bağlamışlardır. Hammi *et al.* (2015) Tunus *Zizyphus lotus* meyvesi için en iyi antioksidan ekstraksiyon koşulunu, 63°C, %50 etanol konsantrasyonunda, 25 dk, 67 ml/g çözücü/katı materyal oranı ile ultrason yardımcı ekstraksiyon işlemi olarak belirlemiştir. Corbin *et al.* (2015), keten tohumlarından lignan ve bazı fenolik maddelerin ekstraksiyonunda ultrason yardımcı ekstraksiyon yöntemini kullanmış ve bu metodun musilaj oluşumunda azalma ve ekstraksiyon verimini artırdığını rapor etmiştir. Benzer şekilde, Caleja *et al.* (2017) *Melissa officinalis* L.'den rosmarinik asit, Machado *et al.* (2017) *Eugenia brasiliensis*, *Rubus fruticosus* ve *Vaccinium myrtillus*'dan antosiyaninler, Velickovic *et al.* (2017) *Erica carnea* L.'den tanen, gallotanenler ve antosiyaninler, Alonso Carrillo *et al.* (2017) *Satureja macrostema*'dan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanmış oldukları ultrason yardımcı ekstraksiyon işleminin etkinliğini vurgulamaktadırlar. Rostagno *et al.* (2003) soyadan farklı ekstraksiyon süreleri ve çözücüler kullanarak dört izoflavon türevinin (daidzin, genistin, glisitin ve malonil) ekstraksiyon verimliliğini karşılaştırdığı bir araştırmada, ultrasonun kullanılan çözücüye bağlı olarak ekstraksiyon verimini artırdığını belirlemişlerdir. Herrera and Luque de Castro (2004), 0,8 saniye aralıklarla 30 saniye boyunca uyguladıkları yarı otomatik ultrasonik yöntem ile çilekten rutin, naringin, naringenin, kuersetin, elajik asit ve kaempferol gibi fenolik bileşikler etkin şekilde ekstrakte ettiklerini rapor etmişlerdir. Li *et al.* (2005), %70'lik konsantrasyonda metanol, 20:1 çözücü: numune oranı ve 30 dk süreyle uyguladığı ultrason yardımcı ekstraksiyon yöntemi ile diğer klasik ekstraksiyon yöntemlerine göre, *Eucommia ulmodies* Oliv.'in taze yaprak, taze kabuk ve kurutulmuş kabuklarından klorojenik asidin daha yüksek verimle geri kazanımını sağlamıştır. Yang and Zhang (2008) *Euonymus alatus* (Thund.) Sieb yapraklarından rutin ve kuersetin biyoaktif bileşiklerini ekstrakte etmek için sonikasyon koşullarını optimize etmiş ve uygulamanın diğer klasik yöntemlere göre daha iyi bir ekstraksiyon verimliliğine sahip olduğu sonucuna varmışlardır. Farklı bir çalışmada

iyonik sıvı bazlı ultrason yardımlı ekstraksiyon işleminin *Catharanthus roseus*'dan vindoline, catharanthine ve vinblastine alkaloidlerinin ekstraksiyonunda etkili olduğu ifade edilmiştir (Yang *et al.* 2011). Benzer şekilde iyonik bazlı ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak fenolkarboksilik asit, karnosik asit ve rosmarinik asitin *Rosmarinus officinalis*'den ekstraksiyonunun klasik yöntemlere göre daha yüksek verim ve daha kısa sürede gerçekleştirildiği Zu *et al.* (2012) tarafından ispatlanmıştır.

Bir çok araştırmada avantajlarından bahsedilen ultrason yardımlı ekstraksiyon uygulamasının bazı olumsuz yönleri de rapor edilmektedir. Zhao *et al.* (2006) bir karetenoid çeşidi olan (all-E)-astaksantin ultrason uygulaması ile degradasyona uğradığını ve ultrasonik güç ile ekstraksiyon süresindeki artışın degradasyonu artırdığını belirtmişlerdir. Biesaga (2011) ise, mirisetin, kuersetin, kamferol, ramnetin gibi flavonoidlerin ultrason ile ekstraksiyonda diğer yöntemlere göre daha fazla degrade olduklarını ileri sürmektedir. Farklı bir çalışmada ise *Aronia melanocarpa* atık kısımlarından ultrason yardımlı ekstraksiyon uygulaması ile antosiyanin eldesi amaçlanmıştır (D'alessandro and Dimitrov 2014). Araştırmada sıcaklık ve etanol konsantrasyonundaki artışın meyvenin içerdiği 17 polifenolik bileşik üzerinde olumlu etki gösterdiği ancak ultrason uygulamasının düşük sıcaklıkta daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklık artışının antosiyaninlerin degradasyonuna sebep olduğu ve sıcaklık arttıkça antosiyanin veriminin düştüğü rapor edilmiştir.

Ultrason yardımlı ekstraksiyon uygulaması ayrıca bitkilerden aroma maddeleri (Caldeira *et al.* 2004; Xia *et al.* 2006; Canales *et al.* 2017), diğer organik maddeler (Preece *et al.* 2017; Guo *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017) ve mineral maddelerin (Santos *et al.* 2017) de içerisinde bulunduğu bazı gıda bileşenlerinin eldesinde de yüksek verimle kullanılmaktadır. Özellikle doğal renk maddelerinin ekstraksiyonunda ultrason kullanımı oldukça yaygındır (Shen *et al.* 2014; Joaquín-Cruz *et al.* 2015; Zhang and Wang 2017; Machado *et al.* 2017). Yomah *et al.* (2014) bitkilerden doğal renk maddelerinin ekstraksiyonunda kullanılan klasik yöntemlere ilaveten mikrodalga yardımlı ekstraksiyon, süperkritik akış ekstraksiyonu gibi modern ekstraksiyon tekniklerinin zaman alıcı olması ve fazla çözücü gerektirmesi ve/veya maliyetinin yüksek olması

dolayısıyla tercih edilebilir olmadığını belirtmiş ve bu tekniklere kıyasla ultrason yardımcı ekstraksiyonun daha ekonomik ve uygulamasının kolay olduğunu ifade etmiştir. Aynı araştırmacılar anatto tohumundan ekstrakte ettikleri renk maddelerinde en yüksek verimi ultrason yardımcı ekstraksiyon yöntemi ile elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Sivakumar *et al.* (2009) farklı bitki materyallerinden ultrasonik yöntemle ekstrakte edilen doğal renk maddelerinin %13 ile %100 arasında artan verimle elde edildiğini bildirmiştir. Leungo *et al.* (2014) domatesin kabuk, tohum veya pulpundan karotenoidlerin ekstraksiyonunda ultrason kullanımının etkin sonuçlar verdiğini ve karotenoidlere herhangi bir zarar vermeksizin ekstraksiyon verimini %143 oranında artırdığını rapor etmişlerdir.

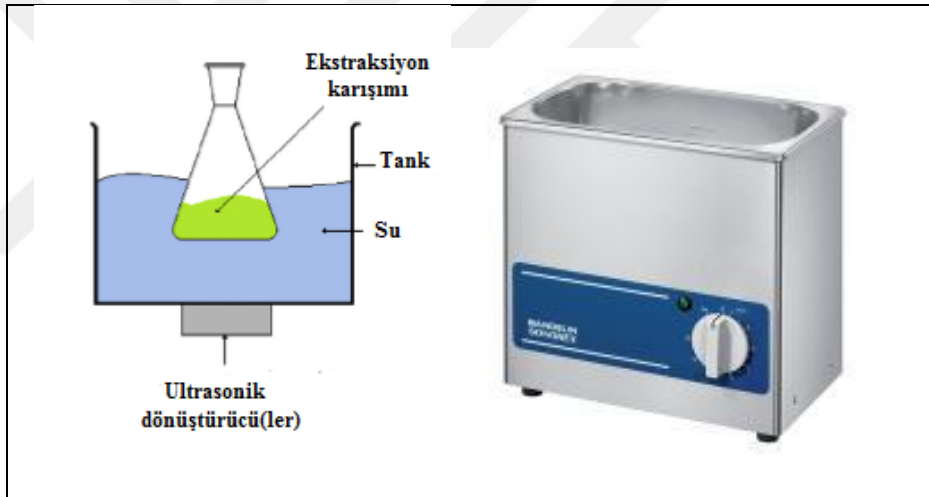
Kimbaris *et al.* (2006), sarımsaktan esansiyel yağ ekstraksiyonunda kullanılan ultrasonik yöntemin hidrodistilasyonla kıyaslandığında sıcaklığa duyarlı moleküllerin degradasyonunu azalttığını rapor etmiştir. Yang *et al.* (2018) pirinçten protein ekstraksiyonunda kullanmış olduğu ultrason yardımcı ekstraksiyon işleminin $p < 0.05$ düzeyinde önemli olarak ekstraksiyon verimini, ürün saflığını ve modifiye edici özellikleri artırdığını belirtmiştir. Pommurugan *et al.* (2017) ay çiçeği atıklarından 3.2 pH değerinde 32 dk boyunca uyguladığı ultrason yardımcı ekstraksiyon işleminde pektinin %8.91 oranında ekstrakte edildiğini ve bu oranın daha önce Shi *et al.* (1996) ve Iglesias and Lozano (2004) tarafından uygulanan klasik ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla çok daha etkili olduğunu ifade etmişlerdir.

- Ekstraksiyonda kullanılan ultrason teknikleri

Yüksek güçlü ultrason, probu ultrason cihazı veya ultrasonik banyo olmak üzere başlıca iki tip cihaz kullanılarak uygulanabilmektedir. Her iki sistemde de ultrasonik güç kaynağı olarak bir güç çevirici (transdüser) kullanılmaktadır. Piezoelektrik dönüştürücü, ultrasonik reaktörler içerisinde en yaygın kullanılan tiptir.

Ultrasonik banyo (Şekil 2.4), en çok bilinen ve kullanılan ultrasonik cihaz türüdür. Genellikle bir veya daha fazla ultrasonik dönüştürücü ile paslanmaz çelik bir tanktan oluşmaktadır. Ultrasonik banyolar genellikle 40 kHz civarı frekansta çalışmakta ve bir

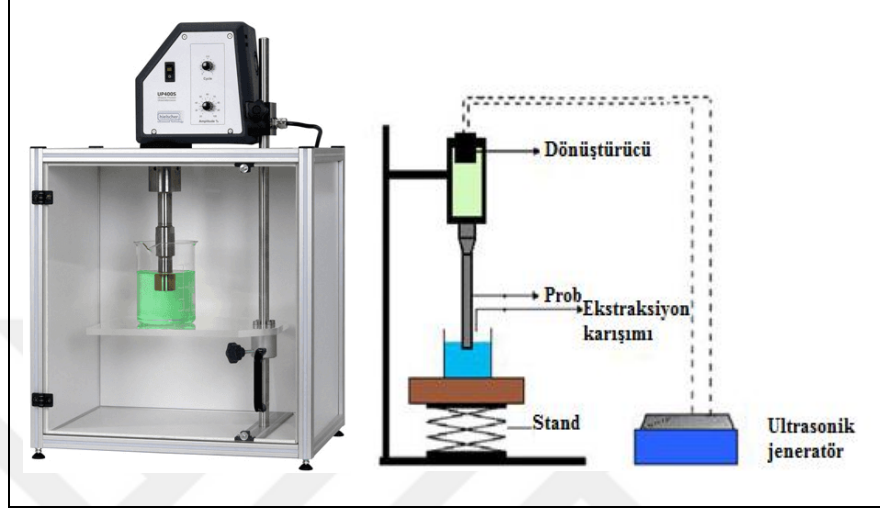
sıcaklık kontrol mekanizması ile donatılmaktadırlar. Olduça ucuz ve kolay erişilebilir olmalarının yanı sıra çok sayıda örnek ile aynı anda çalışma imkânı sunmaktadırlar. Bununla birlikte problu sistem ile karşılaştırıldığında; numuneye direkt gönderilen düşük ultrason gücü sistemin dezavantajıdır. Son zamanlarda ekstraksiyon uygulamaları için bu olumsuzlukların sınırlandırıldığı 25 kHz'de çalışan yeni banyo sistemleri geliştirilmiştir. Bu banyolar, soğutma/ ısıtma sistemleri sayesinde su dolaşımı ile sıcaklık kontrolünü sağlayan çift katmanlı bir manto ile donatılmış paslanmaz çelik bir reaktörden oluşmaktadırlar. Sistem, problu ultrason sistemine göre daha az verimlidir ancak, cihazın kullanım kolaylığı ve aynı anda birden fazla numuneyi işleme alma imkanı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Chemat *et al.* 2017).



Şekil 2.4. Ekstraksiyonda kullanılan ultrasonik banyo modeli (Vinatoru *et al.* 2017)

Ekstraksiyon uygulamalarında ultrasonik problar da tercih edilen sistemlerdir (Şekil 2.5). Prob sistemi ultrasonik banyolara kıyasla daha güçlüdür çünkü gönderilen ultrasonik yoğunluk küçük bir yüzeyden iletilmektedir. Genelde 20 kHz civarında çalışmakta ve dönüştürücü reaktöre daldırılmış bir proba bağlanmaktadır. Böylece minimal enerji kayıplarıyla ekstraksiyon ortamına ultrasonun doğrudan iletimi sağlanmaktadır. Farklı uzunluk, çap ve uç şekillerne sahip prob çeşitleri mevcuttur. Prob seçimi uygulama ve numune hacmine göre yapılmaktadır. Prob tarafından sıvı ortama iletilen ultrasonik yoğunluk reaktörde hızla sıcaklık yükselmesine neden olmaktadır. Reaktörün çift ceketli

bir soğutucu sistem ile soğutulması ekstraksiyon için gereklidir. Bu durum problu sistem için bir dezavantajdır.



Şekil 2.5. Problu ultrasonik sistem

- Ultrason yardımlı ekstraksiyonu etkileyen parametreler

➤ Fiziksel parametreler

Ultrasonik dalgaların frekans, dalga boyu ve genlik gibi özellikleri akustik kaviteasyonu ve dolayısıyla ekstraksiyonu etkilemektedir. Güç girişinin yanı sıra reaktör tasarımı ve prob şekli de süreci etkileyen faktörler arasındadır (Pingret *et al.* 2013).

Güç ve sıcaklık: Sonokimyasal bir süreçte uygulanan akustik güç enerjisinin her zaman rapor edilmese de; doğrudan veya dolaylı olarak ölçülmesine izin veren bazı fiziksel yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler, ultrasonik dalgaların uygulanmasının ardından ortamdaki fiziksel ve kimyasal değişiklikleri ölçerek artan enerjiyi tahmin etmektedir. Akustik basıncın ölçülmesinde en yaygın kullanılan fiziksel yöntemler, hidrofön ve optik mikroskoplar kullanılarak gerçekleştirilen alüminyum folyo yöntemi ve kolorimetrik yöntemdir (Margulis and Margulis 2003). Kaviteasyon kabarcıklarının çöküşü sonrası oluşan OH• radikallerinin indirekt ölçümü de kullanılmakta olan kimyasal bir yöntemdir

(Suslick et al. 2011). Birçok çalışma, yüksek ultrasonik gücün kesme kuvvetini artırdığını ve materyalde büyük değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Ancak, gıda endüstrisinde bu parametre en iyi sonucu elde etmek ve minimum güç kullanmak için optimize edilmiştir (Bermúdez-Aguirre et al. 2011). Genelde, ultrasonik ekstraksiyonda en yüksek verimlilik ultrason gücünün artırılması, çözücü-katı temasını artırmak için gıdanın nem içeriğinin azaltılması ve ekstraksiyon süresini kısaltacak şekilde sıcaklığın ayarlanması ile gerçekleştirilmektedir (Chemat et al. 2017).

Seçilen ultrason frekansı da ekstraksiyon işlemini etkileyen faktörler arasındadır. Frekans, kabarcık rezonans boyutunu etkilemektedir. En çok kullanılan frekans aralığı 20 kHz ile 100 kHz arasındadır. Ultrason yardımlı ekstraksiyonda daha yüksek frekansların kullanımı sadece birkaç çalışmada incelenmiştir. Toma *et al.* (2001) 20 kHz'e kıyasla uyguladıkları diğer yüksek frekans aralıklarının marigold yapraklarının yapısı üzerinde ultrasonun fiziksel etkilerini azalttığını rapor etmiştir. İlginç şekilde, Chukwumah *et al.* (2009) fıstık üzerine yaptığı bir çalışmada uygulanan frekansa göre ekstrakte edilen fenolik bileşenlerin değiştiğini 25 kHz'de daidzein ve genistein elde ederken, 80 kHz'de biyokanin A ve trans-resveratrolün ekstrakte edildiğini bildirmiştir. Ancak 80 kHz frekansta gerekli ekstraksiyon süresinin uzadığına dikkat çekilmiştir. González-Centeno *et al.* (2014) üzüm posasından fenoliklerin ekstraksiyonu amacıyla 40, 80 ve 120 kHz olmak üzere 3 farklı frekans uygulamış ve en etkin frekansın 40 kHz olduğunu rapor etmişlerdir.

Ultrason frekansı arttıkça sıvı içerisinde kavitasyon üretimi ve dolayısıyla kavitasyon yoğunluğu azalmaktadır (Mason and Lorimer 2002). Yüksek frekansta akustik kavitasyonun gerçekleşmesi oldukça zordur. Çünkü kavitasyon baloncukları gevşetme çevrimi esnasında eski haline dönebilmek için bir miktar süreye ihtiyaç duymaktadır ve bu süre yüksek frekansta azalacağı için kavitasyon kabarcıkları yeterince büyüyecektir. Gevşetme fazının süresi ultrasonik frekans ile ters orantılıdır. Bu nedenle yüksek frekansta kavitasyon oluşturmak için daha büyük amplitüd değerleri gereklidir (Mason and Lorimer 2002).

Düşük frekanslarda, geçici kavitasyon kabarcıkları göreceli olarak daha az sayıdadır ancak kabarcık çapları büyüktür ve kimyasal etkilerindense fiziksel etkileri daha fazladır (Leong *et al.* 2011; Mason *et al.* 2011).

Yoğunluk: Ultrasonik yoğunluk, saniyede metrekare emisyon yüzeyi için iletilen enerji olarak tanımlanmaktadır (Tiwari *et al.* 2015). Bu parametre transdüser genliği ve dolayısıyla ses dalgasının basınç genliği ile doğrudan ilişkilidir (Santos *et al.* 2009). Basınç genliğinin artması kabarcık çöküşünün şiddetini artırmaktadır.

Kavitasyon eşiğini aşmak için minimum bir ultrasonik yoğunluk değeri gereklidir. Ultrason yoğunluğu, ekstraksiyon verimini etkileyen önemli faktörlerdendir. Yoğunluktaki artış sonokimyasal etkilerin de artışına neden olmaktadır (Mason and Lorimer 2002). Genliğin (amplitud) artması ultrason yoğunluğunu artırıp kavitasyon yerine sıvının karışmasına ve dolayısıyla zayıf ultrason iletimine sebep olarak ultrasonik transdüserin hızla bozulmasına neden olabilmektedir. Ancak, yağ gibi yüksek viskoziteli sıvılarla çalışılırken amplitüd değeri artırılmalıdır (Santos *et al.* 2009).

Wang *et al.* (2015) ultrason yardımcı ekstraksiyon ile pektin eldesi üzerine yapmış oldukları çalışmada, 20 kHz frekansta ultrasonik yoğunluk değerini 10.18-14.26 W/cm² olarak belirlemişlerdir. Ancak, Chemat *et al.* (2017) bu yoğunluk değerinin optimizasyona tabi tutulması gerektiğini çünkü ultrasonik yoğunluğun çok yüksek olmasının verimin çok artacağı anlamına gelmediğini rapor edilmiştir. Benzer şekilde soya yağı ekstraksiyonunda 20 kHz frekansta, 16,4, 20,9 ve 77,6 W/cm² ultrason yoğunluğunun belirlendiği bir çalışmada verim 20,9 W/cm² değerine kadar artmış ancak yoğunluktaki artışa paralel bir verim artışı kaydedilmemiştir (Li *et al.* 2004).

Ultrasonik reaktörlerin şekli ve boyutu: Ultrasonik dalgalar katı yüzeylerde yansıdığından dolayı ultrasonik banyo kullanılması durumunda; reaksiyon kabının şekli oldukça önemlidir. Dalgaların en düşük düzeyde yansması için en iyi seçim altı düz konik şekilde cam numune kaplarıyla çalışmaktır (Lorimer and Mason 1987). Numune kabının duvar kalınlığı ultrason iletimini zayıflatmamak adına mümkün olduğunca minimum

seviyede olmalıdır (Santos *et al.* 2009). Reaktör boyutlarının hesaplanması, maksimum verime ulaşmak ve ortama maksimum enerji transferini sağlamak için vericinin transdüserine göre konumu belirlenmelidir (Sun *et al.* 2011). Ultrasonik problar kullanıldığında hem dairesel hem de aksenel olarak yoğunluğun hızla azaldığı gözlemlenmektedir. Bu yüzden ultrasonik prob ile kap duvarı arasında, birbirlerine dokunmayacak şekilde minimum boşluk bırakılmalıdır (Santos *et al.* 2009). Ekstraksiyonda ultrasonik probun kullanılması durumunda prob şekli ve çapının ekstraksiyon üzerine etkili olabileceği düşünülmektedir. Probların çoğu ısı ve korozyona karşı dayanıklı olmaları nedeniyle titanyum alaşımından üretilmektedir. Ancak zamanla aşınan problemlerin kullanılması ekstraksiyon ortamına metal parçaların geçişine neden olmaktadır. Pyrex ve quartz malzeme kullanımının metallerin ortama iletimi problemini çözebileceği düşünülmektedir (Cravotto *et al.* 2008).

➤ Ortam ile ilgili parametreler

Ortam, ultrason yardımlı ekstraksiyon işleminin etkinliğinin artırılması için dikkate alınması gereken birçok unsuru içermektedir. Bu unsurlar aşağıda açıklanmıştır.

Solvent: Ultrason yardımlı ekstraksiyon işleminde ekstraksiyon verimi üzerine, hedef metabolitlerin çözünürlüğünün yanı sıra çözücünün viskozite, yüzey gerilimi ve buhar basıncı gibi fiziksel parametrelerin de etkisi vardır. Bu fiziksel parametreler akustik kavitasyon üzerine etkilidir (Mason and Lorimer 2002). Bir sıvıda kavitasyonun başlaması için gevşetme döngüsünde negatif basıncın sıvıyı oluşturan moleküller arasındaki koheziv kuvvetlerin üstesinden gelmesi gerekmektedir. Viskozite veya yüzey geriliminin artması moleküler etkileşimlerde artışa neden olarak kavitasyon eşiğini önemli ölçüde yükseltmektedir. Bu yüzden yüksek viskoziteli sıvılarla çalışılırken amplitüd değeri yükseltilmelidir. Çünkü örnek viskozitesi artınca ultrasonik cihaz hareketi (örneğin prop ucu)'ne karşı örneğin direnci artmaktadır. Bu nedenle kavitasyonla sonuçlanacak gerekli mekanik titreşimleri elde edebilmek için yüksek yoğunluk (veya yüksek amplitüd değeri) önerilmektedir (Santos *et al.* 2009). Ultrason yardımlı ekstraksiyon işleminde yüksek buhar basıncına sahip çözücülere kıyasla kavitasyon

kabarcıklarının çöküşü daha yoğun olduğundan düşük buhar basınçlı çözücüler tercih edilmektedir (Santos *et al.* 2009). Buhar basıncı sıvı ortamın sıcaklığına da bağlıdır.

Sıcaklık: Sıcaklık, çözücü özelliklerini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Sıcaklık artışı viskozite ve yüzey geriliminde düşüğe sebep olurken; buhar basıncını artırmaktadır. Buhar basıncında meydana gelen artış ise, kabarcıklar içerisine daha fazla çözücü buharı girmesine neden olarak çok sayıda daha az şiddette çökecek kabarcıkların oluşumuna neden olacak ve dolayısıyla daha yüksek sıcaklıklarda sonikasyon etkisi azalacaktır (Santos *et al.* 2009). Bu nedenle düşük sıcaklık dereceleri tercih edilmekte ve genelde sıcaklık artışını sınırlandırmak için sıcaklık kontrolü yapılmaktadır (Sališová *et al.* 1997). Genellikle belli bir seviyeye kadar olan sıcaklık artışının ekstraksiyon verimini artırdığı bilinmektedir (Palma *et al.* 2013). Sonikasyon uygulanmamış örneklerle kıyaslandığında 20 ile 70°C arasındaki sıcaklık artışının ekstraksiyon verimini artırdığı bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmektedir (Shirsath *et al.* 2012; Chemat *et al.* 2017). Bu etki, kavitasyon kabarcıklarının sayısının artması, çözücü-katı temas alanının daha fazla olması, solvent difüzyonunun artması ve dolayısıyla istenen bileşiklerin hücre içinden çıkışı ve çözünürlüklerinin artmasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte sıcaklık çözücünün kaynama noktasına yakın olduğu zaman bu etkinin azaldığı tespit edilirken aynı zamanda; çoğu araştırmacı 30°C'nin altındaki düşük sıcaklığın verimlilik üzerine yararlı etkisini bildirmektedir (Palma and Barroso 2002; Zhang *et al.* 2008; Esclapez *et al.* 2011). Sıcaklığın hedef bileşiğe göre seçilmesi önemlidir (Zhang *et al.* 2009a; Zhang *et al.* 2009b). Dolayısıyla, sıcaklığa karşı hassas bileşiklerin bozulmasını önlemek için sıcaklık kontrolü gerekmektedir.

Çözünmüş gazların varlığı ve dış basınç: Ortamda gazların olmaması kavitasyon kabarcığı oluşumunu zorlaştırmaktadır. Çünkü kavitasyon kabarcıkları sıvıda çözünmüş gazlardan oluşmaktadır (Pétrier *et al.* 2008). Çözünen gazlar çözücü içerisinde yeni kavitasyon kabarcıklarının oluşturulması için adeta çekirdek görevi üstlenmektedir (Mason and Lorimer 2002; Leong *et al.* 2011). Genel olarak ekstraksiyon alanında çözücü içerisinde çözünmüş gaz bileşimi kontrol edilememektedir. Dış basıncın artması durumunda, kavitasyonu sağlamak için daha büyük bir akustik basınç gerekecektir.

Ancak, kavitasyon eşiğine dış basıncın altında (>1 atm) ulaşırsa kavitasyon kabarcıklarının çöküş yoğunluğu basınçsız ortama göre daha yüksek olmakta ve dolayısıyla sonokimyasal etki artmaktadır (Santos *et al.* 2009; Leong *et al.* 2011).

Matriks parametreleri: Ultrason yardımcı ekstraksiyonun hedefi ve hedef moleküle bağlı olarak bitki matriksi taze (alg veya maya gibi..) veya kuru (bitkiler, yağlı tohumlar gibi..) olarak kullanılabilir. Matrikse uygulanan ön işlemler oldukça önemlidir ve ekstraksiyon verimliliğini etkileyebilmektedir (Vinatoru 2001). Hedef bileşenin çözünürlük ve stabilitesi ile seçilen çözücü ve sıvı ortam sıcaklığı ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Benzer şekilde, ekstraksiyon sistemi heterojen ve gözenekli bir ortam olduğundan kavitasyon kabarcıklarının boyutu da ekstraksiyon verimi üzerine etkilidir. Maddenin katı/sıvı oranı ve parçacık boyutu gibi diğer faktörler de ekstraksiyon etkinliği ile alakalıdır. Ekstraksiyon verimi; bitki materyalinin yapısı, esnekliği veya bileşim farklılıklarına bağlı olarak farklı dercelerde değişebilmektedir (Vilkhu *et al.* 2011).

2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Antioksidan hikâyesinin başlangıcı olan serbest radikaller, atomik bir yörüngede bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren, bağımsız olarak varolma yeteneğine sahip, kısa ömürlü moleküllerdir (Cui *et al.* 2004). Eşlenmemiş elektron varlığı, radikallerde bazı ortak özelliklerin oluşmasını sağlamaktadır. Radikallerin çoğu düşük molekül ağırlığına sahip, kararsız ve oldukça reaktiftir. İlave olarak, radikaller diğer moleküller ile elektron alış verişi yaparak indirgeyici veya oksitleyici olarak davranmaktadırlar (Lobo *et al.* 2010). Ayrıca, serbest radikaller; DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik olarak önemli moleküllerin çekirdek ve zarlarına zarar vererek, hücre hasarı ve homeostatik bozulmaya neden olmaktadır (Young and Woodside 2001).

Serbest radikaller üzerine 1900'de Gomberg tarafından trifenilmetil radikali ($\text{Ph}_3\text{C}\cdot$) üzerine yapılan çalışma (Gomberg 1900) ile başlatılan süreç, 1900'lü yıllarda serbest radikal özelliği taşımayan birçok molekül üzerinde yoğun bir şekilde devam etmiştir (Weiss 1935; Waters 1943; Cadogan 1973). 1968 yılına gelindiğinde, hücresel toksisiteye

sebeup olan süperoksite radikalini bazı çözeltilerde tespit edilmiş (McCord 1969) ve araştırmalar günümüze dek uzanmıştır (Frankel 1980; Papas 1993; Duthie 1996; Uğuzlar 2009; Lobo *et al.* 2010; İslam *et al.* 2017). Özellikle tıp, biyoloji, gıda, farmakoloji ve toksikoloji bilim dallarında ilgi çeken serbest radikaller ile sağlık üzerine etkileri ve giderilme yolları günümüzde halen ilgi gören ve üzerine birçok çalışmanın yapıldığı bir konudur.

Aerobik bir metabolizmada reaktif oksijen türlerinin oluşumu doğal bir süreçtir ve dokunun oksijen homeostazını sürdürebilmesi için gereklidir (Castro and Freeman 2001). Serbest oksijen türleri, zincirleme reaksiyonların başlatılması ve/ veya ilerlemesini sağlayan radikal ve radikal olmayan tüm oksijen türlerini içermektedir. Kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları, akciğer hastalıkları ve katarakt gibi birçok hastalığın oluşumunda rol oynayan en önemli oksijen içeren serbest radikaller; hidroksil radikalı (OH•), süperoksit anyon radikalı (O₂⁻), singlet oksijen (¹O²), nitrik oksit radikalı (NO), peroksinitrit radikalı (ONOO⁻)'dir (Cui *et al.* 2004).

Canlı sistemlerde üretilen radikal türlerinin en önemli kaynağı oksijendir (İslam *et al.* 2017). Moleküler oksijen kendine özgü bir elektronik konfigürasyona sahip olan bir radikaldir. Moleküler oksijene bir elektron eklenmesi ile süperoksit anyon radikalı elde edilmektedir (Miller *et al.* 1990).

Süperoksit anyonu metabolik işlemler sırasında, fiziksel radyasyon, enzim ya da metal katalizli işlemler yoluyla sekonder reaktif oksijen türlerini üretmek için diğer molekül türleri ile fazlaca etkileşime girebilen primer bir reaktif oksijen türü olarak düşünölmektedir (Valko *et al.* 2005). Bu serbest radikal, oksidatif reaksiyonlarda adeta bir aracı olup dismutasyonu sonucu hidrojenperoksit (H₂O₂) üretilmektedir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir ancak, reaktif oksijen türleri (ROT) kapsamına girmekte ve serbest radikal oluşum sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Hidrojen peroksit, Fe²⁺ veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu (Fe (II) + H₂O₂ → Fe (III) +•OH+OH⁻) süperoksit radikalının (O₂⁻) varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu (O₂⁻+H₂O₂ → O₂+•OH+OH⁻) en reaktif serbest oksijen radikalı olan

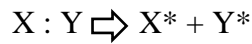
hidroksil radikali (OH•)'nin oluşumunu sağlamaktadır (Al-Gubory *et al.* 2010). Hidrojen peroksit gibi hipoklorit de bir serbest radikal değildir ancak, kuvvetli bir oksitleyicidir. Hipoklorik asidin hücre membranını bozarak hücrenin parçalanması ve ölümüne yol açtığı, proteinlerin sülfidril gruplarına saldırdığı ve DNA pürin bazlarını klorlayabildiği bilinmektedir (Özenç 2011).

Nitrik oksit, gaz formunda olan önemli bir serbest radikaldir. Oksijenle birleşerek zehirli azot dioksit gazını oluşturabildiği gibi; süperoksit ile aralarında gerçekleşen reaksiyon sonucu peroksinitrit (ONOO•) oluşumuna da katkıda bulunmaktadır. Peroksinitrit DNA'da oksidatif hasara neden olmaktadır (Ak 2006). Nitrik oksit, kan damarlarındaki endotel hücreler tarafından düşük düzeyde üretilen süperoksit ile birleşerek radikal olmayan ürünlerin oluşumunu da sağlamaktadır. Yapılan araştırmalarda; nitrik oksidin kan basıncının düşürülmesini sağladığı, kan dolaşımını düzenleyerek damar sertliğini önlediği veya geciktirerek metabolizmanın işleyişinde etkili olduğu belirlenmiş ve metabolizma için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Uğuzlar 2009).

Serbest radikallerin oluşum mekanizması:

Serbest radikaller 3 şekilde oluşmaktadır.

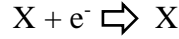
1. Normal bir molekülün kovalent bağının homolitik olarak ayrılması ile,



2. Normal bir molekülden tek elektron kaybı ile ve



3. Normal bir moleküle tek elektron transferi ile oluşabilmektedir.



Eşlenmemiş elektron bir radikal tarafından bir moleküle transfer edilebilmektedir. Eşlenmek için diğer moleküllerden elektron alabilmekte veya basitçe bir moleküle bağlanabilmektedir. Radikalin elektron vermesi, elektron alması veya farklı bir anyona bağlanması ile adeta bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen bir radikalden başka bir radikal oluşumu gerçekleşmektedir (Islam *et al.* 2017).

Serbest radikal oluşumu hem enzimatik hemde enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucu hücrelerde sürekli olarak meydana gelmektedir (Bachi and Puri 1998). Serbest radikallerin kaynağı olarak işlev gören enzimatik reaksiyonlar; solunum zincirinde, fagositozda, prostagladin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde yer alan reaksiyonları içermektedir. Serbest radikaller oksijenin organik bileşiklerle olan enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarında da oluşabilmektedirler (Liu *et al.* 1999). Bazı dâhili serbest radikal kaynakları: mitokondri, ksantin oksidaz, peroksizomlar, iltihap, fagositoz, araşidonat yolları, iskemi/ reperfüzyon hasarı iken; bazı harici serbest radikal kaynakları ise sigara içilmesi, çevre kirleticileri (Asbest lifleri, mineral tozlar, ozon, karbon monoksit, nitrik oksit, nitrojen dioksit, silika, bazı solventler, toksinler, hipoklorit, kükürt dioksit, yangın, PCB, parakuat, dikuat, plumbagin, juglone) radyasyon (UV, x-ray, gamma ışınları), bazı ilaçlar (Aminotriazol, asetaminofen, bleomisin, doksorubisin, hiperbarik oksijen, klonazin, klosapin, 3,4- metilendioksimetamfetamin, nitrofurantoin, siprofloksasin, siklosporin, trisiklik antideprezanlar, troglitazon gibi..) böcek öldürücüler ve endüstriyel solventlerdir (Ebadi 2001).

Normal şartlarda vücudumuz, oksidatif hasara karşı kendini korumaktadır. Ancak yukarıda sayılan fatörlere ilaveten ilerleyen yaş, yorgunluk, fazla kalorili veya yağlı beslenme gibi olumsuz durumlarda oksidan/antioksidan dengesi bozulmakta ve bu durum oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır (Günaldı 2009).

Islam *et al.* (2017)'ye göre, organizmalar çeşitli kaynaklardan gelen serbest radikallere maruz kalmaları durumunda savunma mekanizmaları geliştirmektedirler. Bu savunma

mekanizmaları; önleyici mekanizmalar, onarım mekanizmaları, fiziksel savunma ve antioksidan sentezinden oluşmaktadır. Enzimatik antioksidan savunma mekanizması glutasyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ile katalaz (CAT)'dan oluşmaktadır. Lipoksigenaz, monoamin oksidaz, sitokrom P-450 enzimleri ve oksido redüktaz ise diğer enzimatik kaynaklardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (C vitamini), korotenoidler, α -tokoferol (E vitamini), glutasyon (GSH), flavonoidler ve diğer antioksidanlardan oluşmaktadır.

2.3. Antioksidanlar

Antioksidan, ilk serbest radikal oluşumunu baskılayarak oksidasyonu inhibe eden veya daha fazla serbest radikal oluşumunu engelleyerek reaksiyonun ilerlemesini ve istenmeyen ürünlerin oluşumunu önleyen maddedir (Usal 2014). Çeşitli bileşiklerin oksidatif bozulmayı önleyen veya inhibe eden düzeyde antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiş olmasına rağmen güvenlik nedenlerinden ötürü gıdalarda antioksidan olarak sadece birkaçı kullanılabilir (Islam *et al.* 2017).

Gıda ürünlerinde antioksidan kullanımını ulusal ve uluslararası standartlar ile düzenleyen otoriteler mevcuttur. İlk kez 20 Şubat 1995 tarihinde Avrupa Parlamentosu ve Konsey Yönergesi 95/2/EC ile renk ve tatlandırıcılar dışındaki gıda katkı maddeleri üzerine antioksidan kullanımının düzenlenmesi yapılmıştır. Günümüzde antioksidan kullanımı Codex Alimentarius komisyonu tarafından düzenlenmektedir. Bu organizasyon yalnızca JECFA (Joint of Expert Committee on Food Additives) tarafından değerlendirilmiş antioksidanların kullanımına izin vermekte ve izin verilen antioksidanlar sadece kodeks tarafından standartlarda belirtilen gıdalarda kullanılabilir (Mikova 2001; Shahidi and Zhong 2005).

Halliwell (1995)'e göre antioksidan sistemleri etkilerini birbirinden bağımsız veya beraber işleyebilen 6 farklı mekanizma ile sergilemektedir. Bu mekanizmalar sırası ile;

- Oksijen molekülü ile reaksiyona girerek veya oksijenin yerini alarak ortamdaki oksijen konsantrasyonunu azaltmaları,
- Hidroksil radikalinde bulunan hidrojen atomlarına bağlanabilecek molekülleri ortamdaki uzaklaştırarak peroksidasyonun başlamasını engellemeleri,
- Singlet oksijeni baskılayarak membran lipidlerini etkileyip peroksit oluşmasını engellemeleri (Cheeseman and Slater 1993),
- Metal iyonlarını bağlayarak reaktif grupların serbest radikal oluşmasını önlemeleri,
- Peroksitleri indirgeyerek alkoller gibi radikal özellik taşımayan ürünlerin oluşmasını sağlayabilmeleri (GPx bu duruma en iyi örnektir),
- Zincir oluşturma kabiliyetinde olan serbest radikallerle reaksiyona girerek yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilmeleri ve böylece zincir kırma özelliği göstermeleridir. Fenoller, aromatik aminler ve α -tokoferol zincir kırıcı antioksidanlar arasındadır (Halliwell 1995).

Islam *et al.* (2017) ise antioksidanları etki mekanizmalarına göre 2 gruba ayırmaktadır. İlk grup hidrojen vererek oksidasyon zincirini kıran ve kararlı radikaller oluşturan birincil antioksidanlardır. İkinci grubu ise metal çelatlama, birincil antioksidan rejenerasyonu, hidroperoksitlerin ayrışması ve oksijen temizleme (scavenging) gibi bir dizi mekanizma sayesinde oksidasyonu yavaşlatan ikincil antioksidanlar oluşturmaktadır.

Farklı bir sınıflandırmada antioksidanlar sentetik ve doğal antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Islam *et al.* 2017).

2.3.1. Sentetik antioksidanlar

Tokoferol ve askorbik asit gibi doğal olarak gıdalarda bulunan çeşitli antioksidanlar depolama veya işleme sırasında kısmen kaybolabilmektedir. Bu nedenle sentetik antioksidanlar işleme esnasında oksidasyonu önlemek için gıdalara eklenmektedir (Pratt 1996). İşleme sırasında gıdalara ilave edilecek antioksidanlar; toksik olmamalı, düşük

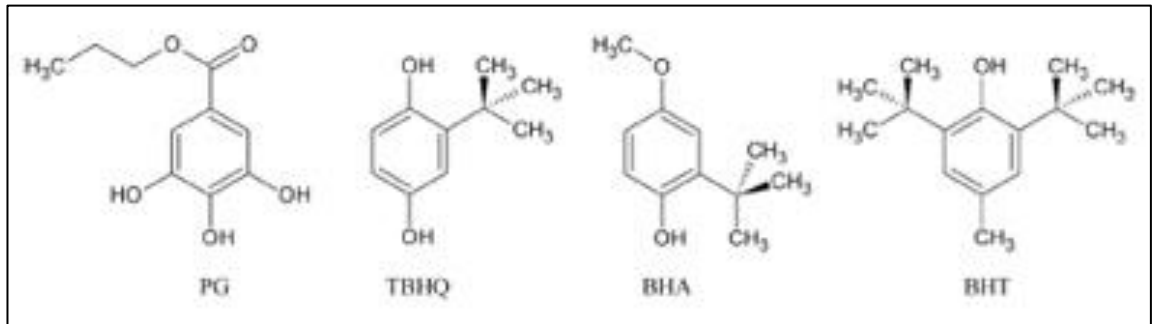
seviyelerde etkili olmalı (%0,001-0,02), işleme sırasında ve son üründe stabil olmalı, ürüne istenmeyen renk, koku, lezzet vermemeli ve pahalı olmamalıdır (Islam *et al.* 2017).

Birçok sentetik bileşik antioksidan özellik göstermekte ancak tamamının gıdalarda kullanımına izin verilmemektedir (Pratt 1996). Günümüzde BHA (Bütil Hidroksi Anisol), BHT (Butil Hidroksi Toluen), PG (Propil Gallat) ve TBHQ (Tersiyer-Bütil Hidrokinon) olmak üzere yalnızca 4 grup sentetik antioksidan gıdalarda kullanılmaktadır. Gıda ürünlerinde ve ayrıca insan vücudunda serbest radikallerin zararlı etkilerini yavaşlatabilecek yeni sentetik antioksidanların üretilmesi ve geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Hussain *et al.* 2003; Van aardt *et al.* 2004). Bu bileşiklerin gıdalarda direkt katkı maddesi olarak kullanılabilmesi gibi, ambalaj materyalinden difüzyon yoluyla dolaylı olarak kullanılabilmesi de düşünülmektedir (Islam *et al.* 2017).

BHA ve BHT çok etkili antioksidanlar olarak kabul edilmektedirler. Bu bileşikler, alkil grupların bağlı olduğu aromatik halkaya sahip fenolik antioksidanlardır. BHA, beyaz, mumsu yapıda olan katı bir maddedir. Yağda çok iyi çözünen, yağlarda ve yağ/su emülsiyonlarında yaygın olarak kullanılan monofenolik bir antioksidandır (Reische *et al.* 1998). BHA'nın kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu önlemede çok etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle Hidistan cevizi yağının yanı sıra; birçok tahıl ve şekerleme ürününde de antioksidan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Pratt 1996). Ayrıca BHA, difüzyon yoluyla antioksidan görevi yapan ambalaj malzemelerine de dahil edilebilmektedir. Antioksidan özelliklere sahip olmanın yanında bu bileşik gıda ürünlerinde antimikrobiyal aktivite ve BHT gibi diğer antioksidanlar ile sinerjistik etki göstermektedir (Giridhar and Reddy 2001). BHT, beyazdan sarıya kadar değişen renk tonlarında olan toz formunda bir maddedir. Genelde yağlar ve diğer gıda ürünlerinde oksitlenmeyi geciktirmek amacıyla kullanılmaktadır. E vitamininin sentetik bir analogu olarak davranmakta ve otoksidasyonu baskıladığı bilinmektedir. Bu bileşiğin çocuklarda kanser, astım ve davranışsal sorunlara neden olabileceği düşünülmektedir (Islam *et al.* 2017).

TBHQ fenolik özellik gösteren aromatik bir antioksidandır. Beyazdan bronza kadar değişen renkte kristallere sahip olup, yüksek derece doymamış özelliğe sahip bitkisel yağlarda kullanılmaktadır. Bu sentetik antioksidan ısıya dayanıklıdır ve kızartma yağlarının oksidasyonunu önlemede en etkili antioksidan olarak bilinmektedir (Reische *et al.* 1998). Yüksek ısı işlem esnasında yağlarda yüksek termal stabilite ve maksimum koruma sağlamak için TBHQ, monoaçilgliserol sitrat ve askorbil palmitat karışımı kullanılmaktadır (Allan and Mohamed 2002). TBHQ'nun, BHA ve BHT ile kombine edildiğinde sinerjistik etki gösterdiği ve yağlara ilave edildiğinde dumanlanma noktasını yükselttiği belirlenmiştir (Sung *et al.* 2014).

Propil gallat, oktil gallat ve dodesil gallat gallik asidin gıdalarda kullanımı onaylanmış 3 esteridir. Gallik asit ve propanolün yoğunlaşması, beyaz ve kristalin bir toz olan; suda ve yağda hafif çözünen PG'ın oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Islam *et al.* 2017). Bu antioksidan yağlarda ve yağlı gıdalarda oksidasyonu önlemek için kullanılmaktadır (Pratt 1996). BHA, BHT, TBHQ ve PG'ın kimyasal yapıları Şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Sentetik antioksidanların kimyasal yapıları (Borsato *et al.* 2014)

2.3.2. Doğal antioksidanlar

Günümüzde insanlar, sağlık konusunda oldukça bilinçlidir ve potansiyel toksisitelerinin yanı sıra sağlık açısından diğer endişe verici yönleri sebebiyle sentetik ürünlerden ziyade daha pahalı olan doğal ürünleri kullanmayı tercih etmektedirler (Naveena *et al.* 2008). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, yeni doğal bazlı antioksidanların bulunması ve tanımlanması üzerine yoğunlaşmaktadır. Meyveler ve bitki materyalleri fenolik

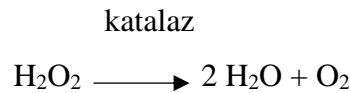
bileşiklerce zengin olduklarından doğal antioksidan kaynakları olarak görülmekte ve günümüzde kullanılmakta olan sentetik antioksidanlara birer alternatif olarak kullanılabilirler (Nunez de Gonzalez *et al.* 2008).

Doğal antioksidanlar enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadır;

2.3.2.a. Enzimatik antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar primer ve sekonder enzimatik savunma mekanizmaları olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Primer savunma mekanizması, serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ve nötralize edilmesini sağlayan 3 ana enzimden oluşmaktadır:

1. Glutasyon Peroksidaz (GPx): Hücrede oluşan hidroperoksitleri indirgeyerek ortamdaki uzaklaştıran bir enzim olan glutasyon peroksidaz, kofaktör olarak içerdiği selenyum atomundan dolayı bir selenoenzim olarak da adlandırılmaktadır (Cheeseman and Slater 1993). Selenyum, E vitamini ile birlikte lipid metabolizması ürünlerinden olan peroksitlerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı hücre membranını korumaktadır (Mungan 1996). GPx enzimi, aktivitesini en fazla eritrositler ve karaciğerde göstermektedir (Frei 1994).
2. Katalaz (CAT): Katalaz enzimi hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Bir molekül katalazın 6 milyon hidrojen peroksiti dönüştürebildiği rapor edilmektedir (Islam *et al.* 2017).



3. Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit anyonlarını bir katalaz substratı olan hidrojen perokside dönüştürmektedir (Rahman 2007). Yapısında bulunan bakır, çinko ve magnezyum iyonlarından dolayı metaloenzim olarak da adlandırılmaktadır (Cavdar *et al.* 1997).

Sekonder savunma mekanizması ise 2 enzim sisteminden oluşmaktadır;

1. Glutasyon redüktaz: Bu enzim bir antioksidan olan glutasyonun, oksitlenmiş formdan indirgenmiş forma geri dönüşümünü sağlamaktadır.
2. Glukoz-6- fosfataz: Bu enzim anabolik reaksiyonlarda kullanılan NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat koenzimi)'ı yeniden üreterek indirgeyici çevre koşullarını oluşturmaktadır (Ratnam *et al.* 2006).

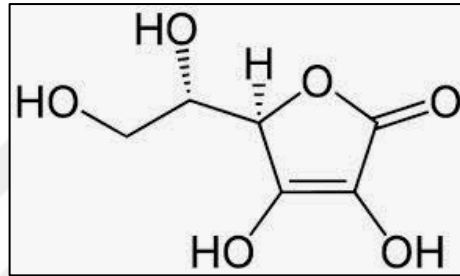
2.3.2.b. Enzimatik olmayan antioksidanlar

C vitamini: C vitamini, askorbik asidi tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Islam *et al.* (2017)'e göre, askorbik asit, antioksidan aktiviteye sahip olan ve gastrointestinal sistem tarafından emilebilen; L-Askorbik asit ve L-Dehidroaskorbik asitten oluşmaktadır. Aslında, askorbik asidin L ve D-Askorbik asit izomerleri bulunmaktadır. Bu izomerlerden, L-Askorbik asit biyolojik olarak aktif iken; D-Askorbik asit C vitamini fonksiyonlarına sahip değildir. L- Askorbik asit kolayca ve dönüşümlü olarak dehidro L-Askorbik aside okside olabilmektedir. Bu ürün aynen L-Askorbik asit gibi C vitamini aktivitesine sahiptir ancak, bir ileri aşamada diketo- L-glukonik aside geri dönüşümsüz olarak parçalanmaktadır. Herhangi bir biyolojik aktivitesi olmayan bu ürününün en son aşamada furfurala kadar parçalandığı bilinmektedir. Furfural ise enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarına katıldığından; askorbik asidin elverişsiz koşullarda özellikle de yüksek sıcaklıkta esmerleşmeye neden olabileceği ifade edilmektedir (Cemeroğlu 2009).

Askorbik asit, beyaz renkli katı formda bir maddedir. Ancak, içecekler, meyve veya sebze ürünlerinin stabilizasyonunda yaygın kullanılan tam olarak saf olmayan formu hafif sarımsı renkte görülebilmektedir (Islam *et al.* 2017).

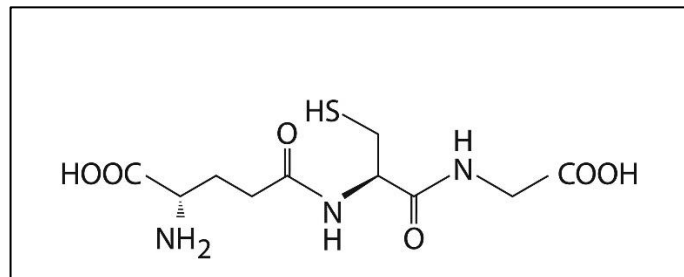
Askorbik asidin vücuttaki fonksiyonlarından en önemlisi, indirgeyici özellikte ortam oluşturması ve oksijenin metabolik ürünlerinden oluşan serbest radikalleri parçalamasıdır (Cemeroğlu 2009). Bu bileşik, birçok antioksidan ile sinerjistik etki göstererek lipid

stabilitesinde etkin rol oynamaktadır (Mäkinen *et al.* 2001). Çeşitli oksijen formlarını söndürerek, radikalleri (süperoksit radikal anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, singlet oksijen ve reaktif azot oksit gibi) indirgeyerek ve primer antioksidanların rejenarasyonunu sağlayarak çeşitli fonksiyonlara sahip bir antioksidan olarak görev yapmaktadır (Shahidi 2003; Barros *et al.* 2011). Ayrıca, askorbik asidin oluşturduğu indirgen ortam birçok enzimin aktif formda kalmasına olanak sağlamaktadır (Cemeroğlu 2009).



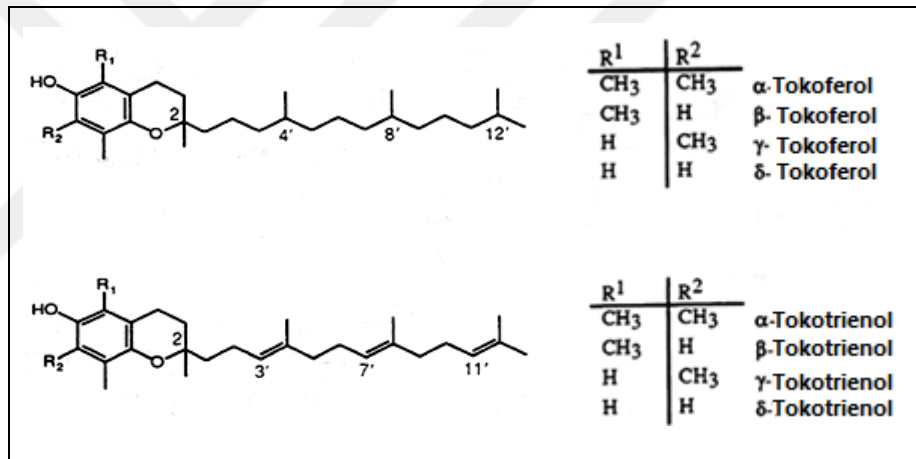
Şekil 2.7. Askorbik asidin kimyasal yapısı

Glutasyon: Glutasyon (gamma-glutamil sisteinil glisin), düşük molekül ağırlıklı bir tiyol bileşiği olup aynı zamanda doğal olarak oluşan en önemli antioksidanlardan biridir. Bu antioksidan bitki ve hayvan dokularında tripeptid formunda bulunmaktadır. Kimyasal kompozisyonu Şekil 2.8'de görülmektedir. Bu antioksidanın serbest radikaller, metal iyonları, peroksitler ve lipid peroksitlerinin neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri koruduğu bilinmektedir (Islam *et al.* 2017).



Şekil 2.8. Glutasyonun kimyasal yapısı

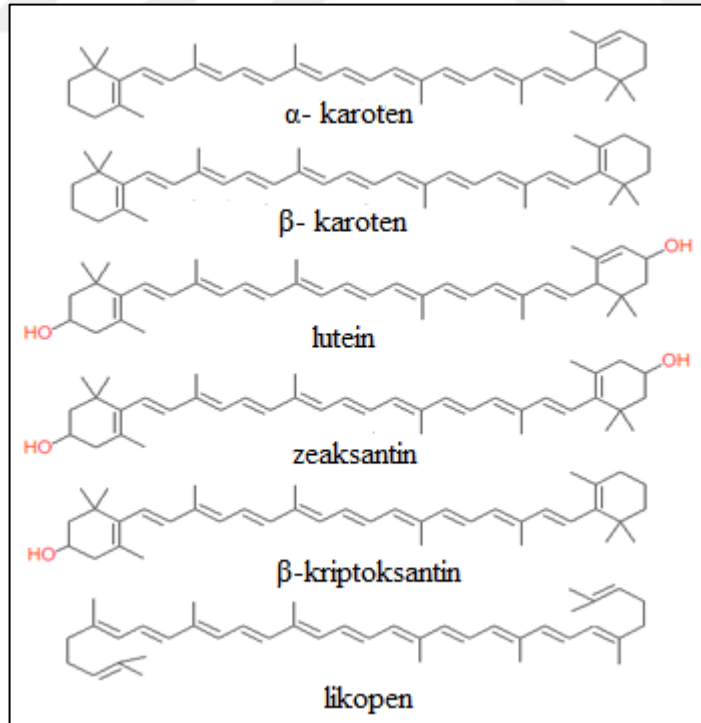
E vitamini: E vitamini terimi, genelde lipidlerde çözünen sekiz bileşiği içermektedir. Bu bileşiklerden dördüne tokotrienoller, geri kalan dördüne ise tokoferoller denmektedir. Ayrıca tokoferol ve tokotrienoller kimyasal yapılarına bağlı olarak Şekil 2.9'da görüldüğü gibi alfa, beta, gama ve delta ön adları ile tanımlanmaktadır. Tokoferollerin antioksidan aktiviteleri sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik göstermekte ancak genelde α - tokoferol < β - tokoferol < γ - tokoferol < δ - tokoferol şeklinde sıralanmaktadır (Shahidi 2000). Bir peroksil radikali süpürücüsü olan E vitamini, tokoferil radikali oluşturduktan sonra bir hidrojen vericisi tarafından indirgenerek antioksidan işlevini yerine getirmektedir (Traber and Stevens 2011). Yağda çözünme özelliğinden dolayı lipid membranlarına entegre olarak onları oksidatif hasara karşı korumaktadır (Islam *et al.* 2017).



Şekil 2.9. Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapıları (Zhang *et al.* 2014)

Karotenoidler: Karotenoidler; bakteri, yosun, mantar ve bitkiler tarafından sentezlenen ve dünya çapında 600'ün üzerinde çeşidi bulunan bileşiklerdir (Armstrong and Hearst 1996). Tek hücreli parazitler ve yaprak bitleri dışındaki hayvanlar (Tonhosolo *et al.* 2009; Moran and Jarvik 2010), karotenoidleri sentezleyememekte ve günlük karotenoid ihtiyaçlarını bitkisel kaynaklardan karşılamaktadırlar. Meyve ve sebzeler, insan beslenmesinde başlıca karotenoid kaynaklarını oluşturmaktadır (Agarwal and Rao 2000; Johnson 2002). Yapısında oksijen bulunan karotenoidler ksantofiller olarak bilinirken, oksijen içermeyenler karoten olarak adlandırılmaktadır.

Tamamen hidrokarbondan iskelete sahip karotenler; α -karoten, β - karoten ve likopen den oluşmaktadır (Aizawa and Inakuma 2007). Oksijen içeren ikinci sınıfı oluşturan ksantofiller ise; lutein, zeaksantin, fukoksantin, astaksantin gibi bileşiklerdir (Britton 1995; Perez-Rodríguez 2009). Karotenoidlerin yararlı etkilerinin temel sebebi aslında sahip oldukları antioksidan aktiviteleridir. Bu grup, singlet oksijen veya diğer serbest radikalleri söndürerek gıdaları oksidasyondan koruyan ikincil antioksidanlar olarak işlev görmektedirler (Reische *et al.* 1998). Ayrıca; hücre büyümesinin düzenlenmesi, gen ekspresyonunun ayarlanması ve immün yanıt gibi bazı özellikleri de rapor edilmektedir (Astrog 1997; Paiva and Russell 1999; Jewell and O'Brien 1999). β - karoten, lutein, astaksantin, likopen ve izozeaksantin gıdaların oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilmesinde etkili antioksidanlar olarak bilinmektedirler (Mikova 2001). Karotenoidler diğer antioksidanlarla özellikle de tokoferollerle kombine edildiğinde sinerjist etki göstermektedir. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları Şekil 2.10'da görülmektedir.



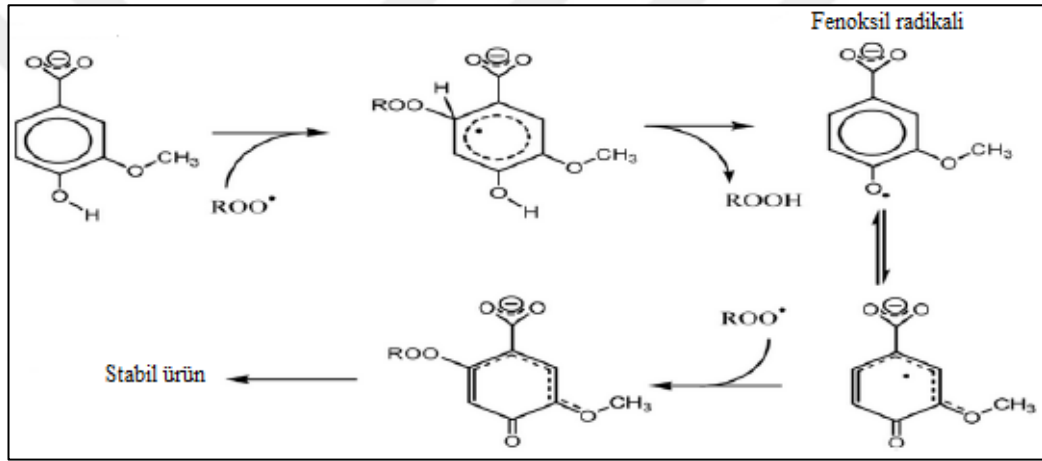
Şekil 2.10. Bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları (Volk 2004)

2.4. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubuna ilaveten bir veya daha fazla aromatik hidrokarbon halkası içeren, en az 10,000 farklı bileşikten oluşan büyük bir gruptur (González-Vallinas *et al.* 2013; Li *et al.* 2014). Genel olarak flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere iki geniş alt gruba ayrılmaktadırlar (Araújo *et al.* 2011). Bu bileşikler bitkilerin; reaktif oksijen türleri, UV, patojenler, parazitler ve bitki yiyiciler gibi farklı stres türlerine karşı savunma amacıyla ürettikleri bileşikler olup (Asensi *et al.* 2011); bitki, gıda ve kozmetik ürünlerin organoleptik özelliklerine de büyük ölçüde katkıda bulunmaktadırlar (Dai and Mumper 2010).

Antik uygarlıklar tarafından yüzyıllar boyunca sağlık için sayısız biyolojik etkileri kullanılan (Konczak and Zhang 2004) fenolik bileşiklerin, özellikleri ve etki mekanizmalarına ilişkin bilgiler yakın zamana kadar oldukça sınırlı kalmıştır (Dai and Mumper 2010). Yakın zamana kadar, besleyici özelliği olmayan gereksiz bileşikler olarak değerlendirilen fenolik bileşiklerin; antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal aktiviteleri ile kardiyovasküler hastalıklar ile nörodejeneratif hastalıklardan kansere kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili olduklarına dair birçok kanıt elde edilmiştir (Mojzer *et al.* 2016). Fenolik bileşiklerin çeşitli hastalıklar üzerine etkisi esas olarak antioksidatif özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Wu *et al.* 2016). Polifenoller, hidrojen iyonu veya elektron verme yetenekleri ile serbest radikalleri nötralize etmeleri ve yağ asitleri gibi bileşiklerin oksidasyonunu önledikleri için birer antioksidan gibi davranmaktadırlar. Aynı zamanda fenolik bileşikler, Fe^{2+} and Cu^{+} gibi geçiş metallerini çelatlayarak ortamın redoks potansiyelini de değiştirmektedirler (Balasundram *et al.* 2006). Polifenollerin sahip oldukları antioksidan aktiviteleri sayesinde, sadece çeşitli hastalıkları önlemekle kalmayıp, aynı zamanda hastalıkların ilerlemesini baskıladığı, hatta iyileşme sürecine de katkıda bulunduğu rapor edilmektedir (Ramos 2008; González-Vallinas *et al.* 2013). Buna ek olarak, bazı polifenollerin hormonal etki gösterebildiği ve kemik erimesini inhibe ettiği de ifade edilmektedir (Hendric 2006).

Fenolik bileşikler, fenolik hidroksil grupları tarafından bir serbest radikale (R) bir hidrojen atomu verebilmektedir. Böylece serbest radikalın eşlenmemiş elektronu fenolik bileşiklerin konjuge aromatik sistemleri ile delokalize edilebilir (Şekil 2.11). Şekilde gösterildiği gibi, fenolik bileşikler (POH) tarafından serbest radikal'e hidrojen atomu verilmesi sonucu fenoksil radikal ara ürünleri (PO.) oluşmaktadır. Bu ara ürünlerin yüksek stabiliteleri sayesinde serbest radikal zincir reaksiyonu baskılanabilmektedir. Scalbert *et al.* (2005) ve Dai Dai and Mumper (2010)'a göre, fenoksil radikal ara ürünleri diğer oluşan serbest radikallerle reaksiyona girerek yayılımı durdurmaktadırlar.



Şekil 2.11. Serbest radikalın fenolik bileşikler tarafından delokalizasyonu (Altay *et al.* 2015)

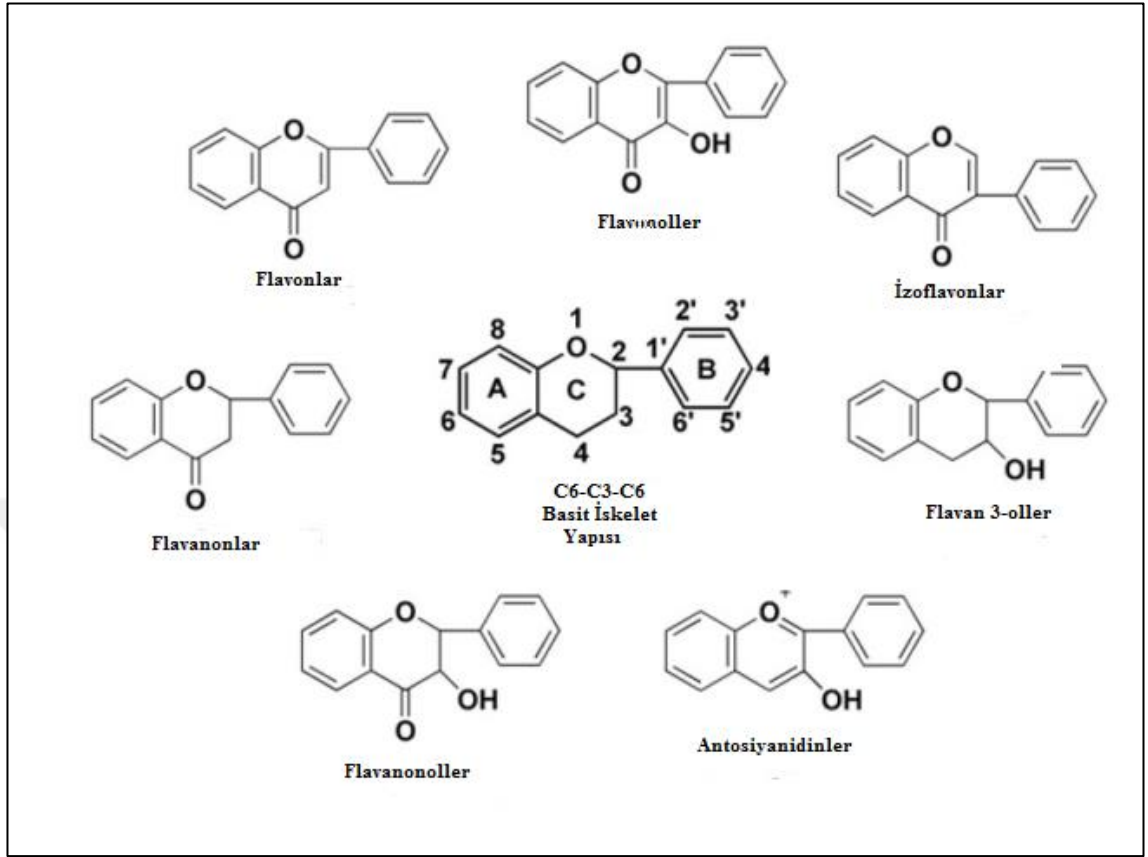
Fenolik bileşikler, sekonder bitki metabolitleri olarak meyve ve sebzelerin çoğunda bol miktarda bulunmaktadır (González-Vallinas *et al.* 2013). Sergiledikleri biyolojik aktiviteleri sayesinde; doğal renklendiriciler ve aroma maddeleri, gıda koruyucu maddeler, beslenme takviyeleri ve hatta mürekkep, kağıt, kozmetik ve ilaç formülasyonları gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadırlar (Jackman *et al.* 2010).

2.4.1. Flavonoidler

Sayılarının 4000'in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler, sekonder bitki metabolitlerinin en büyük ve önemli bir sınıfını oluşturmaktadır (Panche *et al.* 2016).

Flavonoidler, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşiminden oluşan C6-C3-C6 iskeletine sahip polifenollerdir. Temel iskelet yapısı Şekil 2.11’de görülen flavanoidler; B halkasının bağlı olduğu C halkasının hangi karbonuna bağlandığına ve C halkasının doymamışlık ve oksidasyon derecesine bağlı olarak farklı alt gruplara ayrılmaktadır (Şekil 2.12). B halkası C halkasının 3. pozisyonuna bağlı ise isoflavon; 4. pozisyona bağlı ise neoflavonoid olarak isimlendirilmektedir. Eğer, B halkası 2. pozisyona bağlı ise C halkasının yapısal özelliklerine göre flavonlar, flavonoller, flavanonlar, kateşinler, antosiyaninler veya kalkonlar olarak ifade edilmektedirler (Panche *et al.* 2016).

Flavonoidler, kanser, Alzheimer hastalığı ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlı olan çeşitli biyokimyasal ve antioksidan etkilere sahiptir (Burak and Imen 1999; Ovando *et al.* 2009; Lee *et al.* 2009). Flavonoidler, sağlık üzerindeki etkileri sebebiyle çeşitli nutrasötik, farmasötik, medikal ve kozmetik uygulamaları için vazgeçilmez bileşenler haline gelmişlerdir. Flavonoidlerin sağlık üzerine bu kadar etkin olmalarının nedeni, sahip oldukları önemli hücresel enzim fonksiyonlarını ayarlama kapasiteleri ile antioksidan, anti-inflamatuar, antimutajenik ve antikanserojenik özelliklerinin birleşmesidir (Panche *et al.* 2016). Flavonoidler ayrıca, ksantanoksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz ve fosfoinositid 3- kinaz gibi birçok enzim için güçlü inhibitörler olarak bilinmektedirler (Metodiewa *et al.* 1997; Hayashi *et al.* 1988; Walker *et al.* 2000).



Şekil 2.12. Flavanoidlerin kimyasal yapıları

2.4.1.a. Flavonlar

Flavonlar flavonoidlerin önemli alt gruplarından biridir. Flavonlar; yaprak, çiçek ve meyvelerde glukozit formunda bulunmaktadır. Kereviz, maydanoz, kırmızıbiber, papatya, nane ve ginkgo biloba flavonların başlıca kaynakları arasındadır. Luteolin, apigenin ve tangeretin flavonoidlerin flavonlar alt sınıfı içerisinde yer almaktadır. Narenciye kabukları polimetoksillenmiş flavonlardan tangeretin, nobiletin ve sinensetin zengin bir kaynaktır (Manach *et al.* 2004). C halkasında 2 ve 3. konumlar arasında bir çift bağ ve 4. konumda bir keton grubu bulunmaktadır (Panche *et al.* 2016).

2.4.1.b. Flavonoller

Flavonoller, keton grubuna sahip flavonoidlerdir. Proantosiyanınların yapı taşlarıdır. Üzerinde en fazla çalışılmış flavonoller kaempferol, kuersetin, myrisetin ve fisetindir. Birçok meyve ve sebze bol miktarda bulunmakta olup; soğan, lahana, marul, domates, elma, üzüm, çilek ve çay zengin kaynaklarıdır. Flavonollerin antioksidan potansiyelleri nedeniyle vasküler hastalık riskini düşürdükleri rapor edilmektedir. Flavonlardan farklı olarak, C halkasının 3. pozisyonunda hidroksil grubu bulundurmaktadırlar. Bu hidroksil grubu antosiyanidinler gibi şekerlerle glikozit bağıyla bağlanmış olabilmektedir. Genelde glukoz, galaktoz, rutinoz gibi şekerler daha seyrek olarak da ramnoz, arabinoz, ksiloz ve glukonik asit, glikozidik bağla bağlanmış unsurlardır (Cemeroğlu 2009). Bu grupta bulunan aglikonlardan en yaygını kuersetindir (Iwashina 2013). Flavanol glikozitler, hafif sarı renkte olup, hemen hemen her bitkide bulunmaktadırlar.

2.4.1.c. Flavanonlar

Flavanonlar, genellikle narenciye meyvelerinde bulunan önemli bir flavonoid alt sınıfıdır. Hesperidin, naringenin ve eriodiktiol bu grupta bulunmaktadır. Flavanonlar, serbest radikal giderici aktivitelerinden dolayı sağlık üzerine bir takım faydalarla ilişkilendirilmektedirler. Bu bileşikler narenciye kabuğunda daha yoğun bulunmakta ve eğer kabuk soyulmadan meyve suyu üretilmişse meyve suyunun acı tadından sorumludurlar. Turunçgil flavonoidleri antioksidan, antiinflamatuvar, kan lipid düşürücü ve kolesterol bağlayıcı olmak üzere farklı aktiviteler sergilemektedir. Dihidroflavanonlar olarak da adlandırılan flavanonların C halkası doymuştur. Bu nedenle flavonların aksine 2 ve 3. pozisyonlar arasındaki çift bağ doymuştur. Bu durum bu iki alt grup flavonoid arasındaki tek yapısal farklılıktır. Son 15 yılda tespit edilen flavanon sayıları önemli ölçüde artmıştır (Iwashina 2013).

2.4.1.d. İzoflavonoidler

İzoflavonoidler, flavonoidlerin en geniş ve en farklı grubunu oluşturmaktadır. Bu grup bitkiler âleminde sınırlı bir dağılıma sahip olup, soya fasulyesi ve diğer bakliyalarda tespit edilebilmiştir. Bazı izoflavonoidlerin mikroplarda da bulunduğu (Matthies *et al.* 2008) ve bitki mikropları aralarındaki etkileşimler sırasında fitoaleksinlerin gelişimi için prokürsör olarak önemli rol oynadıkları belirlenmiştir (Aoki *et al.* 2000; Dixon and Ferreira 2002). Genistein ve daidzein gibi izoflavonlar, bazı hayvan modellerinde göstermiş oldukları östrojenik aktiviteleri nedeniyle yaygın olarak fitoöstrojen olarak kabul edilmektedirler. Szkudelska ve Nogowski (2007), genisteinin hormonal ve metabolik değişikliklere neden olan etkisini araştırmış ve bu etki sayesinde çeşitli hastalıkların metabolik yollarını değiştirebildiğini belirtmiştir (Panche *et al.* 2016).

2.4.1.e. Neoflavonoidler

Neoflavonoidler bir polifenolik bileşik sınıfıdır. Flavonoidler 2. karbon pozisyonunda 2-phenylchromen-4-one omurgasına sahip iken; neoflavonoidler yalnızca 4-fenilkromen omurgasına sahiptir ve hidroksil grubu içermemektedirler. Belirlenen ilk neoflavonoid 1951 yılında *Calophyllum inophyllum* tohumlarından izole edilen kalofilolittir. Bu bileşik aynı zamanda bir Sri Lanka endemik bitkisi olan *Mesua thwaitesii*'nin kabuk ve odun kısmında da bulunmaktadır (Linuma *et al.* 1987; Nishimra *et al.* 2000; Garazd *et al.* 2003).

2.4.1.f. Flavon-3-ol'ler (Kateşinler)

Bu grup bitkiler âleminde en yaygın bulunan flavonoidler olup, flavanonoller, dihidroflavonoller veya kateşinler olarak da adlandırılmaktadırlar. C halkasında 3 nolu karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu içermektedirler. Kateşinler, oldukça çeşitlenmiş çoklu alt gruplara sahiptir. Birçok flavonoidden farklı olarak 2. ve 3. pozisyonlardaki karbon atomları arasında çift bağ içermemektedirler (Panche *et al.* 2016). En yaygın

kateşinler; (+)- kateşin, (-)-epikateşin, (+) gallokateşin ve (-)- epigallokateşinlerdir (Cemeroğlu 2009).

2.4.1.g. Antosiyaninler

Antosiyaninler meyve, sebze ve çiçeklere kendine özgü, pembe, kırmızı, viyole, mavi veya mor rengi veren suda çözünür özellikteki flavonoid bileşikleridir. Antosiyaninler, yapısının temeli 2-fenilbenzopirilium (flavilium katyonu)'dan oluşan antosiyanidinlerden türemektedirler. Antosiyaninler hidrolize uğrayıp glikozit bağı ile bağlanmış kısımları ayrıldığında geriye kalan aglikon kısmı antosiyanidindir. Yani, antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleridir (Cemeroğlu 2009).

Şimdiye kadar tespit edilmiş olan 20'ye yakın antosiyanin çeşidinden; Siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin ve peonidin en çok çalışılan antosiyaninlerdir (Sri Harsha *et al.* 2013; Nasirizadeh *et al.* 2016; Mackert and McIntosh 2016; Baba *et al.* 2017; Amini *et al.* 2018; Mazewski *et al.* 2018). Antosiyaninler arası fark, 3., 5., 6., 7., 3' ve 5' pozisyonlardaki grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Cemeroğlu 2009).

Ağırlıklı olarak kızılılık, frenk üzümü, kırmızı üzüm, çilek, ahududu, böğürtlen ve yaban mersini gibi çeşitli meyvelerin dış hücre katmanlarında bulunmaktadırlar. Bu bileşiklerin sağlık üzerine olan faydalarının yanı sıra kararlı yapıları, gıda endüstrisinde çeşitli uygulamalarda kullanımlarını kolaylaştırmaktadır (Giusti and Wrolstad 2003). Antosiyaninlerin rengi kimyasal yapılarının yanı sıra; ortamın pH derecesi, konsantrasyon, ortamda kopigment olup olmaması gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Iwashina 2013).

2.4.1.h. Kalkonlar

Kalkonlar flavonoidlerin bir alt sınıfıdır. Bu grup Şekil 2.12'de gösterilen temel flavonoid iskeletinin yapısında C halkasının bulunmayışıyla karakterize edilmektedir. Bu nedenle

açık zincirli flavonoidler olarak da adlandırılmaktadırlar. Başlıca kalkan örnekleri arasında floridzin, arbutin, floretin ve kalkonaringin bulunmaktadır. Kalkanlar domates, armut, çilek ve bazı buğday ürünlerinde önemli miktarda bulunmaktadır. Çizelge 2.1 açıklanan tüm flavonoidlerin gıdalarda buldukları kaynakları belirtmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı flavonoidler, sınıfları ve buldukları gıda kaynakları (Pancha *et al.* 2016)

| Flavonoid | Sınıf | Gıda kaynağı | Referanslar |
|----------------|---------------|---|--|
| Kuersetin | Flavonoller | Sebzeler, meyveler ve içecekler, baharatlar, çorbalar, meyve suları | Hertog <i>et al.</i> (1993); Justesen and Knuthsen (2001); Stewart <i>et al.</i> (2000); Zheng and Wang (2001) |
| Rutin | Flavonol | Yeşil çay, üzüm çekirdeği, acı biber, elma, narenciye, çilek, şeftali | Atanassova and Bagdassarian (2009); Gudrais (2012); Chang <i>et al.</i> (2000); Malagutti <i>et al.</i> (2006) |
| Makluraksanton | Ksantan | Maclura tinctoria, Dyer dutu | Khan <i>et al.</i> (2009) |
| Genistein | İzoflavon | Yağlar, sığır eti, kırmızı yonca, soya fasulyesi, psoralea, acı bakla, fava fasulyesi, japon sarmaşığı | Thompson <i>et al.</i> (2006); Umpress <i>et al.</i> (2005); Krenn <i>et al.</i> (2002); Coward <i>et al.</i> (1993); Kaufman <i>et al.</i> (1997) |
| Skopoletin | Kumarin | Sirke, karahindiba kahvesi | Gálvez <i>et al.</i> (1994) |
| Daidzein | İzoflavon | Soya fasulyesi, tofu | Zhang <i>et al.</i> (1999) |
| Taksifolin | Flavanonol | Sirke | Cerezoa <i>et al.</i> (2010) |
| Naringenin | Flavanon | Üzüm | Felgines <i>et al.</i> (2000) |
| Abissinons | Flavanon | Fransız fasulyesi tohumu | Rathmell and Bendall (1971) |
| Rutin | Flavanol | Narenciye, elma, çilek, şeftali | Chang <i>et al.</i> (2000) |
| Eriodiktiyol | Flavanon | Limon, kuşburnu | Hvattum (2002) |
| Fisetin | Flavanol | Çilek, elma, soğan, salatalık, Trabzon hurması | Sahu <i>et al.</i> (2014) |
| Teaflavin | Flavon 3-ol | Çay yaprağı, siyah çay, oolong çay | Leung <i>et al.</i> (2001) |
| Peonidin | Antosiyanidin | Kızılçık, yaban mersini, erik, üzüm, kiraz, tatlı patates | Truong <i>et al.</i> (2010) |
| Diosmetin | Flavon | Burçak | Andreeva <i>et al.</i> (1998) |
| Trisin | Flavon | Pirinç kepeği | Cai <i>et al.</i> (2005) |
| Biokenin | İzoflavon | Kırmızı yonca, soya, yonca filizi, yer fıstığı, nohut (Cicer arietinum), diğer baklagiller | Medjakovic and Jungbauer (2008) |
| Hesperidin | Flavanon | Acı portakal, tahıl, portakal, portakal suyu, limon, misket limonu | National Agricultural Library (2014); Khan <i>et al.</i> (2009) |
| Epikateşin | Flavon 3-ol | Yağı azaltılmış süt ve çikolata | Arts <i>et al.</i> (2000) |
| Mirisetin | Flavonol | Sebze, meyve, fındık, çilek, çay, kırmızı şarap | Ross and Kasum (2002); Basli <i>et al.</i> (2012) |
| Taksifolin | Flavanonol | Narenciyeler | Grayer and Veitch (2006); Kawaii <i>et al.</i> (1999) |
| Kaempferol | Flavonol | Elma, üzüm, domates, yeşil çay, patates, soğan, brokoli, Brüksel lahanası, kabak, salatalık, marul, yeşil fasulye, şeftali, böğürtlen, ahududu, ıspanak | Calderon-Montaño <i>et al.</i> (2011); Liu(2013); Kim and Choi (2013) |
| Luteolin | Flavon | Kereviz, brokoli, yeşilbiber, maydanoz, kekik, karahindiba, perilla, papatya çayı, havuç, zeytinyağı, nane, biberiye | Kayoko <i>et al.</i> (1998); López-Lázaro (2009) |
| Apigenin | Flavon | Yağı azaltılmış süt ve çikolata | Hertog <i>et al.</i> (1993) |

2.4.2. Fenolik asitler

Fenolik bileşiklerin üçte birini temsil eden fenolik asitler (Yang *et al.* 2001), büyük kısmı hidroksisinnamik asitlerden oluşmak üzere, hidroksibenzoik asitleri de içeren önemli bir polifenol sınıfıdır (Cadenas and Packer 2002). Fenil propanoidler olarak da adlandırılan bu grup, genelde serbest halde bulunmayıp; glikozit ya da organik asit esterleri şeklinde proteinlere veya hücre duvarı polimerlerine bağlı halde bulunmaktadır (Maier *et al.* 1990; Yang *et al.* 2001).

Fenolik asitler baklagil bitkilerinde; ıspanak, brokoli ve lahana gibi sebzelerde; çileksi meyvelerde; elmalarda; kahve, çay, narenciye suları ve şarap gibi bazı içeceklerde; tahıl kepeğinde ve zeytinyağında bulunmaktadır (Manach *et al.* 2005; Scalbert *et al.* 2005; Kampa *et al.* 2007; Weichselbaum and Buttriss 2010). En yaygın fenolik asitlerden biri kafeik asittir. Kafeik asit, birçok meyve ve sebze de bulunmakta ve kahvenin başlıca fenolik asidi olan klorojenik asitte olduğu gibi; çoğunlukla kuinik asit ile esterleşmektedir (Scalbert *et al.* 2005). Diğer yaygın fenolik asit ise, tahıllarda bulunan ve hücre duvarı hemiselülozları ile esterleşen ferulik asittir (Mojzer *et al.* 2016).

Fenolik asitler, birer çelatlayıcı olarak; hidroksil ve peroksil radikalleri, süperoksit anyonu ve peroksinitritler üzerinde etkili olan önemli serbest radikal süpürücülerdir (Lall *et al.* 2015). Antioksidan aktiviteleri, içerdikleri aromatik halkaların hidroksil grubu sayısına, bu grupların bağlanma yerlerine ve pozisyonlarına göre değişiklik göstermektedir (Sroka and Cisowski 2003).

Zeytinyağında bulunan; kafeik, sinapik, şirinjik, protokateşik, ferulik ve 3,4-dihidroksifenil asetik asitin meme ve prostat kanseri hücre çoğalmasını zamana ve doza bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Kampa *et al.* 2007). Diyetle kullanılan %0,02 ile %0,05 arası kafeik asit, elajik asit, klorojenik asit ve ferulik asitin sıçanlarda kanser oluşumunu engellediği tespit edilmiştir (Yang *et al.* 2001). Diğer taraftan, gallik asit, tannik asit ve kafeik asitin DNA'da in vitro oksidatif iplikçik kırılmalarına neden olabildiği de rapor edilmektedir (Dai and Mumper 2010). Marinova and Yanishlieva

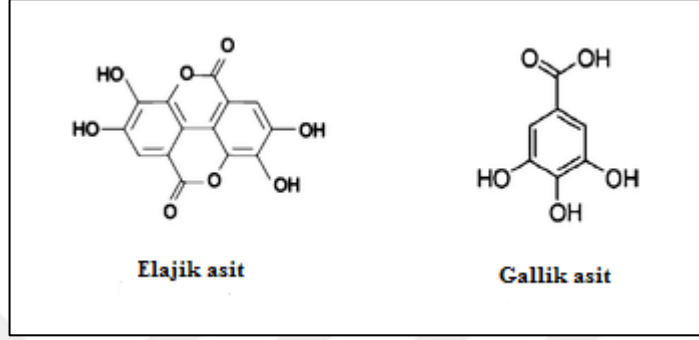
(2003), yaptıkları çalışmalarda hidroksibenzoik asit türevlerine kıyasla hidroksisinnamik asit türevlerinin daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Peyrat-Maillard *et al.* (2000) ve Fukumoto and Mazza (2000), hidroksil grubu sayısındaki artışın antioksidan aktiviteyi yükselttiğini belirtmektedir.

2.4.2.a. Hidroksibenzoik asitler

Hidroksibenzoik asitler, C6-C1 fenilpropan yapısında, güçlü antioksidatif ve antikanserojenik aktiviteye sahip bileşiklerdir (Cemeroğlu *et al.* 2001). Bu grup asitler, lignin ve hidrolize edilebilir tanen gibi karmaşık yapılara ait bileşenlerdir (Mojzer *et al.* 2016). Ayrıca, organik asit ya da şeker türevleri olarak da bulunabilmektedirler. Yiyeceklerdeki sınırlı dağılımları, hidroksibenzoik asitlerin emilim ve metabolizmaları hakkında fazla bilgiye sahip olunamamasına neden olmaktadır (Manach *et al.* 2005). Hidroksibenzoik asitlerin en önemli temsilcileri fasulye ve fıstıkta bol miktarda bulunan gallik ve elajik asitlerdir (Şekil 2.13) (Stoner and Mukhtar 1993; Lall *et al.* 2015).

Gallik asit ağırlıklı olarak çilek, ananas, muz, limon, ceviz, çay, meşe ve elma kabuklarında bulunmaktadır (Santos *et al.* 2013; Verma *et al.* 2013; Lall *et al.* 2015). Biyolojik etkisini çeşitli biyokimyasal yolları etkileyerek ortaya koyan (Verma *et al.* 2013) bu biyoaktif molekülün güçlü antioksidatif, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antimelanojenik, antimitojenik ve antikanserojenik aktivitelere sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir (Verma *et al.* 2013; Santos *et al.* 2013; Lall *et al.* 2015). Gallik asit, prostat kanseri araştırmalarında üzerinde en çok çalışılan ve gelecek vaadeden bileşiklerden birisidir (Lall *et al.* 2015). Kanser hücre dizilerinde apoptosise neden olan prooksidatif özellik gösterdiği belirlenmiştir (Verma *et al.*, 2013). Kateşinlerde de söz konusu olan bu durum aynı zamanda organizmalarda oksidatif hasara neden olabilmektedir (Mojzer *et al.* 2016). Verma *et al.* (2013), Santos *et al.* (2013) ve Lall *et al.* (2015) gallik asitin farklı moleküler seviyelerde çeşitli tümörler üzerinde tedavi edici özellikte olduğunu ifade etmektedir. Gallik asidin de dâhil olduğu çoğu polifenolik bileşiğin ortak özelliği, kanserli hücrelere karşı seçici bir sitotoksosite gösterirken; normal hücrelere karşı çok düşük düzeyde veya hiç toksisite oluşturmamalarıdır (Verma *et al.*

2013). Suda bile çözünebilmesi gallik asitin kullanım alanlarını oldukça genişletmekte ve günümüzde gelişen ilaç sektöründeki kullanımının yanı sıra kanser riskini düşürmek için gıda takviyesi olarak da kullanılmaktadır (Verma *et al.* 2013).

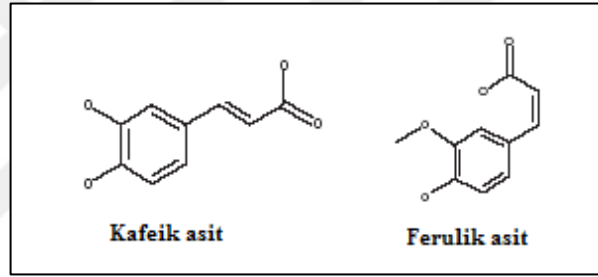


Şekil 2.13. Elajik asit ve gallik asitin kimyasal yapıları

Birçok çiçekli bitki familyasının bir parçası olan ellajik asit, doğal olarak oluşan önemli bir hidroksibenzoik asittir (Stoner and Mukhtar 1993). Bitkilerde, esas olarak glikozid formunda bulunmakla birlikte ellajitanenler olarak adlandırılan hidrolize olabilen tanenlerin bir parçası olarak da görülebilirler (Stoner and Mukhtar 1993; Santos *et al.* 2013). Gallik asidin bir dimerik türevi olan ellajik asidin en zengin kaynakları arasında; böğürtlen, çilek, kızılılık, nar ve ceviz bulunmaktadır (Lall *et al.* 2015). Ellajik asit, antikanserojenik, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiateroskleroz, antihiperglisemik, antihipertansif, antifibroz ve kardiyoprotektif etkilere sahiptir (Santos *et al.* 2013; Lall *et al.* 2015). Ayrıca, apoptozu indüklediği, kanser hücrelerinin çoğalmasımı azalttığı ve bu hücrelerin yayılma ve hareketliliğini engellediği de rapor edilmektedir (Santos *et al.* 2013; Tabrez *et al.* 2013; Lall *et al.* 2015). Gallik asit gibi, ellajik asit de sağlıklı hücrelere göre tümör hücrelerine karşı daha reaktiftir (Santos *et al.* 2013). Çok kararlı bir bileşik olan ellajik asit, dimetilsülfoksitte orta düzeyde, diğer organik çözücülerde az, suda ise hiç çözünmemektedir (Stoner and Mukhtar 1993).

2.4.2.b. Hidroksisinnamik asitler

Hidroksisinnamik asitler C6-C3 fenilpropan yapısında bileşiklerdir. Fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellikler göstermektedirler. Hidroksisinnamik asitler; genelde hücre duvarı polimerlerine bağlı, asitlerle esterler veya şekerlerle glikozitler oluşturarak hücrede bağlı halde bulunmaktadırlar (Artık *et al.* 2016). Sinnamik asit, hemen hemen her bitkide türevleri bulunan, hidroksisinnamik asitlerin öncüsü olan fenolik bileşen grubudur (Yang *et al.* 2001; Lall *et al.* 2015). En sık karşılaşılan hidroksisinnamik asitler kafeik asit ve ferulik asittir (Yang *et al.* 2001) (Şekil 2.14).



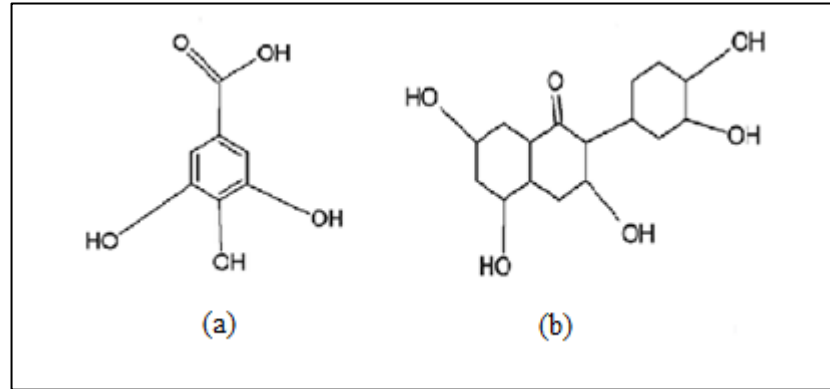
Şekil 2.14. Kafeik asit ve ferulik asitin kimyasal yapıları

Kafeik asit, elma, erik, domates ve üzüm gibi birçok meyvede bulunmaktadır (Yang *et al.* 2001). Kafeik asidin klorojenik aside esterifikasyonu, Emilimini belirgin şekilde azaltmaktadır (Manach *et al.* 2005). o-kuinik asitin kafeik asit esteri olan klorojenik asit, meyvelerde yaygın ve baskın halde bulunan önemli bir fenolik asittir ve kahve tüketenlerde günlük alım miktarı 800 mg'a kadar yükselebilmektedir. Kahvenin içerdiği fenolik bileşiklerin ağırlıklı kısmını klorojenik asit oluşturmaktadır. Ayrıca kurutulmuş fasulyede de %7 oranında bulunduğu rapor edilmektedir (Yang *et al.* 2001). Klorojenik asit, kahve çekirdeklerinin yanı sıra birçok meyve ve sebze de bulunmakta ve elma ile armutta kahverengileşmeye neden olan enzimatik oksidasyon için önemli bir substrat olarak rol almaktadır (Yang *et al.* 2001).

Ferulik asit, tahılların hücre duvarlarında bulunan esterleşmiş formunun tersine; domates ve birada serbest ve absorbe edilebilecek halde bulunmaktadır (Yang *et al.* 2001; Manach *et al.* 2005). Ferulik asidin dimerik bir türevi olan kurkumin de hidroksisinnamik asitler grubu içerisinde sınıflandırılabilir (Yang *et al.* 2001). Lokal olarak uygulanan kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve kurkuminin tümör gelişiminde inhibitör etki gösterdiği ve doza bağlı olarak tümör çeşitliliğini azalttığı belirlenmiştir (Yang *et al.* 2001). Kafeik asit, antitümör ve antimetastatik özelliklere sahip bir kanser inhibitörü olmasının yanı sıra; in vitro antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri sayesinde ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde destekleyici olarak da belirtilmektedir (Yang *et al.* 2001; Lall *et al.* 2015). Ayrıca kafeik asitin, prostat kanseri hücrelerinde, androjen reseptör sinyalizasyonu ve hücre çoğalmasını inhibe ettiği rapor edilmektedir (Lall *et al.* 2015). Bu kuvvetli kanıtlar, kafeik asitin özellikle prostat kanserinde daha fazla araştırılıp geliştirilebilecek çoklu koruyucu etkilerini ortaya koymaktadır (Lall *et al.* 2015).

2.4.3. Tanenler

Azot içermeyen, buruk bir lezzete sahip polifenolik bileşiklerdir. Bu grup; su, etanol ve asetonda çözünürken; eter ve kloroformda az çözünmektedir. Şekil 2.15’de görüldüğü gibi, tanenler kimyasal yapılarına göre hidrolize olabilen tanenler ve kondense tanenler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadırlar (Artık *et al.* 2016). Hidrolize olabilen tanenler orta merkezinde bir polyol (genelde D-glukoz) bulunduran moleküllerdir. Bu gruptaki tanenler, gallik asit ve/ veya ellajik asite dönüşebilen heksahidroksidifenik asit ve türevlerinden oluşan poliestерler olarak da tanımlanmaktadır (Shahidi and Nacz 1995). Hidrolize olabilen tanenler üzüksü meyveler, fındık, fıstık gibi kabuklu yemişlerde bulunmaktadır (Artık *et al.* 2016). Kondense tanenler doğada genellikle flavan-3-ol’ler olarak bulunmaktadır. Bu bileşen grubu önceki bölümlerde ele alınmıştır.



Şekil 2.15. Tanenlerin kimyasal yapıları
(a; hidrolize olabilen tanenler, b; kondanse tanenler)

2.4.4. Stilbenler

Stilbenler, çam (*Pinaceae*), ökalıptus (*Myrtaceae*) ve maktura (*Moraceae*) cinsi ağaçların özlerinin başlıca bileşenleri olup, genelde aglikon veya glikozit formunda bulunabilmektedirler. Stilbenlerin en çok dikkat çeken üyesi resveratroidür (3,4',5-trihidroksistilben). Resveratrol, kırmızı üzüm kabukları ve dolayısıyla da kırmızı şarapta bulunmaktadır (Sawalha 2009). Resveratrol, 'Fransız Paradoksu' teriminin olası açıklaması olabilmesi nedeni ile bilimsel araştırmaların üzerine yoğunlaştığı fenolik yapıda olan bir bileşiktir. Bu terim, yüksek yağ içerikli diyet uygulanmasına rağmen, kalp hastalığı insidansının düşük olması durumunda kullanılmaktadır (Artık *et al.* 2016). Yapılan bazı hayvan çalışmalarında, reveratrolün kanser gelişimini inhibe etme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Jang *et al.* 1997; Howitz *et al.* 2003).

2.4.5. Lignanlar

Polifenolik bileşikler olan lignanlar, iki fenil propanoid kombinasyonundan oluşmaktadırlar. Biyoooligomerlerin yapısal alt birimleri şeklinde, şeker rezidülerine bağlı glikozitler veya esterler şeklinde bulunabilmektedirler (Silvina-Latito and Frei 2006). Keten tohumu, içerdiği matairesinol ve secoisolariciresinol glikozitleri sebebiyle lignanların bilinen en zengin kaynağıdır (Artık *et al.* 2016). Susam, bazı hububat ürünleri, mercimek, soya fasulyesi, havuç, ananas ve sarımsağın da lignan içerdiği rapor

edilmektedir (Coran *et al.* 1996; Milder *et al.* 2005). Lignanların antioksidan ve antiöstrojenik aktiviteleri sayesinde, bazı hormonlar ile ilişkili kanserler ile kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini azalttıkları ifade edilmektedir (Artık *et al.* 2016).

2.5. Antimikrobiyal Aktivite Analizinde Test Edilen Mikroorganizmalar

Enterobacteriaceae familyasından olan *Escherichia coli*, memeli ve kuşların bağırsak florasında bulunan, hareketli, çubuk şeklinde, sporsuz ve optimum üreme sıcaklığı 37 °C olan fakültatif anaerop bir bakteridir. İnsan normal bağırsak florasında da bulunan bu mikroorganizma normal şartlarda kokuşma (putrifikasyon)/ mayalanma (fermantasyon) dengesinin düzenlenmesi ve başta K vitamini olmak üzere birçok vitaminin üretilmesine katkıda bulunmaktadır. Bağırsak florasında diğer flora bakterileri ile denge halinde bulunuyorsa herhangi bir hastalık oluşturmamaktadır. Ancak, *E.coli*'nin bağırsak florası dışına çıkıp farklı organlara geçmesi durumunda üriner enfeksiyon, septisemi, neonatal sepsis, menenjit ve diyare gibi önemli enfeksiyonlar oluşabilmektedir (Keskin 2010). Ampisilin, tetrasiklinler, kloramfenikol, sefalosporinler ve amigoglikozitler *E.coli*'ye karşı değişik şekillerde etki gösteren antimikrobiyal ajanlardır (Çelen 2011).

Önemli bir fekal bulaşma indikatörü olan *E.coli*, son zamanlarda gıda güvenliğinde en ciddi tehditlerden biri haline gelmiş olup; USDA (United States Department of Agriculture) ve FDA (Food and Drug Administration) tarafından denetim altına alınmıştır. Gıda üreten tüm işletmeler ürünlerde bu patojenden kaynaklanan bir kontaminasyon olup olmadığını belirlemek zorundadır (Koochmaraie *et al.* 2005).

Pseudomonas aeruginosa, Gram negatif, spor oluşturmeyen, aerobik, 1,5- 3 µm uzunluğunda çubuk şeklinde, hareketli bakterilerdir (Erdem 1999). Toprak, su, bitki ve hayvan dokularında yaygın olarak bulunmakta olup, *E.coli* gibi bağırsak kökenli bakterilerin aksine fermantatif özellikte değildir. Optimum gelişme sıcaklığı 42°C'dir. *Pseudomonas* türleri insan, hayvan ve bitkiler için fırsatçı patojen olup; insanlarda apse, septisemi, menenjit, idrar yolu enfeksiyonu, dış kulak yolu enfeksiyonu ve yara ile

yanıklarda enfeksiyonlara neden olmaktadır (Bilgehan 2000; Hasanekoğlu 2002). Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla üreyebilmektedirler. Besinlerin sınırlı olduğu ortamlarda kolonize olarak organik bileşikleri besin kaynağı olarak kullanabilir ve dolayısıyla çevre koşullarına kendilerini çok kolay adapte edilebilmektedirler (Stover *et al.* 2000). Hastane cihazları ve banyoları ile gazlı bezler gibi çok sayıda alandan izole edildiği gibi, hastane enfeksiyonlarına da yol açmaktadırlar. *P. aeruginosa*'ya karşı gentamisin ve sefalosporinler önemli düzeyde etkisi olan antibiyotiklerdir (Çelen 2011).

Staphylococcus aureus Gram pozitif, kok şeklinde, fakültatif anaerop bir bakteri olup; toz, toprak ve çevre yüzeylerde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Optimum üreme sıcaklığı 37°C olan bu bakterinin başlıca konak yerleri insan ve hayvanlardır. Normal cilt florasında ve özellikle burun mukozasında bulunmaktadır (Goss and Muhlebach 2011). Deri-mukoza lokalizasyonları, sepsisler ve zatürre, artrit ve osteomyelit gibi enfeksiyonlar ile gıdalarda gelişmesi durumunda enteretoksin üreterek besin zehirlenmelerine neden olmaktadır (Pakaştıçalı 2014). *S. aureus* suşlarının çoğu aminoglikozitler, tetrasiklinler ve metisiline direnç geliştirmiştir.

Streptococcus mutans, Gram pozitif, fakültatif anaerop bir bakteridir. Normal şartlarda, insan ağız florasında önemsiz bir bileşen olarak bulunmaktadır. Ancak aktif çürük sayısı çok olan kişilerde, ağız florasının önemli bir bileşeni haline gelmiştir (Roberson *et al.* 2010). Bu bakteri öncelikle biyofilm oluşturmak için diş yüzeylerine tutunup ortamdaki karbonhidratları fermantasyon ile asitlere dönüştürmektedir. Düşük pH'lı ortamda karbonhidrat metabolizması devam ederken diş demineralizasyonunun oluşumuna neden olabilmektedir (Çelik 2014). *S. mutans*, biyofilm içerisinde gelişen bir bakteri olduğu için antimikrobiallere diğer bakterilere göre daha az hassasiyet göstermektedir. Dolayısıyla bu bakteri türünün sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesi oldukça zordur (Wang *et al.* 2012).

Saccharomyces cerevisiae; ekmek mayası olarak bilinmekte olup, boyutları tür ve kültür şartlarına göre değişmekle birlikte 2-10x 3-16 µm aralığında değişen ve tomurcuklanan

bir maya türüdür. Probiyotik özellik gösteren *S. cerevisiae*, laktik, asetik ve formik asitleri üreterek bağırsak pH'sını düşürmektedir. Bu etkisi nötr ve bazik koşullarda canlılığını devam ettiren patojen Gram (-) mikroorganizmaların gelişimini engellemektedir. *S. cerevisiae*'nin üremesi için ortamda su, karbon ve azot kaynakları ve vitaminler bulunmalıdır. Ayrıca, glikoz, galaktoz, rafinoz gibi karbon kaynaklarını da kullanabildikleri bilinmektedir (Barnett *et al.* 1990). Zararsız bir mikroorganizma olan bu maya türü uzun yıllardır insan ve hayvan yiyeceklerinde kullanılmaktadır (Seyidoğlu 2015).

Candida albicans, tür ve kültür şartlarına göre değişmekle birlikte boyutları 2-3 x 4-6 µm olan, oval şekilli, tomurcuklanarak üreyen ve insan ve hayvan mukozalarında bulunan bir maya türüdür. *S. cerevisiae*'nin aksine fırsatçı ve patojen özellikte olan bu mikroorganizma kandidiyasis olarak adlandırılan enfeksiyona yol açmaktadır. Enfeksiyon, vücudun rutubetli bölgelerinde, dilde, ağız mukozasında ve deri kıvrımlarının arasında görülmektedir. *C. albicans* enfeksiyonlu bölgeden kan ve lenf yoluyla yayılabilmekte ve farklı bölgeleri de etkileyebilmektedir.

Aspergillus niger, aerobik özellik gösteren, siyah sporlar oluşturan flamentsi bir küf türüdür. Koloni altı genellikle renksiz, bazen merkezde soluk sarıdır. Oldukça gevşek-kompakt, beyaz- hafif sarı bazal miselyum ve bol miktarda dik ve genelde yığınlar halinde toplanmış konidilere sahiptir. *A. niger*'in bazı türleri, soğan, sarımsak, incir ve turunçgil meyvelerinde siyah çürüklüğe neden olurken, bazıları ise gıdalarda toksik metabolitler meydana getirmektedir. Bu mikroorganizma saprofit bir fungus olup, hastalık etmeni olarak zayıf bir patojendir. Henüz olgunlaşmamış ve çatlayan meyvelerde hastalık oluşturmaktadır (Blackburn 2006).

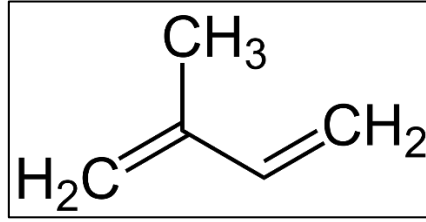
Penicillium roqueforti, doğada yaygın olarak bulunan saprofitik bir fungus olup (Abbas and Dobson 2011), Rokfor, Gorgonzola, Stilson, Cabrales veya Danoblu gibi mavi damarlı peynirler için bir starter kültür olarak kullanılmaktadır. Mavi peynirlerin tipik damarlı görüntüsü ve farklı lezzeti *P. roqueforti* büyümesi, spor oluşturması ve metabolizmasına bağlıdır (Cantor *et al.* 2004). Bununla birlikte *P. roqueforti* çeşitli

gıdalar (peynirler, arpa, pirinç, un, pişmiş ürünler, dondurulmuş hamur ürünleri, et ve et ürünleri) ve hayvan yemlerinde yaygın bir bozulma organizmasıdır (Pitt and Hocking 2009). Bu tür, insan veya hayvan sağlığı üzerine toksikolojik etkilere sahip olabilen mikotoksinlerin de dâhil olduğu sekonder metabolitler üretme potansiyeline sahiptir. Bu toksinler arasında, PR toksin, mikofenolik asit (MPA) ve rokfortin C bulunmaktadır (Frisvad *et al.* 2004; Nielsen *et al.* 2006).

2.6. Esansiyel Yağlar, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri

Esansiyel yağlar, bitkiler tarafından sekonder metabolitler olarak sentezlenen (Ayaz *et al.* 2017); keskin kokulu, soluk sarımsı renkte ve sudan düşük yoğunluğa sahip oldukça karmaşık yapıda olan uçucu bileşen karışımlarıdır (Mohammadhosseini *et al.* 2013). Düşük polariteleri nedeniyle polar organik çözücülerde sınırlı olarak çözünürken, polar olmayan çözücülerde daha fazla çözünmektedirler (Mohammadhosseini 2017). Esansiyel yağların bileşimi, genel olarak %20-95 aralığındaki yüksek konsantrasyonlarda 2 veya 3 ana bileşenden oluşurken, diğer bileşenleri ise düşük düzeylerde buldukları bilinmektedir (González-Burgos *et al.* 2011).

Esansiyel yağların temel bileşenleri, hidrokarbonlar (terpenler, seskiterpenler vs..), esterler, laktonlar, aldehytler, asitler, alkoller ve ketonlar gibi bileşiklerdir (Burt 2007; Bakkali *et al.* 2008; Benchaar *et al.* 2008; González-Burgos *et al.* 2011). Bu bileşenler sayesinde uçucu yağlar; ağrı kesici, sakinleştirici, antimikrobiyal, ferahlatıcı, zihin açıcı, kasılma ve spazm önleyici, stres giderici ve uyutucu etkiler göstermektedirler (Kayman 2013). Günümüze dek esansiyel yağların yapısında tespit edilmiş 2000'den fazla kimyasal bileşiğin %90'ının terpenik maddelerden oluştuğu saptanmıştır (Çelen 2011). Terpenler, izopren (2-metil-1, 3- butadien) olarak adlandırılan beş karbonlu ünitelerden oluşmaktadırlar (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. İzopren molekülünün kimyasal yapısı

Terpenlerin; monoterpen (C10), seskiterpen (C15), diterpen (C20), triterpen (C30) ve tetraterpen (C40) gibi farklı yapıları vardır. Su buharı distilasyonu ile sürüklenebilen küçük molekülü mono ve seskiterpenler uçucu özellikte olup, büyük molekülü seskiterpenler, diterpenler ve triterpenler uçucu olmayan terpenlerdir (Akşit 2008).

Esansiyel yağların bileşimi, iklim faktörleri, bitki metabolizma hızı, salgı bezlerine ait tüylerin farklılaşması (Jerkovic *et al.* 2001), bitkinin genetik özellikleri, yaşı ve yetiştiği çevre koşulları (Abughadyra 2017) gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bileşimi çok kolay bir şekilde karakterize edebilen, gaz kromatografisi- kütle spektrometresi (GC-MS) gibi, gelişmekte olan modern analitik yöntemler bulunmaktadır.

Bitkilerin çiçek, yaprak, tohum, rizom veya kabuk kısımlarından izole edilen esansiyel yağlar genellikle hidrodistilasyon veya soğuk presleme yöntemleri ile elde edilmektedirler (Edris 2007). En sık kullanılan esansiyel yağ üretim metodu olan hidrodistilasyon, yaklaşık 2000 yıl kadar önce ilk kez Mısır, Hindistan ve İran'da kullanılmış, 9. yüzyılda ise Araplar tarafından geliştirilmiştir (Bauer *et al.* 2001). Gerçek anlamda esansiyel yağ distilasyonunun Avrupaya ilk tanıtımını yapan kişinin ünlü İspanyol hekim Arnald de Villanova olduğu ifade edilmektedir (Guenther 1948). Bauer *et al.* (2001), 13. yüzyılda esansiyel yağların eczaneler tarafından üretilebildiğini ve farmakolojik etkilerinin farmakope isimli ilaç klavuzunda tarif edildiğini belirtmektedir. Ancak, bu ifadelerle rağmen 16. yüzyıla kadar Avrupa'da esansiyel yağların kullanımının yaygın olmadığı görülmektedir (Crosthwaite 1998). Guenther (1948), Brunschwig ve Reiff isimli iki hekimin bulunulan yüzyılda terebentin, ardıç ağacı, biberiye, lavanta, karanfil, fıstık, anason ve tarçın esansiyel yağlarının distilasyonu ve kullanımı üzerine araştırmalarının olduğunu ifade etmiştir. Fransız hekim Joseph Du Chesne, 17. yüzyılda

esansiyel yağ hazırlama tekniklerinin bilindiğini ve eczanelerde 15-20 farklı çeşit esansiyel yağ bulunduğunu belirtmektedir (Guenther 1948). Esansiyel yağların bakterisidal özelliklerinin ilk deneysel ölçümü De la Croix tarafından 1881'de yapılmıştır (Burnt 2004). Bununla birlikte, Guenther (1948) 19 ve 20. yüzyıllarda esansiyel yağların tıbbi amaçla kullanımından ziyade, lezzet ve aroma maddesi olarak daha fazla dikkat çektiklerini belirtmiştir.

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler ve terpenoidler gibi biyoaktif bileşiklerin yoğun şekilde bulunduğu esansiyel yağların büyük çoğunluğunun antimikrobiyal ve antioksidan aktivite sergilediği bilinmektedir (Zinoviadou *et al.* 2011). Gerek sağlık, gerekse de ekonomik kaygılar, araştırmacıları bakteri, küf veya mayaları kısmen inhibe edebilen veya tamamen ortadan kaldıracabilecek esansiyel yağları bulmaya yönlendirmektedir (Soliman and Badeea 2002).

Son yıllarda çeşitli bitkilerden elde edilen esansiyel yağların antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine yapılmış olan çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları; karanfil (Emir Çoban and Patir 2013), kakule (Nahr *et al.* 2018), mercanköşk (Anaya-Castro *et al.* 2017), tarçın (Wu *et al.* 2017), sarımsak (El-Sayed *et al.* 2017), ağaç kavunu (Mitropoulou *et al.* 2017), zerdeçal (Masniyom *et al.* 2012), adaçayı (Emir Çoban *et al.* 2016), maydanoz (Faour-Klingbeil *et al.* 2016), *Adenium obesum* (Akhtar *et al.* 2017), *Daucus virgatus* (Snene *et al.* 2017), *Epilobium parviflorum* (Bajer *et al.* 2017), *Ferula orientalis* (Kartal *et al.* 2007; Sepahi *et al.* 2014; Razavi *et al.* 2016) gibi endemik veya endemik olmayan aromatik bitkiler üzerinedir.

Bir esansiyel yağın en spesifik özelliği hidrofobisitesidir. Bu özellik esansiyel yağların, bakteri hücre membranı ile mitokondri lipitlerini parçalayarak membran geçirgenliğini arttırması ve hücre yapısının bozulmasını sağlamaktadır (Viuda-Martos *et al.* 2008). Geçirgenliği artan hücreden zamanla önemli moleküller, iyonlar ve diğer hücre bileşenleri çıkarak hücre ölümü gerçekleşmektedir (Viuda-Martos *et al.* 2008).

Web of Science, Science Direct, Pub Med ve Google Scholar veri tabanlarında özellikle son on yıla ait araştırmalar üzerine yoğunlaşıldığında; bazı *Ferula* turleri, bu turlere ait ekstraktlar ve esansiyel yağlarına ait yapılan literatür taramalarında, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite başlığı altında aşağdaki çalışmalara ulaşılmıştır;

Maggi *et al.* (2009), *Ferula glauca* L.'nin toprak altı kısımlarından elde edilen esansiyel yağın *Bacillus subtilis*'e karşı yüksek düzeyde aktivite gsterdiğini rapor etmiştir. *Ferula heuffelii* esansiyel yağının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine yapılan bir çalışmada; esansiyel yağın en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Candida albicans*'ın iki suřu (MİK: 7.0 ve 13.7 µg/ml)'a karşı sergilediği, ayrıca *Micrococcus luteus* (MİK=13.7 µg/ml), *Staphylococcus epidermidis* (MİK: 17.6 µg/ml), *Bacillus subtilis* (MİK: 21.1 µg/ml) ve *Micrococcus flavus* (MİK: 28.2 µg/ml) bakterileri üzerine de etkili olduğu vurgulanmıştır. Aynı alışmada *F. heuffelii* esansiyel yağının önemli düzeyde antioksidan aktivite gsterdiği ve DPPH• radikal süpürme aktivitesinin IC₅₀ değeri olarak 22.43 µ/ml iken standart olarak kullanılan L-Askorbik asitte 3.80 µ/ml olduğu ifade edilmiştir (Pavlović *et al.* 2012).

Farklı bir çalışmada Nguir *et al.* (2016) Tunus'ta yetişen *Ferula communis* L. bitkisinden hidrodistilasyon yöntemi ile elde ettiği yaprak esansiyel yağının *P. aeruginosa* üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediğini (MİK: 0,156 mg/ml); aynı bitkinin kökünden elde edilen esansiel yağın *S. aureus*'a karşı zayıf aktivite gsterirken (MİK:2,5 mg/ml) , *E.coli*'ye karşı önemli düzeyde inhibisyon etkisi gsterdiğini (MİK: 0,312 mg/ml); iek esansiyel yağının ise yalnızca *P.aeruginosa*'a karşı etkili olduğunu (MİK: 1,25 mg/ml) belirtmişlerdir. Antioksidan aktivitenin ise en yüksek olarak bitki saplarından elde edilen esansiyel yağda saptandığı ifade edilmiş ve DPPH• radikali giderme aktivitesinin IC₅₀ değeri cinsinden 0,03 mg/ml; katalaz aktivitesinin ise 303.03 µmol H₂O₂ /dk/protein olduğu rapor edilmiştir.

İran Neishabour'da yetişen *Ferula assafoetida*'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen esansiyel yağ, GC/MS ile analiz edildikten sonra bazı Gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) ve bazı Gram

negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*) üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyonları tespit edilmiştir. Toplamda 23 bileşenden oluşan esansiyel yağın majör bileşenleri; %53,77 (*E*)-1-propenyl sec-butyl disulfide, %35,6 (*Z*)-1-propenyl sec-butyl disulfide ve %3,4 α -pinene olarak belirlenmiştir. Bakteriler üzerine 12-24 mg/ml aralığında inhibitör etki gösteren esansiyel yağın antimikrobiyal aktivitesi içerdiği disülfid bileşiklerine bağlanmıştır (Samadi *et al.* 2016).

Zhang *et al.* (2015a), *Ferula sinkiangensis*'e ait petrol eteri, etil asetat, n-bütanol ve metanol ekstraktlarının serbest radiakal süpürücü aktivitesini DPPH yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. Ekstraktlar için IC₅₀ değerlerinin sırasıyla; 3166, 34.1, 33.8, ve 40.3 mg/L olarak rapor edildiği çalışmada, etil asetat, n-bütanol ve metanol fraksiyonlarının doza bağımlı olarak antioksidan aktivite gösterdiği ancak, petrol eteri ekstraktının herhangi bir antioksidan aktivite göstermediği vurgulanmıştır.

Ferula pseudalliacea köklerinden elde edilen seskiterpen kumarinler ve diseskiterpen kumarinlerin mikrodilüsyon metodu kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlendiği bir çalışmada Dastan *et al.* (2016); elde ettiği esansiyel yağı *Staphylococcus aureus* ATCC 25,923, *Enterococcus faecium*, *Bacillus cereus* PTCC 1015, *Escherichia coli* ATCC 25,922, *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1430, *Klebsiella pneumoniae* ve *Helicobacter pylori*'den oluşan 7 patojen suş üzerinde denemiştir. İnhibisyon etkisinin Gram pozitif bakterilere karşı daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Çalışmada sanandajin ve etil galbanat bileşiklerinin *H.pylori* ve *S.aureus* suşlarına karşı 64 μ g / ml konsantrasyonda etkili iken; metil galbanat'ın da vankomisine dirençli olan *E.faecium*'u 64 μ g/ml konsantrasyonda inhibe ettiği rapor edilmiştir. Araştırmacılara göre, mevcut sonuçlar *F. pseudalliacea* köklerinden elde edilen seskiterpen ve diseskiterpen kumarinlerin farmasötik ve gıda endüstrileri için güçlü birer antibakteriyel olarak kullanılabileceklerini göstermiştir.

Razavi *et al.* (2016), n-hekzan, diklorometan ve metanol çözücülerini ile *Ferula orientalis* köklerinden soxhlet ekstraksiyonu ile elde ettiği ekstraktlarda ferulon A ve B olarak

isimlendirdiği iki yeni kumarin esteri (7-O-(4,8,12,16-tetrahidroksi-4,8,12,16-tetrametil-heptadekanoil)-kumarin ve 7-O-(4-hidroksi-4,8,12-trimetil-trideka-7,11-dienoil)-kumarin) belirlemiştir. Araştırma kapsamında yapılmış olan DPPH• serbest radikali giderme analizinde, her iki bileşenin de pozitif kontrol olarak kuersetinin kullanıldığı duruma göre (0,004 mg/ml) düşük düzeylerde serbest radikal giderme aktivitesi gösterdiği (IC₅₀ değerleri sırasıyla; 0,252 ve 0,556 mg/ml) tespit edilmiştir.

Ferula lutea köklerinden hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen esansiyel yağın yüksek oranda monoterpen hidrokarbonlarından (%72,6 delta-3-karen, %5,8 alfa-pinen, %5,1 mirisin ve %4 alfa-fellandren) oluştuğu kombine olarak çalışılan GC (FID), GC-MS ve C-13-NMR spektroskopisi ile belirlenmiştir (Salem *et al.* 2016). Disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılarak antibakteriyel etkinin belirlendiği bu çalışmada *Ferula lutea* kök esansiyel yağının ilginç şekilde antibakteriyel ve anticandidal aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre minimum inhibisyon konsantrasyonları; *E. coli*'ye karşı 39 mg/ml, *Salmonella typhimurium*'a karşı 78 mg/ml ve *Candida albicans*'a karşı 156 mg/ml düzeyinde belirlenmiştir.

Farklı bir çalışmada jelatin filminin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini iyileştirmek amacıyla *Ferula assa-foetida* esansiyel yağı kullanılmıştır (Gholamreza *et al.* 2015). Antimikrobiyal aktivite disk difüzyon yöntemi ile Gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa* PTCC 1074 (ATCC 9027) ve *E. coli* PTCC 1330 (ATCC 8739), Gram pozitif bakterilerden ise *S. aureus* PTCC 1112 (ATCC 6538) ve *B. subtilis* PTCC 1023 (ATCC 6633) kullanılarak tespit edilmeye çalışılmış ve her iki gruba karşı esansiyel yağ uygulanmış filmlerin mükemmel antibakteriyel aktivite sergilediği belirlenmiştir. Jelatinin antioksidan aktivitesi %0,4 mg askorbik asit eşdeğeri (AAE) iken, ilave edilen esansiyel yağ yüzdesi arttıkça antioksidan aktivitenin arttığı ve %8 esansiyel yağ ilave edilen filmin antioksidan aktivitesinin 3.86 mg askorbik asit eşdeğeri olarak tespit edildiği görülmektedir.

Akbarian *et al.* (2017), İran'da yetişen *F. assa-foetida*, *F. gummosa* ve *F. ovina* bitkilerinin antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, *F. ovina*

türünün en yüksek fenolik madde içeriği ve β -karoten inhibisyonuna (sırasıyla; 120,72 mg/g ve %92,28) sahip olduğunu; toplam flavonoid miktarının ise *F.gummosa*'da en yüksek olduğunu (8,09 mg Kuersetin Eşdeğeri/g) rapor etmişlerdir.

Mamoci *et al.* (2011) *Ferula communis*'den izole edilen acetoxyferutin, oxojaeskeanadioyl anisate ve ferutidin bileşiklerinin; *Botryotinia fuckeliana*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Monilinia laxa*, *Monilinia fructigena* ve *Aspergillus* spp üzerine antimikrobiyal aktivitesini incelemiş ve kök ekstraktının yalnızca *Botryotinia fuckeliana*, *Monilinia laxa* ve *Monilinia fructigena* türlerinin gelişimini etkilediğini, toprak üstü ekstraktının ise koloni gelişimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmiştir.

Znati *et al.* (2017) Tunus'a ait endemik bir bitki türü olan *Ferula tunetana* bitkisinin tohumlarından ekstrakte ettiği esansiyel yağın %77,3 monoterpen hidrokarbonlar, %4,1 oksijenlenmiş seskierpenler, %3,2 seskiterpen hidrokarbonlardan oluştuğunu ve en baskın bileşiklerin α -pinen (39.8%), β -pinen (11.5%) ve (Z)- β -osimen (7.5%) olduğunu belirlemiştir. Esansiyel yağın *Salmonella typhimurium* LT2 DT104 (inhibisyon zonu; 16.2 \pm 1.0 mm) ve *Bacillus cereus* ATCC 14579 (inhibisyon zonu; 15.8 \pm 1.0 mm) üzerine antimikrobiyal aktivite sergilediği; orta düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve H₂O₂'e karşı IC₅₀ değerinin 78,2 μ g/ml olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmanın devamında esansiyel yağın antigerminatif etkisinin olduğu belirlenmiş ve toksik olduğu ifade edilmiştir.

Kartal *et al.* (2007) tarafından Sivas ilinde yetişen *F. orientalis* bitkisinin soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilmiş aseton oleoresin, deodorize aseton oleoresin, deodorize su, metanol ve n-hekzan ekstraktlarının DPPH• radikal giderme aktivitesi ve β -karoten ağartma yöntemleri ile antioksidan aktivite tayini ve GC-MS ile esansiyel yağın kompozisyonu belirlenmiştir. Esansiyel yağın temel bileşenleri, β -fellandren (23.6%), (E)- β -osimen (13.8%), α - (12.5%), α -fellandren (11.5%) ve dehidro-seskisineol (10.1%) olarak tespit edilmiştir. En yüksek DPPH• radikali giderme aktivitesi polar özellikte olan deodorize metanol: su ekstraktı (IC₅₀: 99,1 μ g/ ml) tespit edilmiştir. Belirlenen sonucun

aksine; β -karoten ağartma yönteminde ise deodorize aseton ekstraktının diğer polar ekstraktlardan daha yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Ferula cinsine ait bazı doğal bileşenleri inceleyen Iranshahi *et al.* (2009), seskiterpen bir kumarin olan umbellipreninin Gram negatif özellik taşıyan *Serratia marcescens*'in kırmızı pigment üretimini inhibe ettiğini rapor etmiştir. Bu durumun umbelliprenin lipoksigenaz inhibe edici aktiviteye sahip olmasından kaynaklandığı bildirilmektedir. Lipoksigenaz inhibisyonu astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), osteoporoz ve ateroskleroz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde fayda sağlamaktadır (Dwyer *et al.* 2004; PetersGolden and Henderson 2007). Bununla birlikte bazı *Ferula* türlerinde bulunan umbelliprenin; *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus typhi*, *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* gibi çeşitli mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etki gösterdiği de rapor edilmektedir (Iranshahi *et al.* 2004).

Appendio *et al.* (2004) *Ferula communis*'de bulunan seskiterpenlerden olan ferulenol ve onun 3 türevinin (12'-benzoyloxyferulenol, 12'- hydroxyferulenol and 12'-acetoxy ferulenol) *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium aurum*, *M. smegmatis* ve *M. phlei* üzerine antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirlemiştir. Ferulenol ve asetat türevinin izonikotinic asit ile kombine edildiğinde *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşuna karşı antimikrobiyal etki gösterdiği Mossa *et al.* (2004) tarafından bildirilmiştir. Ancak araştırmalarda ferulenolün antimikrobiyal aktivite gösterdiği suşların hiçbirinin *M. tuberculosis* ana patojen suşuna karşı etkili olmadığı gözlenmektedir.

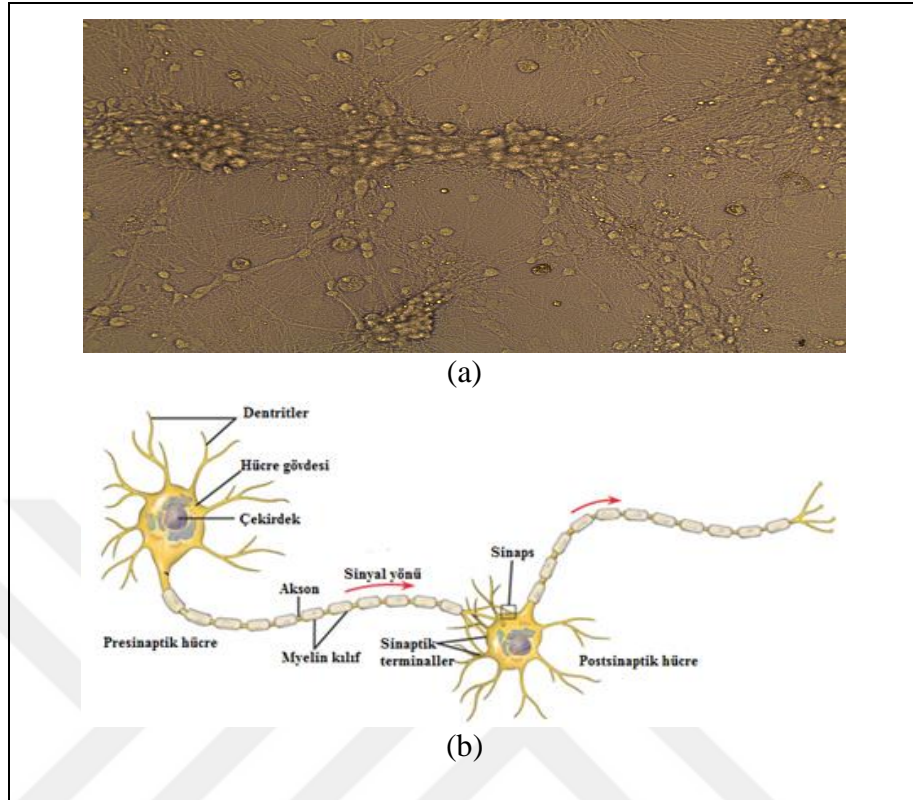
Shahverdi *et al.* (2007) *Ferula szowitsiana*'dan izole edilen galbanik asitin penisilin G ve sefaleksinin antibakteriyel etkinliğini artırdığını belirlemiştir. Penisilin ve sefaleksinin antibiyotiklerinin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için disk difüzyon ve broth dilüsyon yöntemleri uygulanmış ve *Staphylococcus aureus*'a karşı penisilin G için galbanik asit yokluğunda 64 mg/ml olan MİK değeri; ortama 100 mg/ml galbanik asit konsantrasyonun altında galbanik asit ilavesiyle 1mg/ml'ye düşürülmüştür. Sefaleksinin için de benzer durum söz konusudur. *Staphylococcus aureus*'a karşı MİK değerlerinin,

ortama galbanik asit ilavesiyle 128 mg/ml'den 1 mg/ml'ye kadar düştüğü bildirilmiştir. Bu bulgular galbanik asitin bulaşıcı hastalıkların tedavisini destekleyebileceğini göstermektedir (Nazari and Iranshahi 2011). Fazly-Bazzaz *et al.* (2009), metisilin, tetrasiklin ve siprofloksasin antibiyotiklerine dirençli olan *Staphylococcus aureus* izolatlarına karşı galbanik asitin antimikrobiyal etkiyi artırdığını rapor etmiştir. Galbanik asitin sitotoksik konsantrasyonun altında metisilin, tetrasiklin ve siprofloksasin antibiyotiklerinin MİK değerlerinde sırasıyla; 10–80 mg/mL, 40–80 mg/mL ve 10–20 mg/mL aralıklarında düşüşe neden olmuştur. Ancak gözlenen etkinin sadece galbanik asitten kaynaklanmadığı, galbanik asit ve antibiyotiklerin birlikte bu etkiyi gösterdikleri vurgulanmıştır.

2.7. Beyin Dokusu ve Serbest Radikaller

Beyin, hayvan anatomisinde merkezi sinir sisteminin yönetim merkezidir. Beyin dokusu, nöronlar (sinir hücreleri) ve nöronları koruyan destek hücreleri olan nöroglialar olmak üzere başlıca iki tür hücreden oluşmaktadır. Sinir sistemindeki hücre kitle oranı dikkate alındığında, sistemin %10'unu nöronlar, %90'ını ise glial hücrelerin oluşturduğu bilinmektedir (Alexei 2007).

İnsan beyni yüz milyarın üzerinde nörondan oluşmakta ve nöronların her biri, kendi içerisinde on bin nöronla bağlantı kurmaktadır. Çeşitli şekillerde veya büyüklükte olabilen nöron hücreleri, elektriksel ve kimyasal yollarla sinir uyarılarını iletmektedir. Nöron hücrelerinin kısa uzantılarına dentrit, uzun uzantılarına ise akson denmektedir (Şekil 2.17). Bir nöronda, gelen uyarılar dentrit uzantılarıyla alınıp akson uçları ile diğer hücrelere iletilmektedir. Dentrit ve akson; nöron gövdesinden çıkıp sonra birleşip tek uzantı haline geliyorsa tek kutuplu (unipolar), nöron gövdesinde karşılıklı olarak konumlanmışsa iki kutuplu (bipolar), nöron gövdesinden çok sayıda dentrit ve bir akson çıkıyorsa çok kutuplu nöron hücresi (multipolar) olarak isimlendirilmektedir (Çetin 2013).



Şekil 2.17.a) Nöron hücrelerinin toplu halde görünümü, **b)** Tek nöron hücresinin kısımları

‘Yapışkan görünümlü’ anlamına gelen Yunanca ‘gli’ kelimesinden türemiş olan glia hücreleri; omurgasız canlılardan memelilere kadar her canlı grubunda değişik şekillerde, değişik fonksiyonlarda ve canlı büyüklüğüyle orantılı olarak değişik sayılarda bulunmaktadır (Azevedo *et al.* 2009). Glial hücreler, nöronların etrafını sararak fiziki destekte bulunmanın yanı sıra; O_2 ve besin alımı, atıkların uzaklaştırılması, ölmüş hücre, nöronlar ve patojenlerin ortadan kaldırılması gibi görevleri de üstlenmektedirler (Allen and Barres 2009).

Nöron ve glia hücrelerinin benzer oldukları tek nokta; her ikisinin de ektoderm kökenli olmalarıdır (Allen and Barres 2009). Ancak, glial hücrelerin gelen uyarılara karşı birer aksiyon potansiyeli oluşturamaması ve glial hücrelerin mitoz evre sonrası bölünebilmelerine rağmen, nöron hücrelerin post mitotik evrede kalarak mitoz evreyi tamamlayamaması sebebiyle bölünememeleri gibi birçok noktada farklılıklar söz konusudur (Herrup and Yang 2007; Allen and Barres 2009).

Hücrenin morfolojisi, konumu ve fonksiyonuna göre glial hücreler;

Merkezi sinir sisteminde makroglia ve mikroglia hücre grupları yer alırken; periferik sinir sisteminde sadece Schwann hücreleri bulunmaktadır. Makroglia hücreleri, glial hücrelerin yaklaşık %85-90'ını oluşturmaktadır; astrositler, oligodendro glialar, ependimal hücreler, radyal glia hücreleri ve Schwann hücrelerini içermektedir.

Astrositler: Makroglia hücrelerinin en önemli grubudur. Glia hücrelerinin %80'ini oluşturmaktadır. Beynin farklı bölgelerinde bulunan astrositlerle oluşturdukları Ca^{+2} iyon dalgası sayesinde iletişim kurabilmektedirler. Depresyon, Alzheimer, MS (Multiple Skleroz), hafıza kaybı gibi çeşitli hastalıklarla direkt ilişkili olan astrositlerin bazı fonksiyonlarına aşağıda değinilmiştir;

- ✓ Astrositlerin salgıladığı birçok hormon ve sitokin ile nöronların beynin farklı bölgelerine göç etmesini sağlamakta,
- ✓ Nöron hücrelerine O_2 ve besin takviyesi yapmakta,
- ✓ Bilgi sürecinde rol oynamakta,
- ✓ Nörotransmitter ve hormon reseptörlerine bağlanan Ca^{+2} iyon yolağını aktifleştirmekte ve böylece nöron astrosit iletişimini düzenlemekte,
- ✓ Sinaps bağlantılarını düzenlemekte,
- ✓ Nöronal aktivite artışı durumunda kan akışını artırmakta, damar çapı genişliğini kontrol altında tutmakta,
- ✓ Beynin K^+ iyon seviyesini düzenlemekte ve
- ✓ Daha önce salgılanan nörotransmitter maddeleri tekrar sirkülasyona sokmaktadırlar (Nalcı 2016).

Oligodendro glialar: Temel görevleri nöron yalıtımını sağlayan myelin maddesi ile aksonları örtmektir. Myelin, lipit yapısındadır ve gerçekleştirilen yalıtım işlemi elektriksel iletim hızını artırmaktadır (Allen and Barres 2009).

Ependimal hücreler: Bu hücreler ventrikül çeperlerini kaplamakta ve beyin omurilik sıvısını üreterek; bu sıvının ventriküllere salınımını sağlamaktadır. Ayrıca mekanik darbelere karşı beyni korumaktadırlar (Allen and Barres 2009).

Radyal glia hücreleri: Bu grup, embriyogenik sinir sisteminin gelişim sürecinde nöronların göçünü sağlarken; yerleşim tamamlandıktan sonra protoplazmik astrositlere dönüşmektedirler (Allen and Barres 2009).

Schwann Hücreleri: Omurilikte bulunmaktadır. Akson yalıtımı ve sinaps oluşumuna yardımcı olmaktadır (Allen and Barres 2009).

Mikroglia hücre grupları ise dikdörtgen şekilli ve heterojen görünüm sergileyen, fagosit özellikli ve göç edebilen hücrelerdir. Hücrede bir hasar olduğunda tespit ettikten sonra; enfeksiyon olup olmadığını belirleyip çoğalarak; ölü hücreleri fagositoz ile ortamdan uzaklaştırmaktadırlar (Nalcı 2016).

2.8. Glutamat

Beyindeki en önemli nörotransmitter olan L-glutamat, uyarı iletimi, öğrenme, hafıza fonksiyonları ve sinaptik olayların düzenlenmesi gibi birçok görevde rol almaktadır. L-glutamat, krep siklusunu ara ürünü olan α -ketoglutaratın indirgeyici aminasyonu ile oluşmaktadır. Sinir hücrelerinin stoplazmasında veya sinaptik veziküller içerisinde bulunmaktadır. Beyin fonksiyonları için oldukça önemli olan bu nörotransmitter aynı zamanda önemli bir nörotoksindir (Chen *et al.* 2011; Qian *et al.* 2011).

Alzheimer, Parkinson, MS, travma, depresyon gibi nörodejeneratif rahatsızlıklarda glutamat reseptörleri aşırı uyarılmakta ve glutamat bulunduğu yerde tutulmayıp hücre dışına çıkmaktadır. Sinaptik aralıktan da yeterince geri alınamayan glutamatın hücre dışı ortamda konsantrasyonu artmaktadır (Szatkowski *et al.* 1994). Bu artış, astositlerin şişmesine neden olarak parçalanmalarına öncülük eden bir dizi olayın başlamasına sebep olmaktadır. Araştırmalar, glutamatın NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptör

sitümüstasyonlarını arttırıp, hücre içi Ca^{+2} dengesini bozduğunu ve artan oksidatif stresin nörotoksisiteye sebep olduğunu göstermektedir (Ankarcrona *et al.* 1995). Glutamat tarafından indüklenen nörotoksisitenin erken fazında ortamdaki reaktif oksijen türlerini yakalamak için sitokrom c salınımı ile düşük düzeyde de olsa glutamat toksisitesi önlenmekte ancak, toksisitenin ilerleyen aşamalarında hücre artan reaktif oksijen türlerini tolere edememektedir (Butterfield 2003). Sonuçta hücre mitokondrisinde hasar ve apoptoz oluşmaktadır (Liu *et al.* 2007).

Organizmada hücre ölümü, apoptoz ve nekroz olmak üzere iki mekanizma ile gerçekleşmektedir (Ameisen 1996). Nekroz olayı; aşırı ısı, yaralanma, enfeksiyon, kanser, zehirlenme veya enflamasyon gibi fiziksel ve kimyasal uyarılara maruz kalan hücrenin iyon dengesinin bozulması ile başlamaktadır. DNA onarımından sorumlu poli ADP-riboz polimeraz enzimi NAD kaybına sebep olmakta ve ATP eksikliğinden dolayı iyon pompası yetersiz kalmaktadır. Sonuçta içerisine sıvı alan hücrede organeller şişmekte ve artan ozmotik basınç hücrenin patlayıp, hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa yayılmasına neden olmaktadır (Golstein and Kroemer 2007). Makrofajlar nekrotik dokuya doğru göç ederek fagositoz yoluyla ortadan kaldırmaktadır (Nicotera *et al.* 2004).

Apoptoz olayı, hücrede bir denge unsurudur. Çünkü apoptik hücre sayısı organizmanın hastalık veya sağlık durumuna göre değişkenlik göstermektedir (Kwon *et al.* 2016). Apoptik uyarı, hücre zarında değişimlere, zarın degradasyonuna ve ardından apoptik cisimciklerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu olay birkaç dakika içinde son bulmakta ancak, apoptik hücrelerin fagositozu daha uzun sürmektedir (Altunkaynak ve Özbek 2008). Apoptoz, normal bir hücrenin büyüme ve homeostazisi için gereklidir.

Bitkilerin içerdiği birçok biyoaktif bileşiğin antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif hasara karşı organizma tarafından kullanılmaktadırlar. Serbest radikaller ile reaktif oksijen türleri; DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik olarak önemli moleküllerin çekirdek ve zarlarına zarar vererek, hücre hasarı ve homeostatik bozulmaya

neden olmaktadır (Young and Woodside 2001). Oksidatif stresin kanser, kalp-damar hastalıkları, katarakt, cilt hastalıkları, tip 2 diyabet, böbrek, akciğer ve beyin hastalıklarına sebep olduğu son yıllarda yapılmış birçok çalışmada rapor edilmektedir (Halifeoğlu vd 2005; Cihaner 2009; Samaranayaka vd 2011). Mazlum (2012), oksidatif strese karşı en duyarlı organın beyin olduğunu ifade etmektedir. Çünkü beyin yüksek enerji ihtiyacı ve sınırlı antioksidan kapasitesi olan bir organdır (Mazlum 2012). Bu yüzden, oksidatif hasarın neden olduğu Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi üzerinde antioksidan bileşenlerce zengin gıdaların etkili olduğu düşünülmekte ve çalışmalar bu yönde yoğunlaşmaktadır (Gerber *et al.* 2002).

Web of Science, Pub Med, Science Direct, Scopus ve Scholar Google veri tabanlarında yapılan literatür taramalarında *Ferula* türlerinin nöron hücrelerine etkileri üzerine yapılmış olan çok az sayıda çalışmanın bulunduğu, *Ferula orientalis*'e ait nöroprotektif aktivite çalışmasının ise hiç olmadığı görülmektedir. Bu yönüyle yapılan bu çalışma bir ilk olacaktır.

Yapılan literatür taramalarında; Moghadam *et al.* (2013), *Ferula assa-foetida* oleogam reçinesinin nöron hücreleri üzerine etkisini belirlemek için, nöronlara benzeyen hücreleri beta-Tubulin II ve MAP2 boyaları ile işaretledikten sonra nöron kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda suda çözündürülmüş reçineyi uygulamışlardır. Nöron hücrelerinin hayatta kalma oranı, hücre sayımı ve MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltatrazilyum bromid) testleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar özellikle 0,01 ve 1 µg/ml konsantrasyonlarının nöronların hayatta kalma oranını artırabildiğini, 10 µg/ml dozunun ise toksik etki sergilediğini göstermektedir (Moghadam *et al.* 2013). *Ferula assafoetida* su ekstraktının sıçanlarda öğrenme ve hafıza üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada pozitif kontrol olarak rivastigmin kullanılmış ve günde 200 ve 400 mg/kg'lık ikişer doz sıçanlara oral yolla verilmiştir. Ardından uygulanan yükseltilmiş artı labirent ve kaçınma paradigmaları sonrası *F. assa-foetida* nın doza bağlı olarak hafıza arttırma kabiliyeti tesbit edilmiş ve bu özellik asetilkolinesteraz inhibisyonu ile antioksidan seviyesinin yüksek olmasına bağlanmıştır. *F. assa-foetida*'nın günlük

kullanımının faydalı olduğu ve anti-demans tedavilerinde bir destekleyici olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Vijayalakshmi *et al.* 2012).

Nöroprotektif aktivite üzerine yapılmış olan araştırmaların dışında, *Ferula* türlerinin çeşitli kanser türleri üzerine sitotoksik aktiviteleri üzerine yapılmış pekçok çalışmanın mevcut olduğu görölmektedir. Bu araştırmalardan bazıları; renal hücre kanseri hücre hattına *Ferula gummosa* gamının kullanımı (Hosseini *et al.* 2017), göğüs kanseri hücre hattı *Ferula heuffelii* kloroform ekstraktı (Pavlovic *et al.* 2015), boyun, göğüs ve karaciğer kanser hücre hatlarına *Ferula tingitana* L. (Elgwaji *et al.* 2017) ekstraktı, akciğer kanser hücre hattında *Ferula assa-foetida*'dan elde edilen galbanik asit (Oh *et al.* 2015), kolon kanseri hücre hattında *Ferula* türlerinde bulunan bir seskiterpen olan ferutin (Arghiani *et al.* 2014) ve lösemi hücre hattında *Ferula lutea* iekleri (Znati *et al.* 2014)'nin kullanımı bu konuda yapılan araştırmalardan bazılarıdır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Çalışmamızda kullanılan çasıır (*Ferula orientalis* L.) bitkisi 2017 yılı Nisan ayında Erzurum ili Tortum ilçesi Serdarlı Mahallesi dağlık arazisinden toplanmıştır. Çasıır toplanan bölgeye ait koordinatlar; 40°29' 20.2''N ve 41°21'52.4'' E şeklindedir. Bitki örnekleri; Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Meryem ŞENGÜL KÖSEOĞLU tarafından tanımlanmıştır. Toplanan çasıırlar salamura edilene kadar $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gün muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Çasıır bitkisi (*Ferula orientalis* L.)

Çalışma kapsamında; bitki örneklerinin salamura edilmesi, liyofilizasyonu, ekstraksiyon işlemleri ve yürütülen analizlerden; antioksidan ve antimikrobiyal aktivite analizleri Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Meyve ve Sebze İşleme Teknolojileri ve Gıda Mikrobiyolojisi laboratuvarlarında; Esansiyel yağ eldesi Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Laboratuvarı'nda; test numunelerinin fenolik ve uçucu bileşenlerinin tespiti Gaziosmanpaşa Ünivesitesi Kimya Bölümü Bitki Araştırma Laboratuvarında; numunelerin mineral madde kompozisyonlarının tespiti Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde; in vitro nöroprotektif

aktivite tayini ise Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda, gerçekleştirilmiştir.

İn vitro nöroprotektif aktivite analizlerinde kullanılan nöron hücrelerinin canlı hayvandan alınarak çoğaltılması sebebiyle çalışmanın etik kurallara uygunluğu 08.05.2017 tarihli ve 75366018-000-E.1700134755 sayılı AÜHADYEK (Atatürk Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu) tarafından verilen yazı ile onaylanmıştır.

3.2. Analizlerde Kullanılan Kimyasallar

Ekstraktların hazırlanmasında etanol (C_2H_5OH , \geq %99,8, Sigma), metanol (CH_3OH , \geq %99,7, Sigma), kloroform ($CHCl_3$, %99,7, Sigma), n-hekzan ($CH_3(CH_2)_4CH_3$, \geq %97,0, Sigma) ve esansiyel yağ eldesinde siklon köpüklenmeyi önleyici (Merck 107743) kullanılmıştır.

İn vitro toplam fenolik ve flavonoid madde analizlerinde; gallik asit ($C_7H_6O_5$, %97,5-102,5 (Sigma), sodyum karbonat (Na_2CO_3 , %99,5, Sigma S2127) ve Folin & Ciocalteu's reaktifi (Sigma F9252), alüminyum nitrat nonahidrat ($Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, Sigma 237973), potasyum asetat (CH_3COOK , Sigma 110183), quercetin dihidrat ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, Sigma 6151-25-3) kullanılmıştır. $ABTS^{+}$ ve $DPPH\cdot$ serbest radikal giderme aktiviteleri ve Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitesi metotlarında; 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ($ABTS$, \geq 98%, Sigma A1888), potasyum peroksidisülfat ($K_2O_8S_2$, Merck 5090), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma D9132), neocuproine hydrate ($C_{14}H_{12}N_2 \cdot xH_2O$, %99, Sigma 121908), kuprik klorid ($CuCl_2$, %97, Sigma 222011), sodyum asetat (CH_3COONa , Sigma W302406), hidroklorik asit (%37, Sigma 435570) ve standart antioksidantlar; bütillenmiş hidroksi anisol (BHA, Sigma B1253), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT, Sigma W218405), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks, Aldrich 23881-3), (+)- α -tokoferol ($C_{29}H_{50}O_2$, Sigma T3634), etilendiamin-4-asetik asit (EDTA, $(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$, Aldrich 431788)'den yararlanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite analizlerinde; Tween 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₀, Merck), DMSO (Dimethyl sülfoxid, ≥99,9%, Merck), nutrient broth (Merck, 105443), sabouraud dextrose broth (Merk, 108339), potato dextrose agar (Meck, 110130), plate count agar (Merck, 1.05463), amphotericin B (C₄₇H₇₃NO₁₇, Sigma A2942), ofloxacin (C₁₈H₂₀FN₃O₄, Sigma O8757) kullanılmıştır.

İn vitro nöroprotektif aktivite analizlerinde; propidium iodide (C₂₇H₃₄I₂N₄, Sigma Aldrich P4864), neuronal base medium (NBM, Sigma 21103-049), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma D5796), fetal bovin serum (FBS, Sigma F2442), B27 (Supplement, Gibco 12587-010), tripsin (Sigma-Aldrich 59429C). Penisilin – streptomisin-amphotericin B, (Life Technology 15240-062), %1 L-Glutamine (Life Technology 25030-081), 3- (4,5- dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium Bromid (MTT, Sigma-Aldrich MKBR4419V), DMSO (Dimethyl sülfoxid, Sigma-Aldrich D4540), tripsin EDTA (Sigma T4049), annexin V apoptosis deteksiyon kiti (Biotek), TAK kitleri (Rel Assay Diagnostics Sigma), TOS kitleri (Rel Assay Diagnostics Sigma)'dan yararlanılmıştır.

Fenolik ve uçucu bileşen profilinin belirlenmesi için ise; aseton (270725 Sigma-Aldrich), helyum, amonyum asetat (240192 Aldrich), formik asit (33015 Sigma-Aldrich), metanol (34860 Sigma-Aldrich), fenolik standartlar alkan karışımı standartı (Sigma-Aldrich) ve kolon dolgu maddesi olarak silika jel 6 (0,063-0,200 mm, Merck) kullanılmıştır.

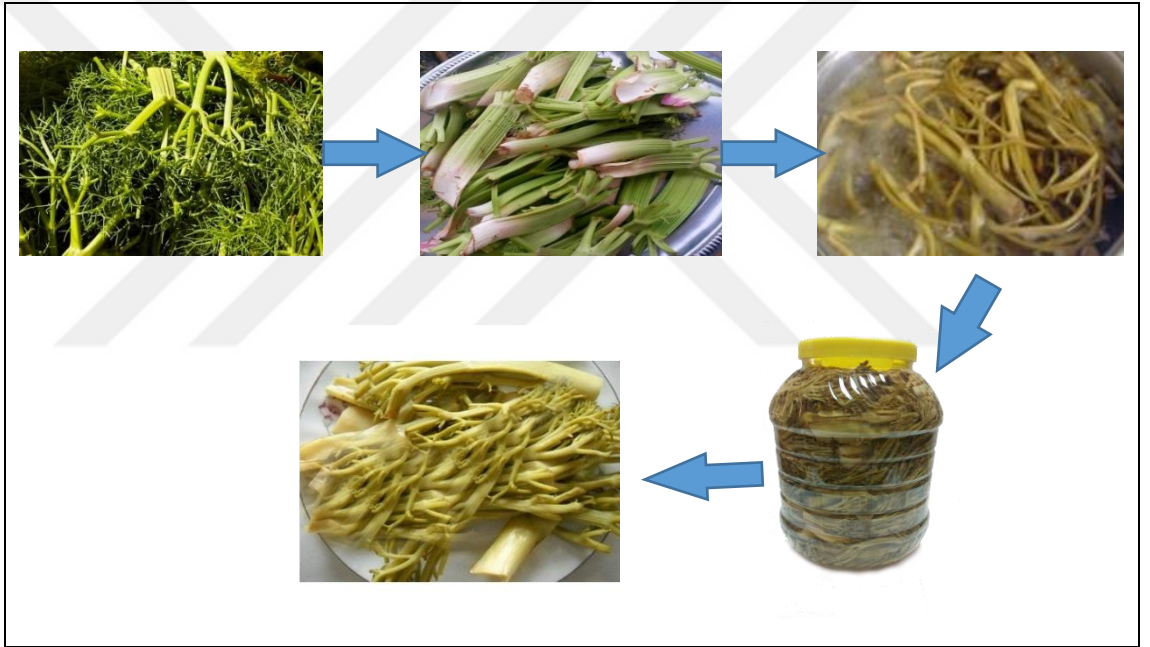
3.3. Analizlerde Kullanılan Cihaz ve Aletler

| Cihaz/Alet Adı | Marka, Model, Ülke |
|--------------------------------------|---|
| Buzdolabı | Arçelik 5231NF, Türkiye |
| Çalkalamalı Termostatlı Su Banyosu | JSR, JSSB-30T, Korea |
| Çalkalayıcı | Heidolph Titramax 100, Germany |
| Çoklu Çalkalayıcı | Orbital Shaker SSL1, UK |
| Derin Dondurucu | Arçelik, Türkiye |
| Flovsitometre | Cyflow® cube 6, |
| Ultra Dondurucu | NuAire 9483- 86 °C, US |
| a Derin Dondurucu | |
| Distilatör | Mega Home MH943, UK |
| Etüv | Binder B28,Germany |
| GC-MS | Perkin Elmer Clarus 500 |
| Hassas Terazı | Denver Instrument TP214, Germany |
| ICP-MS | Agilent 7800, UK |
| Isıtıcı Manto | MTops MS-E107, Korea |
| İnvert Floresan Mikroskop ebq100-04 | Leica ebq 100-04, Germany |
| LC-MS/MS | Shimadzu LC-MS 8050, Japan |
| Liyofilizatör | Operon FDU-8612, Korea |
| Magnetik Karıştırıcı | Hanna Instruments HI 190M-1, UK |
| Mc Farland Densitometre | DEN-1 Biosan, Latvia |
| Mikro Plaka Okuyucu Spektrofotometre | Biotek Instruments Inc.VT05404-0998,USA |
| Mikrodalga Yakma Sistemi | Milestone Ethos up SK-15 |
| Otomatik Pipetler | Eppendorf, UK |
| Parçalayıcı | Waring HGB2WTS3, USA |
| Plaka Çalkalayıcı | MS2-Minishaker, IKA, Labortechnik, Staufen, Germany |
| Quartz Küvetler | Hellma, UK |
| Renk Ölçer | Konica Minolta CR-400, Korea |
| Rotary Evaporatör | Heidolph Laborata 4000, Germany |
| Santrifüj | Beckman Coulter Allegra X-30R, USA |
| Steril Filtre (0,20 µm) | Corning, Wiessbaden, Almanya |
| Steril Kabin | Class I, Hepa Filtreli |
| Su Isıtmalı CO2'li İnkübatör | Thermo Scientific, USA |
| Otoklav | Lisa 300B, Italy |
| Ultra Saf Su Cihazı | Minipure Destup, Korea |
| Ultrasonik Banyo | Bandelin Sonorex Super RK 103H, Germany |
| Vis-Spektrofotometre | PG Instruments T60V, UK |
| Vorteks | Heidolph D-91126, Germany |

3.4. Metot

3.4.1. aşırların salamura edilmesi

Bitkinin halk arasında tüketildiği şekildeki etkisinin değerlendirilebilmesi için aşırlar toplandıktan sonra ev tipi yöntemle salamura edilmiştir (endüstriyel bazda salamura aşır üretimi yoktur). Toplama aşamasının ardından salamura aşır üretimine kadar gerçekleştirilen uygulamalar Şekil 3.2’de görülmektedir.

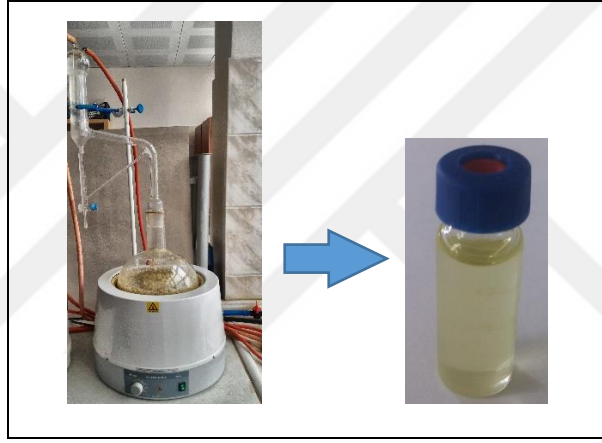


Şekil 3.2. aşır bitkisinden salamura aşır retimi

Salamura işlemi için öncelikle hasadı izleyen 6-8 saat içerisinde laboratuvara getirilmiş ve $4\pm 1^\circ\text{C}$ ’de muhafaza edilmiş olan aşırlar yaprak kısımları koparıldıktan sonra toz, toprak ve yabancı unsurlardan arındırmak amacıyla yıkanmıştır. Ardından bitkideki acı tadı yok etmek için, dokuda yumuşama olana kadar (~15 dk) kaynayan suda haşlanmıştır. 48 saat boyunca her 4 saatte bir suyu değiştirilmek suretiyle soğuk suda bekletilen haşlanmış aşırlar plastik ambalajlara yerleştirilerek üzerlerine Bome derecesi 9’a ayarlanmış tuzlu su ilavesi yapılmıştır. 10 gün sonra salamuraların Bome derecesi 20°C ’de 7 olarak ölçülmüş ve bu değerde sabitlenmiştir.

3.4.2. Esansiyel yağ eldesi

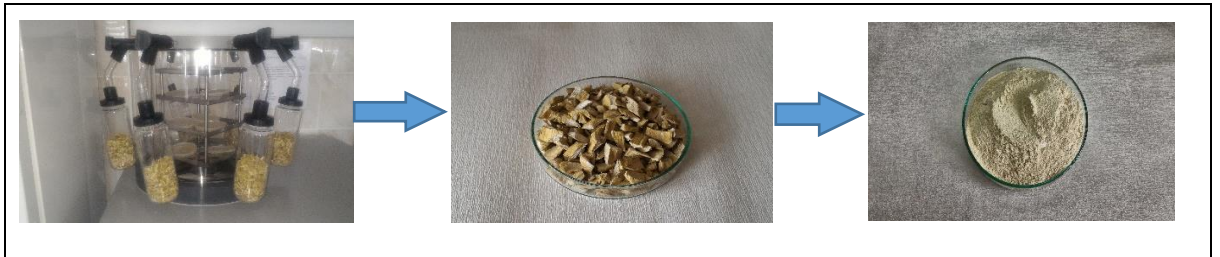
Esansiyel yağ elde etmek için, Clevenger-tip aparatlar kullanılmış ve parçalayıcı yardımıyla 1 dk hızlı devirde parçalanarak püre haline getirilmiş salamura çadır ile 1:1 hacimde su karıştırılarak elde edilen karışım düzeneğe bağlanmıştır. Sistemde taşmanın engellenmesi için 1 mm çaplı cam boncuk ve silikon köpüklenmeyi önleyici kullanılmıştır. Esansiyel yağ eldesi yaklaşık 3 saatte gerçekleşmiştir. Elde edilen esansiyel yağlar analiz edilinceye kadar sızdırmaz viallerde -20°C 'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. Clevenger düzeneği ve çadır bitkisine ait esansiyel yağ

3.4.3. Liyofilizasyon

Çaşırlar, çelik bir bıçak yardımıyla küçük parçalara bölünerek; 10^{-3} mTorr basınç ve -86°C 'de liyofilize edilmişlerdir.



Şekil 3.4. Salamura çaşırların liyofilizasyonu ve toz haline dönüşümü

3.4.4. Ekstraktların hazırlanması

Ekstraksiyonda kullanılan çözücülerden su, etanol ve metanol polar özellik gösterirken, kloroform ve n-hekzan apolar özelliktedir. Çözücülere ait bazı fiziksel özellikler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Klasik ve ultrasonik ekstraksiyonda kullanılan çözücülere ait bazı fiziksel özellikler

| Bileşik | Empirik Formül | Kaynama Noktası (°C) | Erime Noktası (°C) | Dinamik Viskozite mPa.s 20 °C 40 °C | Yoğunluk (g/cm ³) | Suda Çözünürlük (g/100g) | Polarite İndeksi | Dielektrik Sabiti (DK) (20/25 °C) | Dipol Momenti (D) |
|-----------|---------------------------------|----------------------|--------------------|--|-------------------------------|--------------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Su | H ₂ O | 100,00 | 0,00 | 0,95 0,65 | 0,998 | K | 9,0 | 80,6 | 1,85 |
| Etanol | C ₂ H ₆ O | 78,5 | -114,1 | 1,20 0,83 | 0,789 | K | 5,2 | 24,3 | 1,70 |
| Metanol | CH ₃ OH | 64,6 | -98 | 0,52 0,45 | 0,791 | K | 6,6 | 32,6 | 1,70 |
| Koroform | CHCl ₃ | 61,2 | -63,5 | 0,56 0,47 | 1,498 | 0,8 | 4,4 | 4,8 | 1,01 |
| n- Hekzan | C ₆ H ₁₄ | 69 | -95 | 0,31 0,26 | 0,655 | 0,0014 | 0,0 | 1,9 | 0,0 |

* K: Karışabilir

** Veriler Reichardt (2003)’den alınmıştır.

3.4.4.a. Klasik ekstraksiyon

Liyofilize toz çışırlardan su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının hazırlanması için 5 grup halinde tartılan 50’şer g liyofilize toz çışıır üzerine ayrı ayrı; 500’er ml; su, 1:1 etanol: su (v/v), 1:1 metanol: su (v/v), kloroform ve n-hekzan ilave edilmiş ve amber renkli şişeler içerisinde 40°C’de 20 saat çalkalamalı su banyosunda 90 rpm’de karıştırılmıştır. Ardından kaba filtre kağıdı yardımıyla süzülen ekstraktlar 4500 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı alınarak rotary evaporatör yardımıyla 40°C 150 rpm’de konsantre edilmişlerdir. Sıvı azot ile muamele edilerek dondurulan ekstraktlar 10⁻³ mTorr basınç ve -86°C’de liyofilize edilmiştir. Liyofilize ekstraktlar analizler yapılarına kadar -20°C’de karanlıkta muhafaza edilmiştir. İşlem 3 kere tekrar edilmiştir.

3.4.4.b. Ultrasonik ekstraksiyon

Liyofilize toz çışırlardan ultrasonik su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının hazırlanması için Oniszczuk and Podgórski (2015) tarafından belirtilen

ekstraksiyon yöntemi bazı modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Bu amaçla, 5 grup halinde tartılan 50'şer g liyofilize toz çadır üzerine sırasıyla 500'er ml; su, 1:1 etanol: su (v/v), 1:1 metanol: su (v/v), kloroform ve hekzan ilave edilmiş ve amber renkli şişelere konulmuştur. 35 kHz frekansta çalışan ultrasonik banyonun sıcaklığı $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuş ve ekstraktlara 4 kere; 20 dk ultrason + 20 dk dinlendirme işlemi uygulanmıştır. Ardından süzülen ekstraktlar 4500 rpm'de 15 dk boyunca santrifüjlenmiş ve supernatant kısmı alınarak rotary evaporatör yardımıyla 40°C 150 rpm'de konsantre edilmiştir. Sıvı azot ile dondurulan ekstraktlar 10^{-3} mTorr basınç ve -86°C 'de liyofilize edilmiştir. Liyofilize ekstraktlar analizler yapılana kadar -20°C 'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. İşlem 3 kere tekrar edilmiştir.

Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen ekstraktlara ait kodlamalar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Ekstraktlara ait kodlamalar

| Muamele | Ekstraktlar | Kod |
|-------------------------|-----------------------|------------|
| Klasik Ekstraksiyon | Su | KSE |
| | Etanol:su (1/1: v/v) | KESE |
| | Metanol:su (1/1: v/v) | KMSE |
| | Kloroform | KKE |
| | Hekzan | KHE |
| Ultrasonik Ekstraksiyon | Su | USE |
| | Etanol:su (1/1: v/v) | UESE |
| | Metanol:su (1/1: v/v) | UMSE |
| | Kloroform | UKE |
| | Hekzan | UHE |

3.4.5. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması

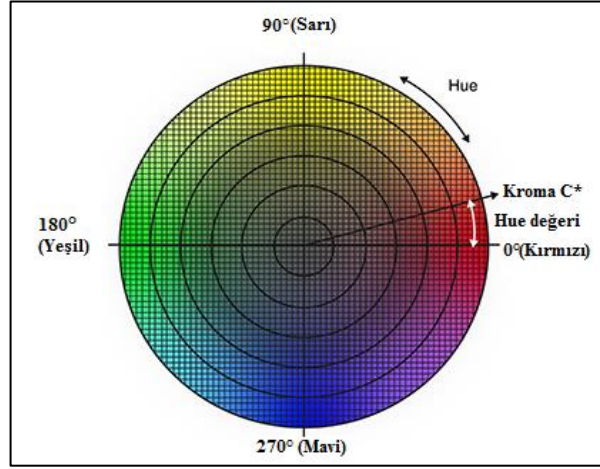
Esansiyel yağ ile klasik ve ultrasonik ekstraksiyon ile elde edilen tüm ekstraktlara ait ekstraksiyon verimi aşağıdaki Eşitlik (1) yardımı ile hesaplanmıştır (Bayar *et al.* 2017):

$$\% \text{Ekstraksiyon Verimi} = (W_1/W_2) \times 100 \quad (3.1)$$

Burada; W_1 ; Ekstraksiyon sonrası ağırlık, W_2 ; Ekstraksiyon öncesi toplam ağırlıktır.

3.4.6. Renk yoğunluğu

Gıdaların optik özellikleri oldukça karmaşıktır ve gıdanın kimyasal bileşimi ile yüzey dokusuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Optik özelliklerden biri olan renk; ışığın spektral dağılımı sonucu oluşan görsel bir özelliktir. Bir karışımdaki mevcut her bir renk oranı bir kesir olarak ifade edilecek olursa, bir renk alanı x ve y koordinatlarından oluşan iki boyutlu bir kromasite diyagramına dönüşmektedir (Eissa *et al.* 2010). Gıdalarda renk belirleme amacıyla kullanılan alternatif bir yöntem olan yüzeysel yansımalarının ölçülmesi de temelde bu esasa dayanmaktadır. Yüzey yansımalarının ölçülmesi prensibi ile çalışan kolorimetre, 3 boyutlu alanda rengi bir nokta olarak tanımlamamıza yardımcı olan bir sistemdir. Bu sistemde L^* değerleri parlaklık (0;siyah- 100; beyaz); a^* değeri yeşillik-kırmızılık (-60; yeşil- +60; kırmızı), b^* değeri ise mavilik- sarılık (-60; mavi- +60; sarı) ifadesi olup x ve y eksenlerinde gösterilmektedirler (Luo 2006). Rengin ifade edilmesinde kullanılan farklı bir renk bileşeni de Hue (H°) derecesidir ve x ile y eksenlerini 360° 'lik açı ile çevrelemektedir. Kırmızı, sarı, yeşil, mavi ve kırmızı renkler sırasıyla; 0° , 90° , 180° , 270° ve 360° açılarda konumlanmıştır (Izlı and Isık 2014). Rengin yoğunluk veya matlık özelliğini belirten ve Hue değerinden bağımsız olan kroma (C^*) değeri ise; merkez ile H° arasındaki cetvelin değeri (value) ile yaptığı açıdır (Romney and Fulton 2006) ve 0 ile 60 arasında değişmektedir (Şekil 3.5). ΔE ise toplam renk farkı olarak ifade edilmektedir.



Şekil 3.5. CIE renk sisteminde Hue ve Kroma değerleri (Konica Minolta 2003)

Salamura çadır, ekstraktlar ve esansiyel yağın renk yoğunlukları, CIE ($L^*a^*b^*$) sisteminde üç boyutlu ölçüm yapan Minolta kolorimetre kullanılarak belirlenmiştir. Cihaz kullanılmadan önce, beyaz kalibrasyon plakası yardımıyla kalibre edilmiş ve ardından örneklerin renk ölçümleri beyaz bir zemin üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar; L^* (parlaklık:100, koyuluk:0), a^* (kırmızı:+, yeşil: -), b^* (sarı: +, mavi: -), H° (0° , 90° , 180° , 270° ve 360°)'lik açılarda sırasıyla; kırmızı, sarı, yeşil, mavi ve kırmızı konumlanmıştır), C^* (kroma, renklerin doygunluk derecesi) ve ΔE (toplam renk farkı) parametrelerine göre değerlendirilmiştir. Ölçümler her bir örnek için 3 kere tekrarlanmıştır. C^* , H° ve ΔE değerlerinin hesaplanmasında 2, 3 ve 4 nolu eşitlikler kullanılmıştır (Topdas 2012).

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3.2)$$

$$H^\circ = \arctan(b^*/a^*) \quad (3.3)$$

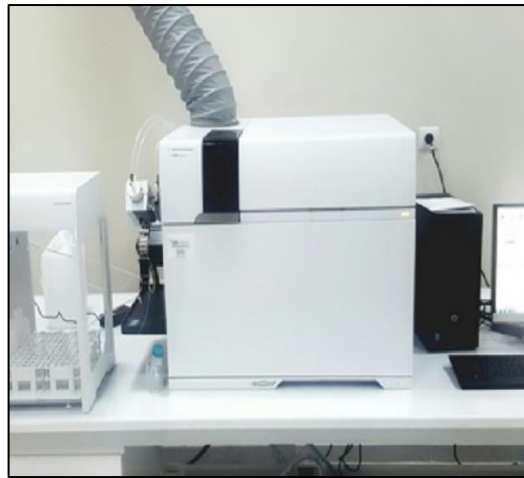
$$\Delta E = \pm(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad (3.4)$$

3.4.7. ICP/MS ile mineral madde kompozisyonunun belirlenmesi

Estraktlar, esansiyel yağ ve hücre sıvılarına ait mineral madde analizleri için öncelikle teflon tüpler içerisine 3'er paralelli olarak yaklaşık 500 mg örnek tartılmış ve üzerine 8 ml %65'lik HNO₃ ile 2 ml %31'lik H₂O₂ ilave edilerek 15-20 dakika beklenmiştir. Daha sonra kapakları kapatılan teflon tüpler mikrodalga sisteminde aşağıdaki koşullarda yağ yakma işlemine tabi tutulmuştur:

| Adım | Süre (dk) | Sıcaklık (°C) | Güç (W) |
|------|-----------|---------------|---------|
| 1 | 15 | 200 | 1800 |
| 2 | 15 | 200 | 1800 |

Yakma aşamasından sonra teflon tüp içerikleri ultra saf su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve ardından 0,45 µm'lik membran filtreden geçirilmiştir. Örneklerin çözündürülmesinde %2'lik HNO₃ ve %0,5'lik HCl kombinasyonu kullanılmıştır. 500 µl örnek, 9,5 ml kombine çözelti ile seyreltilmiştir. Her bir element için hazırlanan standart çözelti (Hg için 0, 2.5, 5, 7.5 ve 10 ppb; diğer elementler için 0, 10, 25, 50, 100, 250 ve 500 ppb konsantrasyonlarda) İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi cihazında okutulup, standartlara karşı ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak örneklerdeki kalıntı element miktarları tesbit edilmiştir (Anonymous 2007).



Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan indüktif olarak eşleştirilmiş plazma - kütle spektrometresi (ICP-MS)

3.4.8. Esansiyel yağ ve ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesi

Esansiyel yağ ve ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı Folin & Ciocalteu reaktifi kullanılarak Singleton *et al.* (1999)'a göre belirlenmiştir. Ekstraktların her biri kendi çözücüsünde, esansiyel yağ ise etanolde çözüldürülerek 1 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlanmıştır. 1000 µg stok çözelti alınarak ultra saf su ile 23 ml'ye tamamlanmıştır. Karışım üzerine 0,5 ml Folin&Ciocalteu reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltilisinden 1,5 ml ilave edilmiş ve 2 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta karıştırıldıktan sonra absorbanslar 760 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur. Gallik asit standart fenolik bileşik olarak kullanılmış ve hazırlanan standart grafik yardımıyla sonuçlar µg GAE (Gallik Asit Ekvivaleni)/mg ekstrakt olarak verilmiştir. Analiz her bir örnek için 3 kere tekrarlanmıştır.

3.4.9. Esansiyel yağ ve ekstraktların toplam flavonoid bileşik miktarlarının belirlenmesi

Esansiyel yağ ve ekstraktlarda toplam flavonoid bileşik miktarı Park *et al.* (1997)'a göre belirlenmiştir. Ekstraktların her biri kendi çözücüsünde, esansiyel yağ ise etanolde çözüldürülerek 1mg/ml konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlanmıştır. 1000 µg stok çözelti alınarak 0,1'er ml; 1 M CH₃COOK ve %10'luk Al(NO₃)₃ çözeltilerini içeren 4,3 ml etanol çözeltisi ile seyreltilmiştir. 40 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta karıştırıldıktan sonra absorbanslar 415 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur. Kuersetin standart flavonoid bileşik olarak kullanılmış ve hazırlanan standart grafik yardımıyla sonuçlar µg KE (Kuersetin Ekvivaleni) olarak verilmiştir. Analiz her bir örnek için 3 kere tekrarlanmıştır.

3.4.10. Ekstraktların fenolik bileşen profilinin belirlenmesi

Ekstraktların fenolik bileşenleri, Shimadzu 8050 LC-MS/MS cihazında analiz edilmiştir. Analizde 3 µm partikül boyutlu, L×I.D. 15 cm × 4.6 mm (Supelco) ODS-4 kolon

kullanılmıştır. Mobil faz olarak 5 µM amonyum asetat ve %0.1 formik asit içeren deiyonize su (A) ve metanol (B) kullanılmıştır.

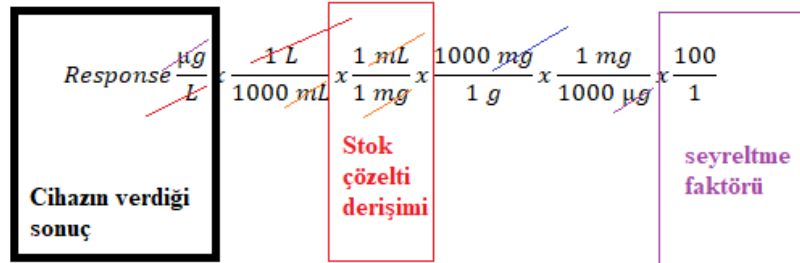
Mobil faz programı; 0-8 dk aralığında 95:5 A:B'den 5:95 A:B'ye lineer gradiyent, 8-12 dk 5:95 (A:B)'de 12-15 dk 95:5 A:B ve mobil faz akış hızı 0.4 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Çalışma boyunca kolon sıcaklığı 35°C'de tutulmuştur. Nebuluzer gaz akışı 3 L/dk, kurutucu gaz akışı 10 L/dk, dedektör sıcaklığı 300°C, hava bloğu sıcaklığı 400°C şeklinde ayarlanmıştır. Moleküllerin iyonlaştırılmasında ESI (Elektrosprey iyonlaşma) ve APCI (Atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma) iyonlaştırıcılar kullanılmıştır.

Moleküllerin tanımlanmasında MRM (Çoklu reaksiyon görüntüleme) modu kullanılmıştır. Kolonsuz olarak her bir fenolik madde için MRM optimizasyonu yapıldıktan sonra standartların 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ppb derişimlerini içeren karışım analiz edilerek kalibrasyon eğrileri çizilmiştir.

Ekstraktar 1 mg/mL derişimleri hazırlanarak 1/100 oranında seyreltilerek analiz edilmiş ve sonuçlar mg fenolik/ gr ekstrakt olarak hesaplanmıştır.

Çevirme faktörü:

$$Response \frac{\mu g}{L} \times \frac{1 L}{1000 mL} \times \frac{1 mL}{1 mg} \times \frac{1000 mg}{1 g} \times \frac{1 mg}{1000 \mu g} \times \frac{100}{1}$$



3.4.11. Antioksidan aktivite

3.4.11.a. Esansiyel yağ ve ekstraktların DPPH• serbest radikal giderme ativitesinin belirlenmesi

Esansiyel yağ ve ekstraktların DPPH• serbest radikal giderme aktiviteleri Balaydın *et al.* (2010)'a göre yapılmıştır. DPPH•'ın etanolde hazırlanan 1 mM'lık çözeltisi hazırlanarak serbest radikal çözeltisi olarak kullanılmıştır. Daha önce 3.4.8.1 ve 3.4.8.2 nolu bölümlerde de bahsedilen 1mg/ml konsantrasyonlu stok ekstrakt çözeltileri bu analizde de numune olarak kullanılmıştır. 3'er paralelli olacak şekilde sporlara dizilen deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyon oluşturulacak şekilde stok ekstrakt çözeltilerinden aktarıldıktan sonra toplam hacim etanol ile 3 ml'ye tamamlanmıştır. Stok DPPH• çözeltisinden her bir tüpe 1'er ml ilave edildikten sonra vortekslenmiş ve karanlıkta yarım saat inkübasyona bırakılmışlardır. Absorbanslar 517 nm dalga boyunda köre karşı ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Azalan absorbans değerleri kalan DPPH• çözeltisi miktarını veya farklı bir deyişle serbest radikal giderme aktivitesini vermiştir. Kontrol: 3 ml etanol ve 1 ml DPPH• çözeltisinden oluşmaktadır.

BHA, BHT, Troloks, α-tokoferol, klasik ve ultrasonik ekstraktlar ile esansiyel yağ 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarda içeren çözeltilerin 517 nm dalga boyunda belirlenen absorbans değerleri kullanılarak Eşitlik (3.1) yardımıyla % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

$$\%İnhibisyon = [(A_{DPPH} - A_{EKSTRAKT}) / A_{DPPH}] \times 100 \quad (3.5)$$

Burada, A_{DPPH} ; DPPH şahit örneğinin absorbans değeri ve $A_{EKSTRAKT}$; Örnek ekstraktının absorbans değerini ifade etmektedir.

Belirlenen %inhibisyon değerlerine karşı örnek konsantrasyonları bir grafiğe aktarılmış ve lineer regrasyon analizi uygulanarak örneklere ilişkin eğriler ve denklemlerine

ulaşılmıştır. Eşitlikler yardımıyla örnekler ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri (radikalin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon) hesaplanmıştır.

3.4.11.b. Esansiyel yağ ve ekstraktların ABTS^{•+} giderme ativitesinin belirlenmesi

Esansiyel yağ ve ekstraktların ABTS^{•+} radikali giderme aktiviteleri Köksal *et al.* (2009)'a göre yapılmıştır. ABTS^{•+} radikalleri; saf su ile 2 mM konsantrasyonda hazırlanan ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) çözeltisine, 2,45 nM potasyum persülfat çözeltisinin ilavesiyle 1 gece oda sıcaklığında ve karanlıkta karıştırarak üretilmiştir. 1 mg/ml konsantrasyonlu stok ekstrakt çözeltiler bu analizde de numune olarak kullanılmıştır. 3'er paralelli olacak şekilde deney tüplerine 10, 20 ve 30 µg/µl konsantrasyon oluşturulacak şekilde stok ekstrakt çözeltilerinden aktarıldıktan sonra toplam hacim etanol ile 1,5 ml'ye tamamlanmış ve her bir tüpe 0,5'er ml ABTS^{•+} çözeltisi ilave edilmiştir. Vortekslenip oda sıcaklığında ve karanlıkta yarım saat inkübe edilen numunelerin absorbansları 734 nm dalga boyunda köre karşı kaydedilmiştir. Kontrol: 1,5 ml etanol+ 0,5 ml ABTS^{•+} çözeltisinden oluşmaktadır.

BHA, BHT, Troloks, α-tokoferol, klasik ve ultrasonik ekstraktlar ile esansiyel yağı 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarda içeren çözeltilerin 734 nm dalga boyunda belirlenen absorbans değerleri kullanılarak Eşitlik (3.3) yardımıyla % inhibisyon değerleri belirlenmiştir.

$$\%İnhibisyon = [(A_{ABTS} - A_{EKSTRAKT}) / A_{ABTS}] \times 100 \quad (3.6)$$

Burada, A_{ABTS}; ABTS^{•+} şahit örneğinin absorbans değeri ve A_{EKSTRAKT}; Örnek ekstraktının absorbans değerini ifade etmektedir.

Belirlenen %inhibisyon değerlerine karşı örnek konsantrasyonları bir grafiğe aktarılmış ve lineer regrasyon analizi uygulanarak örneklere ilişkin eğriler ve denklemlerine ulaşılmıştır. Eşitlikler yardımıyla örnekler ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri (radikalin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon) hesaplanmıştır.

3.4.11.c. Esansiyel yağ ve ekstraktların Cu^{2+} - Cu^+ indirgeme kapasitesinin belirlenmesi (Kuprak Metodu)

Esansiyel yağ ve ekstraktların Cu^{2+} indirgeme aktiviteleri Ak and Gülçin (2008)'e göre yapılmıştır. 3'er paralelli olacak şekilde sporlara dizilen deney tüplerine 10, 20 ve 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyon oluşturulacak şekilde stok ekstrakt çözeltilerinden aktarıldıktan sonra toplam hacim ultra saf su ile 1,25 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından deney tüplerine sırasıyla; 0,01 M CuCl_2 çözeltisinden 0,25 ml, $7,5 \times 10^{-3}$ M etanolik neokuprin çözeltisinden 0,25 ml ve 1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tampon çözeltisinden 0,25 ml ilave edilerek vortekslenmiş ve oda sıcaklığında karanlıkta yarım saat inkübe edilerek 450 nm dalga boyunda köre karşı okunan absorbans değerleri kaydedilmiştir.

3.4.12. *Ferula orientalis* L. bitkisinin uçucu yağ kompozisyonunun belirlenmesi

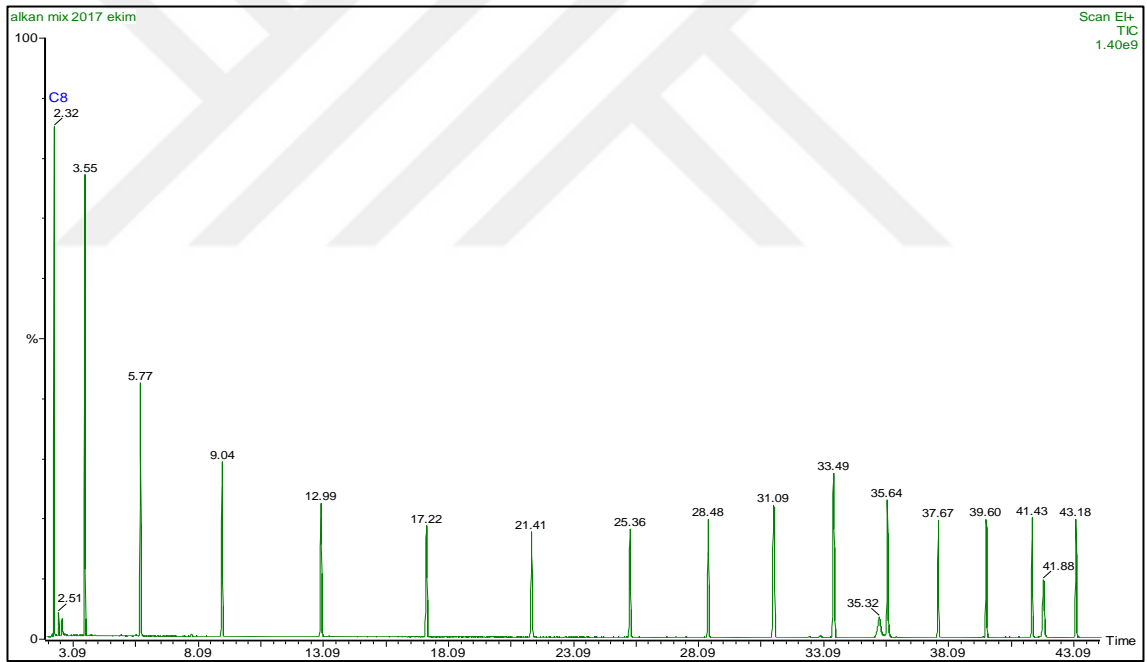
Clevenger-tip aparatlar kullanılarak hidro distilasyon yöntemi ile elde edilmiş esansiyel yağ GC-MS cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz öncesi 20 mg esansiyel yağ 1,2 mL aseton içinde seyreltilmiştir. Tespit edilen 35 uçucu bileşen, toplam uçucu yağ bileşenlerinin %96,29'unu oluşturmaktadır.

Analiz, Perkin Elmer Clarus 500 GC-MS ile BPX 5 (30m, 0,25mm ID, film kalınlığı 0,25 μm) kapiler kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 1 μL , injeksiyon portu sıcaklığı ise 250°C olarak ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak, 50:1 split oranı ve 1 mL/dk akış hızı ile helyum kullanılmıştır. Fırın programı; 50°C 'den başlanarak $3^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızı ile 210°C 'ye ve ardından $3^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızı ile 250°C 'ye çıkarılmıştır. Toplam program süresi 30 dk olarak belirlenmiştir. Uygulanan MS parametreleri ise; iyonlaştırıcı: EI (elektron impact), iyonlaştırıcı enerjisi: 70 eV, iyon kaynağı sıcaklığı; 250°C şeklindedir.

Bileşenlerin aydınlatılmasında; Çözücünün kolonda alıkonma süresinin alkan karışımını içeren standardın her bir bileşeninin kolonda alıkonma süreleri (retention time)'nden çıkarılması ile gerçek alıkonma süresinin hesaplanması ve aynı işlemin uçucu yağlar

içinde gerçekleştirilmesi prosedürü uygulanmıştır (RI değerlerinin hesaplanmasında kullanılan alkan karışımına ait kromatogram Şekil 3.7’de görülmektedir). Bileşenlerin tespitinde numune bileşenlerinin alıkonma sürelerinin literatürde verilen kovats index ya da retention index (RI) değerleri ile karşılaştırılması ve bileşenlerin spesifik kütle spektrumlarının dijital ortamda mevcut MS kütüphanelerindeki (NIST, Willey ve Pflger) veriler ile karşılaştırılması ile yapılmıştır.

Bileşenlerin uçucu yağ içindeki göreceli yüzdeleri ise; Turbomass ver 5.4.2 yazılımı ile her bir bileşenin pik alanlarının toplam pik alanına oranının yüz ile çarpılması ile kalitatif olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. Uçucu yağ kompozisyonunun belirlenmesinde kullanılan alkan karışımını içeren kromatogram

3.4.13. Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivitenin tesbitinde kullanılan test mikroorganizmaları Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu’ndan temin edilmiştir (Çizelge 3.3).

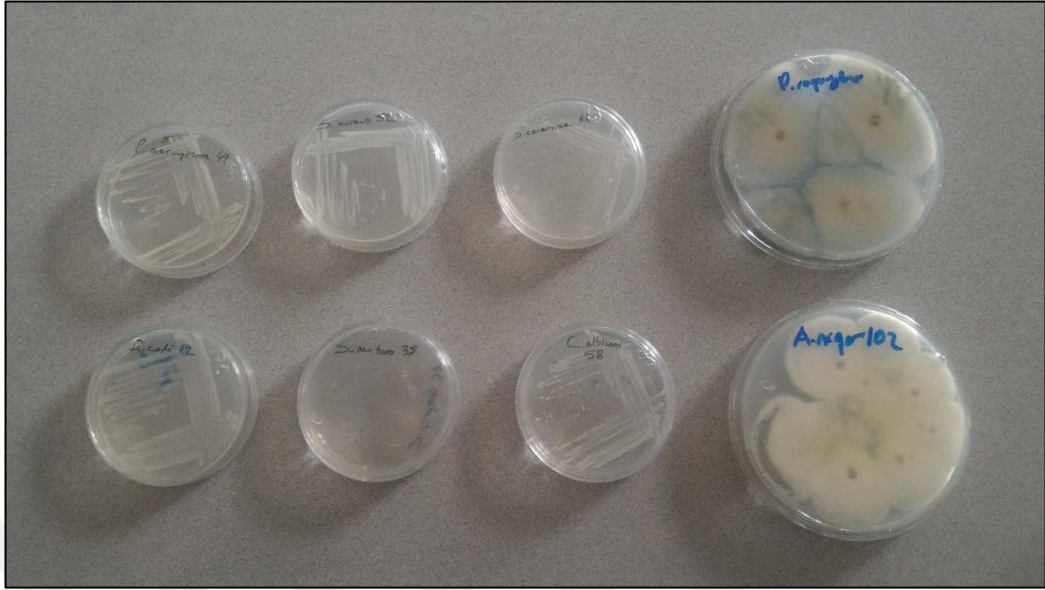
Çizelge 3.3. Antimikrobiyal aktivite analizinde kullanılan test mikroorganizmaları

| Tür Adı | Suş Kodu |
|---------------------------------|-----------------|
| <i>Escherichia coli</i> | BC 1402 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 9027 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 29213 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | ATCC 35668 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | BC 6541 |
| <i>Candida albicans</i> | ATCC 1223 |
| <i>Aspergillus niger</i> | ATCC 16888 |
| <i>Penicillium roqueforti</i> | BC 111 |

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların tanısı Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (Sherlock Microbial Identification System version 4.0, MIDI Inc., Newark, DE, USA), BIOLOG (MicroStation™ ID System, Biolog Inc., Hayward, CA, USA) ve Holt et al (1994) ve klasik tanımlama testleri ile doğrulanmıştır. Denemede kullanılan 8 farklı suşun 2 Gram (-) bakteri, 2 Gram (+) bakteri, 2 maya ve 2 küften oluşması sağlanmış, böylece farklı hücre tiplerine etki incelenmiştir.

3.4.13.a. Bakteri, maya ve küf izolatlarının geliştirilmesi

Tamamı -80°C'de muhafaza edilen saf bakteri izolatları Plate Count Agar (PCA) besiyerine; saf maya ve küf izolatları ise Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerine öze yardımıyla çizilmiştir. Çizim sonrası bakteriler; 30°C'de 24-48 saat, mayalar; 30°C'de 24-48 saat, küfler ise 30°C'de 72-96 saat süre ile inkübe edilmiştir. Gelişim sonunda yapılan reizolasyon işlemleri ile saf kültürler tazelenmiştir. Taze kültürler (Şekil 3.8), 9'ar ml'lik tüplerde hazırlanan %0,85'lik steril fizyolojik tuzlu su çözeltileri içerisinde seyreltilerek densitometre yardımıyla standart yoğunlukta olmaları sağlanmıştır. Yoğunluk bakteriler için 1×10^6 kob/ml, maya ve küfler için 1×10^4 kob/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.8. Antimikrobiyal aktivite analizinde kullanılan bakteri, maya ve küflere ait saf izolatlar

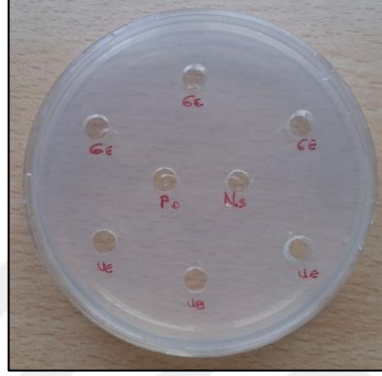
3.4.13.b. Esansiyel yağ, ekstrakt ve antibiyotiklerin dozlarının ayarlanması

Doz ayarlamaları daha önce yürütülmüş benzer çalışmaların sonuç bulguları ve kullanılacak dozun ekonomik olarak kullanılabilir olması gibi kriterler göz önünde bulundurularak yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmiştir. Belirlenmiş olan doz; esansiyel yağ ve diğer ekstraktlar için 300 µg/10 µl iken; Ofloxacin ve Amphotericin B için 5 µg/10 µl'dir. Çözücü olarak DMSO kullanılmıştır.

3.4.13.c. Kuyu difüzyon yöntemi

Antimikrobiyal etki denemelerinde Agar Kuyu Difüzyon Metodu kullanılmıştır (Altundağ 2007). Öncelikle bakteriler için hazırlanan nutrient agar ile mayalar ve küfler için hazırlanan potato dextrose agar besiyerlerine standart yoğunlukta hazırlanan 100'er µl bakteri, maya ve küf süspansiyonu steril drigalski spatülleri yardımıyla yayılmıştır. Ardından petrilere birbirine eşit mesafede olmasına dikkat edilerek ekstraktlar ve antibiyotikler için her biri 5 mm çapında olan toplam 8 kuyucuk açılmıştır. Ortada bulunan kuyucuklara 100 µl pozitif kontrol (bakteriler için Ofloxacin, maya ve küfler için

Amphotericin B) ve 100 µl negatif kontrol (steril saf su) konurken etraftaki kuyucuklara aynı ekstraktın klasik ve ultrasonik muamelesinden 100'er µl konmuştur. Denemeye ait kuyu difüzyon testinin yapıldığı bir petri kabı Şekil 3.9'da görülmektedir. Denemeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. Petri deneme planı

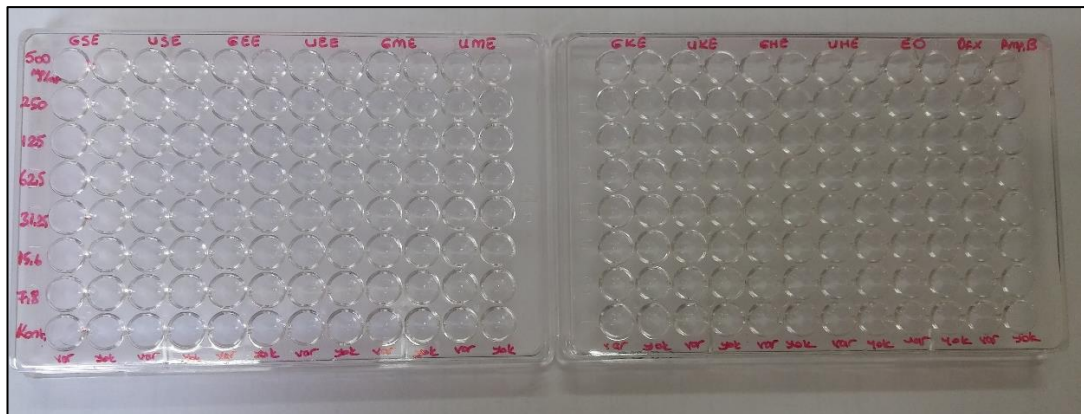
(P₀:pozitif kontrol, N_s: negatif kontrol, G_E: Klasik muamele, U_E: Ultrasonik muamele)

Ekstraktlar kuyucuklara ilave edildikten sonra bakteri ekilen petriler 30°C'de 24-48 saat; maya ekilen petriler 30°C'de 24-48 saat, küf ekilen petriler ise 30°C'de 72-96 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda 5 mm çaplı kuyucuklar etrafındaki zon çapları ölçülmüş (kuyucuk çapı dahil olarak) ve mm cinsinden kaydedilmiştir. Ölçümler her bir mikroorganizma için 3'er defa tekrarlanmıştır. Ölçümlerin ortalamaları alınarak standart sapma değerleri ile beraber verilmiştir.

3.4.13.d. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmesi

Mikro kuyucuk seyreltme yöntemi Cetin *et al.* (2010) yönteminde yapılan bazı modifikasyonlar ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriler için nutrient broth besiyeri, maya ve küfler için Sabouraud broth besiyeri hazırlanarak otoklavlanmış ve ardından en yüksek konsantrasyon 500 µg/ml olacak şekilde aşağıdaki işlemler her bir ekstrakt, esansiyel yağ, Ofloxacin ve Amphotericin B için tekrarlanmıştır;

1. 3 ml sıvı besiyeri içerisine 1500 µg örnek tartılarak vortekslenmiş ve içerisinden 1,5 ml'si alınarak elde edilen **500 µg/ml**'lik konsantrasyon ilk deneme konsantrasyonu olarak kullanılmıştır.
2. Kalan 1,5 ml 500 µg/ml konsantrasyondaki besiyeri üzerine 1,5 ml sıvı besiyeri eklenerek vortekslenmiş ve içerisinden 1,5 ml'si alınarak **250 µg/ml**'lik konsantrasyon elde edilmiştir.
3. Kalan 1,5 ml 250 µg/ml konsantrasyondaki besiyeri üzerine 1,5 ml sıvı besiyeri eklenerek vortekslenmiş ve içerisinden 1,5 ml'si alınarak **125 µg/ml**'lik konsantrasyon elde edilmiştir.
4. Kalan 1,5 ml 125 µg/ml konsantrasyondaki besiyeri üzerine 1,5 ml sıvı besiyeri eklenerek vortekslenmiş ve içerisinden 1,5 ml'si alınarak **62,5 µg/ml**'lik konsantrasyon elde edilmiştir.
5. Kalan 1,5 ml 62,5 µg/ml konsantrasyondaki besiyeri üzerine 1,5 ml sıvı besiyeri eklenerek vortekslenmiş ve içerisinden 1,5 ml'si alınarak **31,25 µg/ml**'lik konsantrasyon elde edilmiştir.
6. Kalan 1,5 ml 31,25 µg/ml konsantrasyondaki besiyeri üzerine 1,5 ml sıvı besiyeri eklenerek vortekslenmiş ve içerisinden 1,5 ml'si alınarak **15,6 µg/ml**'lik konsantrasyon elde edilmiştir.
7. Kalan 1,5 ml 15,6 µg/ml konsantrasyondaki besiyeri üzerine 1,5 ml sıvı besiyeri eklenerek vortekslenmiş ve içerisinden 1,5 ml'si alınarak **7,8 µg/ml**'lik konsantrasyon elde edilmiştir.



Şekil 3.10. Tek mikroorganizmaya ait 96 kuyucuklu plaka deneme planı

MİK analizi, 96 adet kuyucuktan oluşan plakalarda yapılmıştır. Plakalarda tasarlanan deneme planı Şekil 3.10'da görülmektedir. Plakanın her bir kuyucuğuna; 140 µl besiyeri ve 10 µl bakteri, maya veya küf içeren inokülüm ilave edilmiş ve ardından steril bir plaka kapaticı yardımıyla kapatılan plakalar, çalkalayıcı yardımıyla 300 rpm'de 20 saniye karıştırılmıştır. Bakteri içeren plakalar 30°C'de 24-48 saat, maya içeren plakalar; 30°C'de 24-48 saat, küf içeren plakalar ise 30°C'de 72-96 saat süre ile inkübe edilmistir. İnkübasyon süresinin sonunda mikro plaka okuyucu yardımıyla 600 nm dalga boyunda mikrobiyal gelişim spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Şekil 3.12). Bulanıklık görülmeyen (absorbansın okunmadığı) en düşük doz MİK konsantrasyonu olarak değerlendirilmiştir. Ölçümler her bir mikroorganizma için 3'er kere tekrarlanmıştır.



Şekil 3.11. İnkübasyon sonrası 96 kuyucuklu plakalar

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0.518 | 0.454 | 0.973 | 1.045 | 0.883 | 0.777 | 0.748 | 0.713 | 0.128 | 0.124 | 0.183 | 0.163 |
| B | 0.347 | 0.484 | 0.605 | 0.562 | 0.791 | 0.828 | 0.502 | 0.526 | 0.122 | 0.111 | 0.124 | 0.17 |
| C | 0.525 | 0.499 | 0.388 | 0.427 | 0.71 | 0.883 | 0.323 | 0.378 | 0.334 | 0.321 | 0.137 | 0.105 |
| D | 0.741 | 0.786 | 0.687 | 0.962 | 0.801 | 0.84 | 0.589 | 0.471 | 0.491 | 0.516 | 0.165 | 0.131 |
| E | 0.729 | 0.74 | 0.756 | 0.785 | 0.852 | 0.878 | 0.86 | 0.889 | 0.245 | 0.266 | 0.161 | 0.154 |
| F | 0.602 | 0.755 | 0.694 | 0.696 | 0.668 | 0.856 | 0.807 | 0.809 | 0.692 | 0.676 | 0.117 | 0.125 |
| G | 0.613 | 0.714 | 0.77 | 0.75 | 0.585 | 0.779 | 0.798 | 0.872 | 0.842 | 0.68 | 0.154 | 0.144 |
| H | 0.513 | 0.089 | 0.603 | 0.077 | 0.681 | 0.119 | 0.675 | 0.088 | 0.698 | 0.075 | 0.769 | 0.077 |

Şekil 3.12. Antimikrobiyal aktivite ölçümlerine ait veri örneği

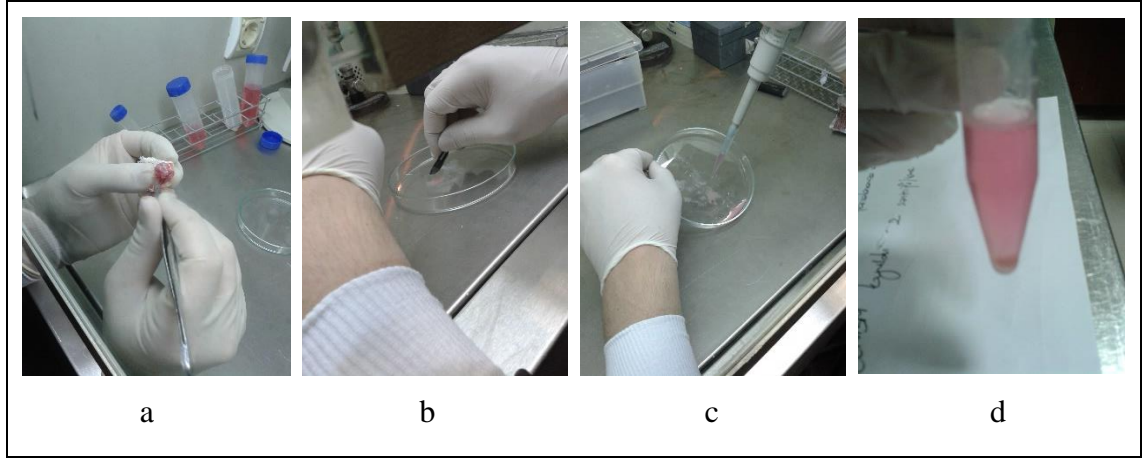
3.4.14. İn vitro nöroprotektif aktivite

İn vitro nöroprotektif aktivite analizinde kullanılacak ekstraktlar için birer stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti 500 mg ekstrakt (su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hexan) ile 500 ml DMSO'dan oluşmaktadır. Hazırlanan bu stok çözülden 1 ml alınıp 9 ml hüresel medyum ile karıştırılarak 10^{-1} 'lik doz hazırlanmıştır. Hüresel medyum 88/100 NBM (nöro bazal medyum), 1/10 FBS (fetal bovin serum), 1/1000 antibiyotik (Penisilin- Streptomisin- Amphotericin B) ve 1/50 oranında B27 suplament içermektedir. 10^{-1} 'lik dozdan 1ml alınıp 9 ml medyumla karıştırılarak 10^{-2} 'lik doz hazırlanmış ve işlem prosedürüne bu şekilde devam edilerek 10^{-1} - 10^{-5} 'lik dozlar hazırlanmıştır. Esansiyel yağ stok çözeltisi ise 800 µl esansiyel yağ, 100 µl DMSO ve 100 µl medyum karıştırılarak elde edilmiştir. 100 µl stok çözelti ile 900 µl medyum karıştırılarak 10^{-1} 'lik doz hazırlanmıştır. Bu dozdan 100 µl alınıp 900 µl medyum ile karıştırılarak 10^{-2} 'lik doz hazırlanmış ve işlem prosedürüne bu şekilde devam edilerek 10^{-1} - 10^{-8} 'lik dozlar hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. İn vitro nöroprotektif aktivite analizinde kullanılan dozlar

| Deney grupları | Doz Aralıkları |
|----------------------|------------------------------------|
| Kontrol | - |
| Glutamat kontrol (+) | 10 ⁻⁵ glutamat |
| KSE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| USE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| KESE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| UESE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| KMSE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| UMSE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| KKE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| UKE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| KHE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| UHE | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁵ |
| EY | 10 ⁻¹ -10 ⁻⁸ |

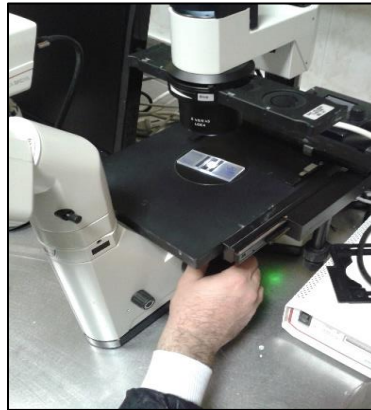
Ekstraktlar ile uygulanmış olan glutamata bağlı beyin hipoksi modeli için nöron hücre hattı oluşturulmuştur (Şekil 3.13). Nöron hücre hattını oluşturmak için gerekli olan korteksler henüz 24 saati doldurmamış 9 adet yeni doğan rat yavrusundan alınmıştır. Batikon ile yıkanan ratlar steril petri kabı içerisinde hızlı bir şekilde dekapite edilmiştir (Buyukokuroglu *et al.* 2003). Kafa kısmı gazlı bez içerisine alındıktan sonra ince makas yardımıyla sırasıyla deri ve kafatası açılmıştır. Korteks, beyin kaşığı ile alındıktan sonra 2 cc DMEM solüsyonunu içeren tüp içerisine konmuştur. Tüm korteksler toplandıktan sonra tüp içerisinde dibe çöken kısımlar petriye alınarak önce makro sonra mikro parçalama yapılmıştır. Makro parçalama aşamasında korteks, çift bistüri ile 20 dak boyunca hafif dokunuşlarla parçalanmıştır. Mikro parçalama aşamasında ise makro düzeyde parçalanmış korteks tekrar DMEM solüsyonuna alınmış ve üzerine 1/10 oranında tripsin EDTA ilave edilerek 15 dk 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübe edilmiştir (Sengül *et al.* 2011).



Şekil 3.13. Korteks bölgesinden nöron hücrelerinin elde edilme aşamaları

a- Beyin korteksinin çıkarılması, **b-** Primer nöronların bistüri ile makro düzeyde parçalanması, **c-** Primer nöronların tripsin EDTA ile mikro düzeyde parçalanması, **d-** Santrifüleme sonrası dibe çöken nöron hücreleri

İnkübasyon sonrası alınan hücreler 3 kere 1200 rpm'de 5 dk santrifürlenmiş ve her seferinde üstteki supernatant kısmı atılarak yerine yeni hücresel medyum eklenmiştir. 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 150 μ l hücresel medyum olacak şekilde ekim yapılmış ve her kuyucukta 5×10^4 hücre içerdiğinin tespiti toma lamıyla sayım yapılarak tespit edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Nöron hücrelerinin sayımı

Ekilen hücrelerin yeterli uzantılarla birbirlerine bağlanmaları için plakalar 37 °C'de %5 CO₂ içeren etüvde 10 gün inkübe edilmiştir. 10 gün süresince her 3 günde bir toplam 3 kere ½ oranında ana medyum atılarak yerine yeni medyum takviyesi yapılmıştır. 10. gün

sonunda yapılan analizler;

- MTT analizi (Sitotoksosite testi) ile hücre canlılıkları,
- Toplam antioksidan kapasitesi (TAK), toplam oksidan sayısı (TOS) ve hücrelerdeki oksidatif stresin varlığının tespiti,
- Hücreninlerin Ca^{+2} düzeyinin tespiti ve
- Apoptoz etkisinin değerlendirilmesidir.

3.4.14.a. Glutamat toksisitesi ile beyin hipoksi modelinin oluşturulması

Glutamat toksisitesini indüklemek için 10^{-4} mM L-glutamat steril koşullarda hazırlanmıştır. Yeterli uzantıya ulaşan hücrelerin sıvıları tamamen boşaltılmıştır. Dipte kalan hücrelerin üzerine ise, her kuyucuğa 10'ar μ l glutamat (10^{-4} mM) solüsyonu ilave edilerek 10 dk beklenmiş son konsantrasyon 10^{-5} mM olarak ayarlanmıştır. Toksikasyon modeli oluşturulduktan sonra ekstrakt grupları kuyucuklara 90'ar μ l olarak eklenmiştir.

Glutamatın toksisitesini görebilmek için deney gruplarında glutamat kontrol grubu oluşturulmuştur. Bu grupta sadece glutamat toksisitesi yapılarak canlılık oranının ne kadar değiştiği tesbit edilmiş ve diğer gruplarla kıyaslanmıştır. Bu grupta ise 90 μ l hücresel medyum ve 10 μ l 10^{-4} 'lük glutamat bulunmaktadır.

3.4.14.b. Ekstraktların uygulanması

- Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktların uygulanması

Nöron kültürüne ekstraktların uygulanabilmesi için ekstraktlara ait hazırlanan stok çözeltilerden 10^{-1} 'den 10^{-5} 'e kadar seyreltme yapılarak farklı konsantrasyonlarda deney grupları oluşturulmuştur. Ekstraktları uygulamadan önce kuyucuklardaki tüm medyum boşaltılmış ve yerine toplam hacim 100 μ l olacak şekilde deney grupları ilave edilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Nöroprotektif etkiyi farklı

yöntemlerle hazırlanan ekstraktlarda tespit etmek için 24 saat sonunda MTT analizi yapılmıştır.

- Esansiyel yağın uygulanması

Farklı yöntemlerle hazırlanan ekstraktların MTT sonuçları değerlendirilerek, esansiyel yağ ile yağ fazını çözen kloroform, etanol: su ve n-hekzan ekstraktlarının diğer gruplara göre daha fazla koruma gösterdiği tespit edildikten sonra nöroprotektif etken maddenin yağda daha fazla çözüldüğüne karar verilmiştir. Bu nedenle esansiyel yağda nöroprotektif etkinin MTT dışında TAK-TOS, Annexin V (flow sitometri) yöntemleri yardımıyla da araştırması planlanmıştır. Bu amaçla stok yağ çözeltisinden hazırlanan 10^{-1} 'den 10^{-8} 'e kadar farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kuyucuklardaki tüm medyum boşaltılmış ve yerine toplam hacim 100 µl olacak şekilde deney grupları ilave edilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Nöroproektif etkiyi tespit etmek için 24 saat sonunda MTT analizi yapılmıştır.

3.4.14.c. MTT analizi

Ekstraktların sitotoksitelerinin belirlenmesi için, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazilyum bromid (MTT maddesi) kullanılmıştır. Kolorimetrik yolla sitotoksiteler belirlenme metodlarından biri olan MTT analizi; canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile oluşturduğu reaksiyonda, solüsyonlarda bulunan tetrazolium halkasının hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturması ilkesine dayanmaktadır (Riss *et al.* 2016). Sağlam hücrelerde mitokondri MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalamaktadır. Yani sarı renkli MTT, mor renkli çözünmeyen formazan'a indirgenmekte ve oluşan renk yoğunluğu 570 nm'de saptanmaktadır. Sonuç olarak, canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır (Tokur ve Aksoy 2017).

MTT solüsyonu 1 ml PBS içerisinde 5 mg MTT tozu çözündürülüp ardından 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilmesi ile elde edilmiştir. Analiz yapılana kadar MTT saklama kabının dış yüzeyi alüminyum folyo ile kapatılarak -20°C'de bekletilmiştir.

Sitotoksosite oranını (canlılık oranını) belirlemek için, 24 saatlik deney sonrasında hücre ortam sıvısı tamamen uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan hücrelerin üzerine ise, her bir kuyucuğa 10'ar µl MTT solüsyonundan ve 90'ar µl ekstrakt içermeyen saf hücresel medyum eklenmiştir. Tekrar hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda 4 saat inkübe edilmiştir. Böylece, 4 saat sonunda tetrazolium halkasının hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanması sonucu oluşan mor renkli formazan kristalleri meydana gelmiştir. Sonra tüm hücre solüsyonları dikkatli şekilde kuyucuklardan çekilerek atılmış ve yerine 100 µl DMSO ilave edilmiştir. DMSO hücre zarı içerisindeki formazan kristallerini çözmüştür. DMSO ilavesi sonrası spektrofotometre ile 570 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri okunarak sitotoksik verilere erişilmiştir. Mor kristal sayısının fazla olması canlılık oranının yüksek olduğunu göstermektedir.

3.4.14.d. Toplam antioksidan kapasitesi (TAK), toplam oksidan sayısı (TOS) ve hücrelerdeki oksidatif stresin varlığının tespiti

Toplam antioksidan kapasitesini tesbit edebilmek için Tomasch *et al.* (2001) yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin esası, 2-2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sülfonat) (ABTS^{•+}) radikal katyonunun oluşumunu inhibe edecek antioksidan kapasitesinin tespitidir. Analiz daha önce ayrılan hücre sıvıları ile gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan TAK ticari kitlerinin içeriği; 50 ml reaktif 1 solüsyonu, 10 ml reaktif 2 solüsyonu, 10 ml standart 1 solüsyonu ve 10 ml standart 2 solüsyonundan oluşmaktadır. Öncelikle kuyucuklara 30'ar µl hücre sıvısı (MTT analizinden önce ortamdan alınan hücre sıvısı) pipetlenmiş ve üzerine 500'er µl reaktif 1 solüsyonu eklenerek 660 nm dalga boyunda ilk absorbans değeri okunmuştur. İkinci adımda; aynı kuyucukların üzerine 75'er µl reaktif 2 eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiş ve 660 nm dalga boyunda ikinci absorbans değeri okunarak kaydedilmiştir. Eşitlik 5 yardımıyla

ekstraktların TAK düzeyleri mmol Troloks Ekivalen/L cinsinden belirlenmiştir.

$$\text{TAK}(\text{mmol Troloks Ekivalen/L}) = \frac{(\Delta S1 - \Delta \ddot{O})}{(\Delta S1 - \Delta S2)} \times 20 \quad (3.7)$$

Burada: S1; standart 1, \ddot{O} ; örnek, S2; standart 2'yi ifade etmektedir.

Toplam Oksidan Sayısı Doğan vd (2011)'e göre yapılmıştır. Yöntemin esası, ortamdaki oksidanların ferroz iyon-o-dianisidin'i ferik iyon oksitlemesi ve asidik ortamda ferrik iyonların ksilenol oranj ile meydana getirdiği renkli kompleksin oluşturduğu renk yoğunluğunun spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Analizde kullanılan TOS ticari kitlerinin içeriği; 50 ml reaktif 1 solüsyonu, 10 ml reaktif 2 solüsyonu, 10 ml standart 1 solüsyonu ve 10 ml standart 2 solüsyonundan oluşmaktadır. Öncelikle kuyucuklara 75'er μl hücre sıvısı pipetlenmiş ve üzerine 500'er μl reaktif 1 solüsyonu eklenerek 530 nm dalga boyunda ilk absorbans değeri okunmuştur. İkinci adımda; aynı kuyucukların üzerine 25'er μl reaktif 2 eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiş ve 530 nm dalga boyunda ikinci absorbans değeri okunarak kaydedilmiştir. Eşitlik 3.8 yardımıyla ekstraktların TOS düzeyleri mmol Troloks Ekivalen/L cinsinden belirlenmiştir.

$$\text{TOS (mmol Troloks Ekivalen/L)} = \frac{(\Delta \ddot{O} - \Delta S2)}{(S2)} \times 2 \quad (3.8)$$

Burada: \ddot{O} ; örnek, S2; standart 2'yi ifade etmektedir.

Hücredeki oksidatif stres, toplam oksidan sayısının toplam antioksidan sayısına oranlanması ile hesaplanmıştır.

3.4.14.e. Hücrenin Ca^{+2} düzeyinin belirlenmesi

3.4.7. nolu bölümde 'ICP/MS ile mineral madde kompozisyonunun belirlenmesi' başlığı altında izah edilmiştir.

3.4.14.f. Apoptoz etkisinin belirlenmesi

Süspansiyon halinde bulunan nöron hücrelerinin apoptoz seviyesi Annexin V Apoptosis Deteksiyon Kiti ile tespit edilmiştir. 24 saat boyunca ekstraktlarla etkileşimde olan nöron hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişimler gözlemlenmiştir.

Süspansiyonda bulunan hücreler canlı ise Annexin V ve Propidium Iodit (PI) ile boyanınca mavi/yeşil soluk renkli ve düzenli yapıya sahip bir morfoloji sergilemektedirler. Erken evre apoptozda çekirdek ve stoplazma zarları sağlam iken çekirdek içerisinde kromatin yoğunlaşması meydana gelmektedir. Bu evrede plazma zarının içinden dışına fosfatidilserin (FS) translokasyonu meydana gelir ve hücre dış yüzeyi Annexin V ile yeşil fluoresans renk vermektedir. Geç evrede ise hücreler stoplazmik zar ile çevrili çekirdeksel parçalanmalar gözlenmektedir. Nekroza girmiş hücreler ise canlı hücrelere kıyasla daha küçük bir stoplazma, hasarlı bir stoplazma zarı ve sağlam bir çekirdek şeklinde bir morfoloji sergilemektedirler.

3.4.15. İstatistiksel analizler

Araştırma, 1 *Ferula* çeşidi x 2 farklı ekstraksiyon yöntemi (klasik ekstraksiyon ve ultrasonik ekstraksiyon) x 5 farklı çözücü (su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan) x 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler IBM SPSS Statistics Version 20.0 paket programı kullanılarak istatistiki değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonucunda önemli çıkan farklılıklara One-way ANOVA Çoklu Karşılaştırma testlerinden Duncan testi uygulanmıştır. Sonuçlar \pm standart sapma olarak verilmiş ve $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ olan tüm değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Ekstraktlar ve Esansiyel Yağın Ekstraksiyon Verimi

Klasik ve ultrasonik yöntemler kullanılarak elde edilen su, 1:1 etanol: su, 1:1 metanol: su, n-hekzan ve kloroform ekstraktları ile esansiyel yağa ait ekstraksiyon verimi değerleri Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı yöntem ve çözücülerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağa ait % ekstraksiyon verimi değerleri

| Ekstrakt kodları | %Ekstraksiyon verimi |
|------------------|----------------------|
| KSE | 10,24 |
| USE | 11,50 |
| KESE | 17,65 |
| UESE | 19,25 |
| KMSE | 23,10 |
| UMSE | 26,00 |
| KHE | 3,30 |
| UHE | 3,51 |
| KKE | 3,80 |
| UKE | 4,12 |
| EY | 0,4 |

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi ekstraktların ekstraksiyon verimleri %3,30 ile %26,00 aralığında değişmektedir. Çözücü türleri ve uygulanan ekstraksiyon yönteminin % ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin oldukça yüksek olduğu belirgin şekilde görülmektedir. 11 farklı uygulamadan ekstraksiyon verimi açısından en yüksek performansın Akkol *et al.* (2008) ve Yan *et al.* (2008) ile uyumlu olarak metanol: su ekstraktına ait olduğu görülmektedir. En düşük verim ise %3,30 ile klasik n-hekzan ekstraktına aittir.

Khiari *et al.* (2009)'a göre çözücü polaritesi, dipol moment, viskozite ve dielektrik sabiti; difüzyon hızını ve dolayısıyla ekstraksiyon verimini de etkilemektedir. Dielektrik sabiti yüksek olan moleküller polar maddeleri daha fazla çözmektedir. Suyun dielektrik sabitinin diğer çözücülere kıyasla daha yüksek olmasına rağmen, metanol: su ekstraktının en yüksek verimi vermesi; metanolün suyun viskozitesini düşürmesi ve difüzyonu hızlandırmasından kaynaklanmaktadır (Lehotay 1997; Lang and Wai 2001). Kartal *et al.* (2007), *Ferula orientalis* L. bitkisine ait ekstraktlardan aseton oleoresin, hekzan ve metanol: su ekstraktları arasında en yüksek verimi %9,5 oranı ile metanol: su ekstraktından elde etmiştir. Bulgular, yapılan çalışmada; metanol: su ekstraktı veriminin Kartal *et al.* (2007)'nin yaptığı çalışmada elde ettiği verimden çok daha yüksek olduğunu göstermektedir (klasik metanol ekstraktında %23,10 ve ultrasonik metanol ekstraktında %26). Bu durumun uygulanan ekstraksiyon yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. *Ferula orientalis* L. bitkisinin ekstraksiyon verimi üzerine; Science direct, Scholar Google ve Web of Science veri tabanlarında Kartal *et al.* (2007)'nin yaptığı çalışmanın dışında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Uygulanan ekstraksiyon yöntemi açısından Çizelge 4.1 değerlendirildiğinde tüm örneklerde ultrason uygulamasının ekstraksiyon verimini artırdığı görülmektedir. Klasik ekstraksiyon uygulamasına kıyasla ultrasonik yöntem uygulandığında, örnekler arası gözlenen en yüksek verim artışı %2,9'luk fark ile metanol: su ekstraktına aittir. Kimbaris *et al.* (2006)'a göre bitkilerden solvent ekstraksiyonu ile biyoaktif bileşenlerin eldesi amacıyla kullanılan yöntemler arasında yer alan klasik teknikler; yüksek sıcaklık uygulaması, uzun ekstraksiyon süreleri ve düşük ekstraksiyon verimliliği ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca bu teknikler çok miktarda organik çözücü ve yüksek enerji tüketimine neden olmaktadır (Shirsath *et al.* 2012; Vetal and Lade 2013). Virot *et al.* (2010), ultrason sisteminin biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılabilir etkin bir yöntem olduğunu ifade etmektedir. Ultrason uygulaması ile; partiküllerin çapı azalarak katı-sıvı kısımlar arası yüzey alanı artmakta, çözücünün dokulara doğru iletimi hızlanmakta ve böylece hücre duvarının parçalanması ile hücre içi bileşenlerin çözücüye transferi hızlanmaktadır (Topdas 2012). Ultrason yardımcı ekstraksiyon ve klasik ekstraksiyonun uygulandığı bir çalışmada, *Curcuma amada* bitkisinden kurkumin

ekstraksiyonu amacıyla; 35°C, 1 saat, 250 W güç ve 22 kHz frekansta gerçekleştirilen ultrason yardımlı ekstraksiyon sonucu %72; 30°C’de 8 saat boyunca sürdürülen klasik ekstraksiyon uygulamasında ise en fazla %62 verim elde edildiği belirtilmiştir (Shirsath *et al.* 2017). Benzer şekilde bitkilerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunu içeren birçok çalışmada ultrason uygulamasının ekstraksiyon verimini artırdığı rapor edilmektedir (Bayar *et al.* 2017; Díaz-de-Cerio *et al.* 2017; Roriz *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017).

Hidrodistilasyon yöntemi ile Clevenger düzeneği kullanılarak elde edilmiş çayır esansiyel yağına ait verim Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi, %0,4’dür. Kartal *et al.* (2007) *Ferula orientalis*’de aynı yöntemi kullanarak esansiyel yağ verimini %0,51 olarak belirlemiştir. Benzer şekilde, *Apiaceae* familyasında yer alan *Ferula communis* bitkisinden elde edilen esansiyel yağda verim %0,18 (m/m) (Rahali *et al.* 2016) olarak rapor edilirken; bu değer Ferrari *et al.* (2005) tarafından bulunan değerden (%0,04) oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı türe ait bitkiler arasında esansiyel yağ verimindeki değişkenlik; hem genetik faktörler hem de sıcaklık, yağış ve nem gibi çevresel faktörlerle ilişkilidir (Hidian *et al.* 2010). Ayrıca, yapılan çalışmada salamura çayır üretim basamaklarından haşlama aşamasında bir miktar esansiyel yağ kaybı da muhakkak gerçekleşmiş ve bu durum esansiyel yağ veriminin düşmesine sebep olmuştur.

4.2. Ekstraktlar ve Esansiyel Yağın Renk Yoğunluğu

Renk parametreleri üzerine işlem (klasik veya ultrasonik ekstraksiyon) ve çözücü (su, etanol: su, metanol: su, n-hekzan ve kloroform) değişkenleri ile işlem x çözücü interaksiyonunun etkilerini gösteren varyans analiz sonuçları Çizelge 4.2’de verilirken; salamura çayır, liyofilize salamura çayır tozu, ekstraktlar ve esansiyel yağın renk parametrelerine ait ortalamalar standart sapmaları ile birlikte (L^* , a^* , b^* , ΔE , H^* , C^*) Çizelge 4.3’de belirtilmiştir.

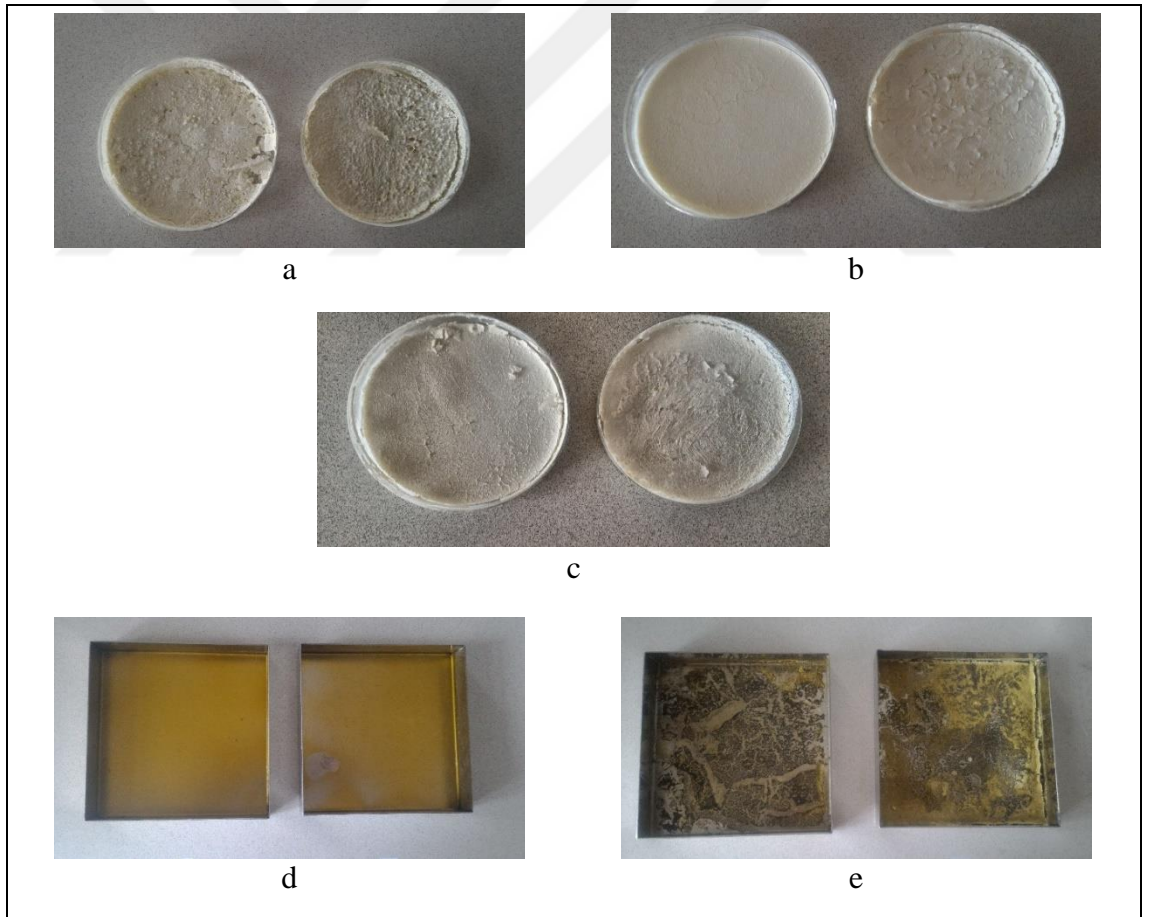


Çizelge 4.2. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktların renk parametrelerine ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon | SD | <i>L*</i> | | | <i>a*</i> | | | <i>b*</i> | | | ΔE | | | <i>H°</i> | | | <i>C*</i> | | |
|------------|----|-----------|---------|---------|-----------|--------|---------|-----------|----------|---------|------------|---------|---------|-----------|---------|---------|-----------|----------|---------|
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 0,125 | 0,027 | 0,872 | 0,000128 | 0,001 | 0,980 | 7,783 | 8,172 | 0,010* | 0,480 | 0,372 | 0,549 | 0,885 | 0,079 | 0,782 | 7,370 | 8,148 | 0,010* |
| Çözücü (B) | 4 | 2174,424 | 461,529 | 0,000** | 9,784 | 76,645 | 0,000** | 1719,39 | 1805,394 | 0,000** | 141,611 | 109,705 | 0,000** | 1546,172 | 137,515 | 0,000** | 1681,215 | 1858,755 | 0,000** |
| A x B | 4 | 5,065 | 1,075 | 0,395 | 0,743 | 5,824 | 0,003** | 0,659 | 0,692 | 0,606 | 3,297 | 2,555 | 0,071 | 7,866 | 0,700 | 0,601 | 0,901 | 0,997 | 0,432 |
| Hata | 20 | 4,711 | | | 0,128 | | | 0,952 | | | 1,291 | | | 11,244 | | | 0,904 | | |
| Genel | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

* $p < 0,05$ düzeyinde önemli ** $p < 0,01$ düzeyinde önemli

Parlaklığın göstergesi olan L^* değeri üzerine çözücü türünün etkisi istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan, işlem değişkeni ile işlem x çözücü interaksiyonunun L^* değerine etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0,05$) bulunmuştur. L^* değerinin en düşük (48,367) olduğu örnek, klasik yöntemle üretilen ve çözücü olarak kloroform kullanılan KKE örneği iken; en yüksek L^* değeri (88,953) ultrasonik yöntemle elde edilen etanol: su ekstraktıdır. Yani ekstraktlar arasında en koyu renklisi KKE, en açık renklisi ise UESE'dir. Diğer ekstraktlara nazaran kloroform ekstraktlarının daha koyu renkli olmasının, kloroform tarafından çözülen bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ekstrakt renkleri Şekil 4.1'de görsel olarak da sunulmuştur.

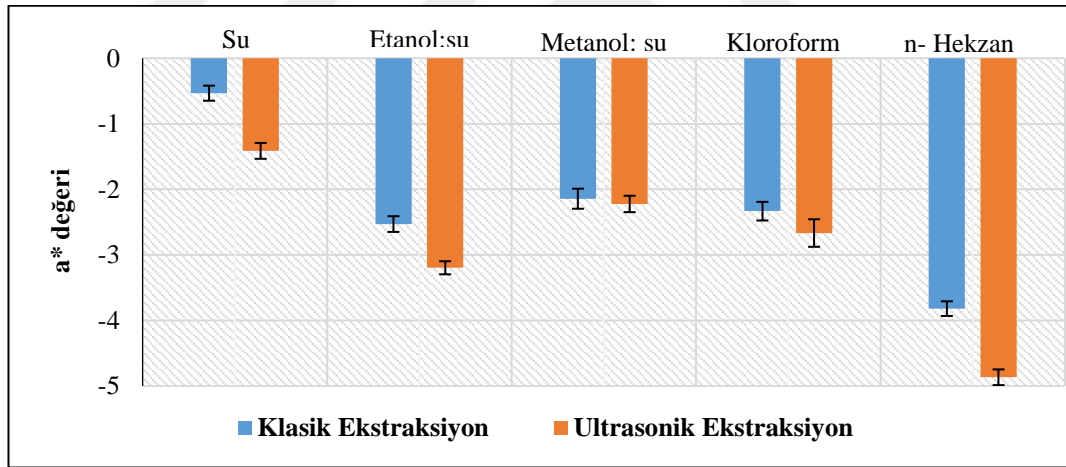


Şekil 4.1. Ekstrakt resimleri a; KSE ve USE, b; KESE ve UESE, c; KMSE ve UMSE, d; KHE ve UHE, e; KKE ve UKE

*Sıralama aynı resim içerisinde soldan sağa doğru yapılmıştır

Ekstraksiyonda kullanılan farklı yöntem ve çözümlerin yeşillik-kırmızılığı ifade eden a^* değerleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde; çözücü türü değişkeni ve işlem x çözücü türü interaksiyonunun a^* değeri üzerine $p < 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak çok önemli olduğu görülürken, klasik veya ultrasonik ekstraksiyon uygulamalarının a^* değeri üzerine etkisi ise önemsiz ($p > 0,05$) bulunmuştur. Örneklerin a^* değerleri -4,867 ile -0,533 aralığında değişim göstermektedir. En düşük a^* değeri ultrasonik kloroform ekstraktına ait iken; en yüksek değer klasik su ekstraktına aittir. Yani Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi yeşilliği en yüksek örnekler klasik ve ultrasonik kloroform ekstraktlarıdır.

Şekil 4.2 incelendiğinde çözücü türü değiştiğinde ilgili ekstraktta tespit edilen a^* değerlerinin değiştiği görülmektedir.



Şekil 4.2. Ekstraktların a^* renk değeri üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi

Örneklerin b^* değerleri 2,577 ile 44,103 arasında değişmektedir. Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi en sarı yani b değerinin en yüksek olduğu örnek, ultrasonik hekzan ekstraktı iken; rengi maviye en yakın örnek klasik kloroform ekstraktıdır. Varyans analizi sonuçlarına göre; b^* değerleri üzerine çözücü türü $p < 0,01$ düzeyinde önemli iken, işlem değişkeninin etkisi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir. Tüm ekstraktlarda ultrason uygulamasının b^* değerini artırdığı gözlenmektedir. İşlem x çözücü türü

interaksiyonunun b^* değerleri üzerine etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz ($p>0,05$) olduğu saptanmıştır.

Toplam renk farkının bir ifadesi olan ΔE değeri, salamura aşıır ile ekstraktlar arasındaki renk farkını göstermektedir. Varyans analizine göre ekstraktların ΔE değerleri üzerine çözücü türü değişkeni $p<0,01$ düzeyinde etkili olarak belirlenmiştir. İşlem değişkeni ve işlem x çözücü türü interaksiyonunun toplam renk farkı üzerine etkisi ise önemsizdir ($p>0,05$). En yüksek ΔE değeri 32,359 değeri ile ultrasonik etanol:su ekstraktına aittir. En düşük değer ise esansiyel yağa aittir (2,577).

Ekici (2011)'e göre; rengin tanımlanmasında L^* değerinin yanı sıra, a^* ve b^* değerleri kullanılarak hesaplanan C^* ve H° değerlerinin kullanılması daha doğru yorumlamaya imkân sağlamaktadır. Böylece aynı a^* değerine sahip örnekler arası fark daha net bir şekilde ortaya konabilecektir. C^* değerleri üzerine çözücü türü değişkeninin etkisi $p<0,01$ düzeyinde önemli iken; işlem değişkeni $p<0,05$ seviyesinde etkili olarak tespit edilmiştir. C^* değeri en yüksek olan (44,184) ultrasonik hekzan ekstraktının diğer örneklerden daha yoğun bir renge sahip olduğu belirlenmiştir. Örneklerin H° değerleri incelendiğinde değerlerin 93,108 (klasik hekzan ekstraktı) ile 151,640 (ultrasonik kloroform ekstraktı) arasında değişim gösterdiği görülmektedir. Salamura aşıır, liyofilize toz aşıır, esasiyel yağ ve ekstraktlarda renk genel olarak açık sarı civarında değerlendirilebilmekle birlikte; H° değerlerinin yükseldiği kloroform ekstraktlarında ise renk yeşile kaymaktadır. H° değerleri üzerine çözücü türü değişkeni istatistiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde etkili iken; işlem değişkeni ve işlem x çözücü türü interaksiyonu $p>0,05$ seviyesinde önemsizdir.

Çizelge 4.3. Çadır, salamura çadır, liyofilize salamura çadır tozu, ekstraktlar ve esansiyel yağa ait renk değerleri

| Örnek Kodu | <i>L</i> * | <i>a</i> * | <i>b</i> * | ΔE | <i>H</i> ^o | <i>C</i> * |
|------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------------|----------------|
| SÇ | 60,477±1,819 c | -4,467±0,197 ab | 21,183±1,190 e | - | 101,952±0,563 b | 21,649±0,370 f |
| LSÇT | 82,064±0,418 d | -3,610±0,126 cd | 13,723±0,170 d | 22,856±0,375 b | 104,740±0,812 c | 14,190±0,172 e |
| KSE | 88,683±0,302 e | -0,533±0,115 gh | 5,823±0,286 b | 32,150±0,156 d | 95,230±0,109 a | 5,847±0,286 ab |
| USE | 86,550±0,391 e | -1,413±0,120 g | 7,050±0,111 bc | 29,846±0,178 c | 101,333±0,272 b | 7,190±0,108 c |
| KESE | 87,727±0,175 e | -2,530±0,153 ef | 7,003±0,180 bc | 30,780±0,158 cd | 109,863±0,330 de | 7,446±0,183 c |
| UESE | 88,953±0,565 e | -3,197±0,142 de | 8,770±0,196 c | 32,359±0,232 d | 110,029±0,146 e | 9,335±0,102 d |
| KMSE | 88,913±1,712 e | -2,143±0,112 fg | 6,367±0,577 b | 31,091±0,510 cd | 108,602±0,247 d | 6,718±0,582 b |
| UMSE | 88,777±1,020 e | -2,223±0,121 f | 7,383±0,438 bc | 31,567±0,463 cd | 106,757±0,599 d | 7,710±0,401 c |
| KHE | 61,667±2,598 c | -2,333±0,577 f | 42,970±1,137 f | 21,951±0,134 b | 93,108±0,171 a | 43,033±0,790 g |
| UHE | 58,930±5,974 bc | -2,667±0,260 ef | 44,103±1,193 f | 23,487±0,495 b | 93,460±0,684 a | 44,184±0,549 g |
| KKE | 48,367±0,577 a | -3,820±0,477 cd | 2,577±0,230 a | 22,335±0,550 b | 145,966±0,464 f | 4,608±0,160 a |
| UKE | 48,527±0,643 a | -4,867±0,559 a | 2,627±0,433 a | 22,189±0,150 b | 151,640±0,348 g | 5,531±0,105 ab |
| EY | 55,890±0,587 b | -4,000±0,132 bc | 15,253±0,560 d | 7,525±0,577 a | 104,694±0,547 c | 15,769±0,737 e |

*SÇ: salamura çadır, LSÇT: liyofilize salamura çadır tozu

* Her sütun için istatistikî analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar $P < 0,05$ önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

4.3. ICP-MS ile Belirlenen Mineral Madde Kompozisyonu

İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanılarak ekstraktlar ve esansiyel yağın; Na (Sodyum), Mg (Magnezyum), Ca (Kalsiyum), P (Fosfor), Fe (Demir), K (Potasyum), Zn (Çinko), Krom (Cr), Mn (Mangan), Se (Selenyum), Si (Silisyum), Co (Kobalt), Ni (Nikel), Cu (Bakır), Al (Alüminyum), Cd (Kadmiyum), Pb (Kurşun) ve Hg (Civa) elementlerinden oluşan mineral madde kompozisyonu belirlenmiştir. ICP-MS cihazı ile çalışılan minerallerin tespit limitleri Çizelge 4.4’de verilirken; mineral madde miktarlarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.5’de ve bu verilere ait ortalamalar standart sapmaları ile birlikte Çizelge 4.6’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. ICP-MS cihazı ile çalışılan elementlere ait ölçüm limitleri

| Çalışılan elementler | Ölçüm limitleri (ppb) |
|-----------------------------|------------------------------|
| Na | 4,034 |
| Mg | 0,363 |
| Al | 0,282 |
| P | 2,639 |
| K | 2,438 |
| Ca | 2,047 |
| Cr | 0,049 |
| Mn | 0,024 |
| Fe | 0,2 |
| Cu | 2,343 |
| Ni | 0,381 |
| Co | 0,003 |
| Zn | 0,603 |
| Se | 0,061 |
| Si | 3,771 |
| Cd | 0,002 |
| Hg | 0,025 |
| Pb | 0,054 |

Çizelge 4.5. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktların mineral madde değerlerine ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Na | | | Mg | | | Ca | | | P | | | K | | | Zn | | |
|-------------------|----|-------------|-----------|---------|-------------|---------|---------|------------|----------|---------|-------------|----------|---------|-------------|------------|---------|----------|-----------|---------|
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 212928,439 | 2,285 | 0,162 | 13940,890 | 11,440 | 0,007** | 152728,182 | 1242,236 | 0,000** | 156526,857 | 48,296 | 0,000** | 43856099,33 | 9052,174 | 0,000** | 237,202 | 2277,354 | 0,000** |
| Çözücü (B) | 4 | 10187442703 | 10932,175 | 0,000** | 1113694,878 | 913,886 | 0,000** | 67394,154 | 548,160 | 0,000** | 17179623,58 | 5300,766 | 0,000** | 1098396778 | 226715,985 | 0,000** | 3315,357 | 31830,427 | 0,000** |
| A x B | 4 | 201440,181 | 2,162 | 0,147 | 651413,394 | 534,543 | 0,000** | 20250,276 | 164,708 | 0,000** | 13187351,36 | 4068,952 | 0,000** | 17295385,22 | 3569,876 | 0,000** | 1280,705 | 12295,931 | 0,000** |
| Hata | 20 | 93187,559 | | | 1218,637 | | | 122,946 | | | 3240,970 | | | 4844,814 | | | 0,104 | | |
| Genel | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Varyasyon Kaynağı | SD | Mn | | | Se | | | Cu | | | Al | | | Cd | | | Pb | | |
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 1,398 | 70,968 | 0,02** | 0,017 | 89,839 | 0,000** | 1,398 | 70,968 | 0,02** | 0,017 | 89,839 | 0,000** | 1,398 | 70,968 | 0,02** | 0,017 | 89,839 | 0,000** |
| Çözücü (B) | 4 | 54,794 | 2781,252 | 0,000** | 0,091 | 472,417 | 0,000** | 54,794 | 2781,252 | 0,000** | 0,091 | 472,417 | 0,000** | 54,794 | 2781,252 | 0,000** | 0,091 | 472,417 | 0,000** |
| A x B | 4 | 15,136 | 768,284 | 0,000** | 0,061 | 316,436 | 0,000** | 15,136 | 768,284 | 0,000** | 0,061 | 316,436 | 0,000** | 15,136 | 768,284 | 0,000** | 0,061 | 316,436 | 0,000** |
| Hata | 20 | 0,020 | | | 0,000189 | | | 0,020 | | | 0,000189 | | | 0,020 | | | 0,000189 | | |
| Genel | 30 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

*p<0,05 düzeyinde önemli **p<0,01 düzeyinde önemli

Co, Cr, Fe, Hg, Ni ve Si elementleri örneklerde okunamadığı için varyans analizine tabi tutulmamıştır.

Na mineraline ait varyans analiz sonuçları değerlendirildiğinde, sodyum miktarı üzerine çözücü türü değişkeni etkisinin $p < 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak çok önemli olduğu gözlenmektedir. İşlem değişkeni ile işlem x çözücü türü interaksyonunun Na değerleri üzerine etkisi ise $p > 0,05$ düzeyinde önemsiz olarak bulunmuştur. Çizelge 4.6'da belirtilmiş olan ekstraktlar ve esansiyel yağa ait Na değerleri; 3184,277 ppm ile 39103,835 ppm arasında değişim göstermektedir. Ekstraktlar arasında en yüksek Na değeri çaşırın ultrasonik su ekstraktında (USE) görülmekte iken; en düşük değer esansiyel yağa aittir. Diğer ekstraktlar ve esansiyel yağa kıyasla; su ekstraktlarında Na miktarının yüksek çıkmasının, sodyum ile kompleks oluşturmuş grupların su tarafından daha fazla çözündürülmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, klasik ekstraksiyon uygulamasına göre, ultrason uygulamasının su ekstraktına Na geçişini belirgin şekilde artırdığı tespit edilmiştir.

Tunctürk ve Özgökçe (2015) *Ferula orientalis* L.'in de mensup olduğu *Apiaceae* familyasından *Anethum graveolens* L., *Anthriscus* sp., *Chaerophyllum macropodium*, *F. haussknechtii* H.Wolff ex Rech.f., *Ferula rigidula* DC., *Heracleum persicum*, *Hippomarathrum microcarpum*, *Pimpinella aurea* DC, and *Prangos ferulacea* L. üzerine yapmış olduğu mineral madde analizinde bitkilerin bitkilerin Na içeriklerinin, 0.32 ile 1.26 g/ kg arasında olduğunu saptamıştır. Tunctürk ve Özgökçe (2015)'nin sonuçları ile yapılan çalışmanın sonuçları kıyaslandığında, dikkati çeken en önemli nokta Na miktarının tüm ekstraktlar ve esansiyel yağda oldukça yüksek oluşudur. Bu durumun salamura çaşırın içerdiği yüksek tuz konsantrasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2012)'ne göre; yetişkinlerde sodyumun maksimum günlük alım miktarı 2 g/gün (günlük 5 g'a eşdeğer tuz)'dür. Dünya çapında fazla miktarda tuz tüketildiğinden dolayı birçok ülkede tuz azaltma politikası uygulanmakta ve bu politika bilimsel araştırmalar yoluyla da desteklenmektedir (Andersen *et al.* 2009; He and MacGregor 2009; Agarwal *et al.* 2011; Ahuja *et al.* 2015). Ülkemizde ise yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olan çeşitli turşular, asma yaprağı, zeytin veya beyaz peynir salamuraları gibi pek çok ürün üretilmekte ve halk tarafından sevilerek tüketilmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip bu tarz bitkisel ürünler; tadlarının güzel oluşu açısından tercih edilebilse de; yüksek tuz konsantrasyonundan

kaynaklanan dezavantajlar öngörüldüğünde, halk sağlığı açısından aynı ürünlerin daha düşük oranda tuz içerecek şekilde üretilmelerinin daha doğru olacağı düşünülmektedir.



Çizelge 4.6. Estraktlar ve esansiyel yağa ait mineral madde değerleri (ppm)

| SÇ | KSE | USE | KESE | UESE | KMSE | UMSE | KHE | UHE | KKE | UKE | EY | |
|-----------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Na | 41962,520±229,951 f | 38153,847±296,985 d | 39103,835±462,596 e | 29266,101±73,765 c | 29033,938±507,879 c | 25613,509±456,331 b | 25858,289±331,718 b | 3378,980±116,142 a | 3413,735±112840 a | 3267,141±121,325 a | 3301,596±84,146 a | 3184,277±114,660 a |
| Mg | 2083,080±30,802 j | 1980,377±49,135 ı | 1800,295±39,689 g | 1589,261±60,486 e | 376,504±12,113 a | 893,101±14,248 d | 1892,537±46,216 h | 1869,229±27,754 gh | 700,317±35,044f | 496,097±3,005 b | 794,396±6,724 c | - |
| Ca | 862,830±9,525 h | 664,060±14,231 f | 606,930±7,789 e | 233,428±10,054 a | 549,323±7,466 d | 389,654±11,865 c | 596,144±11,558 e | 595,179±14,982 e | 751,755±5,855g | 278,983±9,103 b | 531,0185±14,240 d | - |
| P | 9424,843±70,796 j | 3607,751±31,825 f | 2796,573±19,715 c | 1898,652±56,742 a | 3319,033±71,672 e | 4487,660±42,609 g | 3363,598±60,359 e | 2969,221±46,896 d | 2228,689±46,137b | 8710,091±88,555 h | 9280,814±70,873 ı | - |
| K | 42418,350±70,852 j | 38252,764±71,189 ı | 42282,486±90,602 j | 18655,418±92,437 e | 19648,729±71,672 f | 21735,882±92,029 g | 31464,541±81,539 h | 982,504±28,435 b | 1773,572±59,644c | 2524,067±38,336 d | 1789,427±23,163 c | 148,521±0,838 a |
| Zn | 130,487±0,229 ı | 26,241±0,474 b | 48,235±0,295 d | 24,247±0,197 a | 50,920±0,107 e | 81,564±0,460 f | 28,453±0,394 c | 48,493±0,233 d | 50,787±0,379e | 88,606±0,275 g | 125,195±0,201 h | - |
| Mn | 12,355±0,676 j | 2,290±0,048 c | 5,224±0,559 e | 7,209±0,092 f | 1,863±0,081 b | 4,899±0,117 d | 9,873±0,337 g | 11,876±0,127 ı | 11,880±0,121 ı | 11,080±0,110 h | 11,158±0,083 h | 0,120±0,014 a |
| Se | 0,727±0,002 g | 0,305±0,011 c | 0,388±0,013 d | 0,049±0,004 a | 0,279±0,006 c | 0,443±0,021 de | 0,558±0,799 f | 0,390±0,017 d | 0,315±0,007 c | 0,143±0,015 b | 0,483±0,024 e | - |
| Cu | 15,819±0,072 j | 12,174±0,083 g | 15,563±0,076 ı | 5,329±0,069 c | 6,556±0,084 e | 4,275±0,109 a | 6,043±0,086 d | 4,230±0,080 a | 4,639±0,066 b | 11,021±0,141 f | 14,266±0,132 h | - |
| Al | 59,495±0,103 ı | 2,799±0,134 c | 3,203±0,095 c | 1,664±0,073 b | 1,638±0,069 b | 13,018±0,338 d | 14,909±0,098 e | 37,524±0,346 f | 37,864±0,475 f | 55,033±0,149 g | 57,210±0,387 h | 0,558±0,012 a |
| Cd | 0,078±0,004 f | 0,020±0,002 b | 0,037±0,004 d | 0,012±0,001 a | 0,012±0,004 a | 0,019±0,001 b | 0,047±0,002 e | 0,028±0,002 c | 0,038±0,001d | 0,018±0,003 b | 0,076±0,002 f | - |
| Pb | 3,728±0,078 f | 1,532±0,049 c | 1,299±0,037 b | 1,048±0,062 a | 1,836±0,071 d | 1,311±0,127 b | 2,130±0,073 e | 1,361±0,018 b | 2,051±0,076 e | 1,543±0,068 c | 1,978±0,049 de | - |
| Fe | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cr | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ni | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hg | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Si | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Co | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

*Her satır için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ppm düzeyindeki ortalamalar $P < 0,05$ önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.
*-;belirlenememiştir.

Salamura çayırdan elde edilen ekstraktların 376,504 ppm ile 1980,377 ppm arasında Mg içerdiği belirlenmiştir. Esansiyel yağda ise Mg tespit edilememiştir (Çizelge 4.6). En yüksek Mg değeri klasik yöntem ile elde edilen su ekstraktına ait olup; en düşük değer ultrasonik etanol: su ekstraktında belirlenmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre, Mg minerali üzerine çözücü türü ve işlem değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olarak belirlenmiştir.

Asteraceae, *Apiaceae*, *Rosaceae*, *Fabaceae* ve *Lamiaceae* familyalarına ait 79 bitki üzerine yaptıkları bir çalışmada *Apiaceae* familyasından 16 bitkiyi inceleyen Arceusz *et al.* (2010), bitkilerin Mg içeriklerinin 1,49-5,91 mg/g aralığında olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular *Ferula orientalis* L.'e ait ekstraktların içerdiği Mg değerleri ile uyumludur. Tunçtürk and Özgökce (2010) tarafından *Ferula rigidula* ve *Ferula haussknechtii* bitkileri üzerine yapılan çalışmada belirlenen Mg değerleri ile çalışmış olduğumuz *Ferula orientalis* L.'e ait bulgular kıyaslandığında ise; verilerin *Ferula rigidula* (2,11 g/kg) ile uyumlu olduğu fakat *Ferula haussknechtii* (4,08 g/kg)'e göre düşük olduğu görülmektedir.

Salamura çayırdan, Doğu Anadolu Bölgesi'nde etkileri bilimsel olarak ispatlanmamış olsa da; halk arasında diyabet hastalarını rahatlattığı gerekçesiyle sıklıkla tüketilmektedir. Bu etki çayırdan içerdiği Mg mineralinden kaynaklanabilir. Çünkü magnezyumun insülin sentezi ve sekresyonunun yanı sıra; insülinin hücre içi etkinliği ve dolayısıyla insülin aracılığıyla hücre içine glikoz transportu üzerine de etkin olduğu rapor edilmektedir (Takaya *et al.* 2004; Chaudhary *et al.* 2009). Hücre içi magnezyum seviyesinin düşmesi insülin etkisinin azalmasına sebep olmaktadır (Özpak Akkuş 2015).

Vücudumuzda en fazla bulunan 5. element olan kalsiyum (Renna *et al.* 2015) açısından Çizelge 4.5 değerlendirildiğinde; işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun Ca minerali üzerine $p < 0,01$ düzeyinde önemli olduğu görülmektedir. Esansiyel yağ ve ekstraktlara ait Ca minerali ortalamaları değerlendirildiğinde değerlerin 233,428 ppm ile 751,755 ppm aralığında değiştiği

belirlenmiş ve esansiyel yağda kalsiyum tespit edilememiştir. En yüksek değer ultrasonik yöntemle elde edilmiş hekzan ekstraktına ait iken; klasik yöntem ile yapılan etanol: su ekstraktı en düşük kalsiyum değerine sahiptir. Çizelge 4.6 incelendiğinde ekstraktlar arasında su ekstraktları hariç ultrasonik yöntemle yapılan ekstraksiyonların daha etkili olduğu görülmektedir. *Ferula orientalis* L.'in kalsiyum içeriği üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır ancak *Ferula orientalis* ile aynı familyada olan (*Apiaceae*) ham bitkiler üzerine yapılan çalışmalarda bulunan kalsiyum değerlerinin 2,29- 26,3 mg/g (Arceusz *et al.* 2010) ve 10,06-14,1 g/kg (Tunctürk and Ozgökce, 2015) aralıklarında olduğu tespit edilmiştir. Farklı çalışmalarda aynı familyada yer alan bitkilere ait rapor edilen kalsiyum değerlerinin salamura çadır ekstraktlarından çok yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Yetersiz kalsiyum alımı ve kemiklerden yetersiz Ca emiliminin osteoporozun yanı sıra; raşitizm, hipertansiyon ve kolorektal kanser gibi rahatsızlıklara sebep olabileceği belirtilmektedir (Centeno *et al.* 2009).

Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmaları, sinirsel iletim ve diş-kemik oluşumunda önemli rolleri olan; insan vücudunun ikinci majör elementi fosfor (Kurt 2007) açısından *Ferula orientalis*'e ait ekstraktlar değerlendirildiğinde, verilerin 1898,652 ppm ile 9280,814 ppm aralığında değiştiği görülmektedir. En düşük fosfor değeri klasik etanol: su ekstraktına ait olup; en yüksek değer ultrasonik kloroform ekstraktında belirlenmiştir. Esansiyel yağın ise fosfor içermediği tespit edilmiştir. Yapılan varyans analizi sonuçlarına göre, işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun ekstraktların fosfor miktarları üzerine $p < 0,01$ düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır.

Yapılan literatür taramasında *Ferula orientalis*'in fosfor içeriğinin belirlenmesi yönünde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, *Ferula rigidula* ve *Ferula haussknechtii* üzerine yapılan bir çalışmada bitkilerin sırasıyla; 3,72 g/kg ve 2,51 g/kg fosfor içerdikleri tespit edilmiştir (Tunctürk and Ozelik 2015). Araştırma bulguları değerlendirildiğinde bitkilerin fosfor içeriklerinin, çadırın kloroform ekstraktları hariç genel anlamda Tunctürk and Ozelik (2015) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir. Diğer ekstraktlar ve esansiyel yağla kıyasla; kloroform ekstraktlarında P

miktarının yüksek çıkmasının, fosfor ile kompleks oluşturmuş grupların kloroform tarafından daha fazla çözülmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Demir, doğada en bol bulunan ve biyolojik açıdan en önemli elementlerden biridir. Bu element, eritrositlerde hemoglobin proteininin yapımı için gereklidir ancak ana fonksiyonu oksijenin akciğerlerden hücrelere taşınmasıdır. Demir eksikliği sonucu ortaya çıkan kandaki hemoglobin miktarının azalması önemli bir sağlık sorunudur. Salamura çayı, ekstraktları veya esansiyel yağı demir elementi açısından analize tabi tutulmuş ancak element saptanmamıştır.

Bakır, birçok enzim ve proteinin temel bileşeni olması dolayısıyla insanlar da dâhil olmak üzere tüm canlı organizmalar için vazgeçilmez bir eser elementtir (Renna *et al.* 2015). Yetişkin erkek ve bayanlarda günlük alım dozu 900 µg olarak hesaplanmıştır (Scientific Committee for Food 1993). Esansiyel yağda bakır elementi saptanmamış olup, ekstraktlarda ise belirlenen değerler 4,230 ppm (klasik n-hekzan ekstraktı) ile 15,563 ppm (ultrasonik su ekstraktı) arasında değişmektedir. Ultrason uygulamasının ekstraktların bakır içeriğini $p < 0,05$ düzeyinde artırdığı tespit edilmiştir. *Ferula orientalis* bitkisinin bakır elementi içeriği ile ilgili olarak literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak çayının da mensup olduğu *Apiacea* familyasından bitkiler üzerinde yapılan çalışmada bakır içerikleri 21,2 -23,7 mg/kg arasında bulunmuştur (Tunçtürk and Özcelik 2015).

İnsan ve hayvan beslenmesinde gerekli bir mikro element olan selenyumun kardiyovasküler hastalıklar ve kanser riskini azalttığı rapor edilmektedir (Thomson 2004; Rayman 2008). Gıdalar selenyum alımının başlıca yoludur. Et ve deniz ürünleri 0,4-1,5 µg/g aralığında yüksek miktarda selenyum içeriğine sahip iken; meyve ve sebzeler de selenyumca zengin birer kaynaktır (Rayman 2008). Son zamanlarda Se üzerine çeşitli bitkilerle yapılmış birçok çalışma mevcuttur (Germ *et al.* 2009; Bhatia *et al.* 2013; Thosaikham *et al.* 2014; Bañuelos *et al.* 2015; Funes-Collado *et al.* 2015; Longchamp *et al.* 2015; Mahn 2017; Castro Grijalba *et al.* 2017). Ancak, literatürde *Ferula orientalis* L. veya aynı familyada olan farklı bitkilerle ilgili yapılmış olan herhangi bir çalışmaya

rastlanmamıştır. Çalışmamıza ait bulgular incelendiğinde, işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksyonunun Se minerali üzerine $p<0,01$ seviyesinde etkili olduğu görülmektedir. Ekstraktlar arasında en düşük selenyum miktarı 0,049 ppm değeri ile klasik yolla üretilmiş etanol:su ekstraktına ait iken; en yüksek değer ultrasonik metanol:su ekstraktına aittir (0,558 ppm). Ultrasonik metanol: su ekstraktının Se içeriğinin diğer ekstraktlara kıyasla daha yüksek olması, ultrason uygulamasının hücre membranını parçalayarak selenyumun bağlı olduğu grupların miktarını artırması ve polar özellikteki metanol:su çözücüsünün bu grupları daha fazla çözmesinden kaynaklanmış olabilir.

Potasyum insan vücudunda ağırlıklı olarak bir hücre içi katyondur ve asit-baz düzenlenmesi, sıvı dengesi, kas kontraksiyonu ve sinir iletiminde birincil düzeyde etkindir (Thomas 2001). Ekstraktlar ve esansiyel yağın potasyum değerlerine ait varyans analiz sonuçları; potasyum miktarı üzerine işlem değişkeni, çözücü değişkeni ve işlem x çözücü interaksyonu etkilerinin istatistiksel olarak $p<0,01$ düzeyinde çok önemli olduğunu göstermektedir. En yüksek potasyum içeriği 42282,486 ppm olarak ultrasonik su ekstraktında kaydedilirken; salamura çasının hem ultrasonik hemde klasik yolla elde edilmiş su ekstraktlarının diğer ekstraktlara göre belirgin şekilde yüksek konsantrasyonda potasyum içerdiği saptanmıştır. En düşük potasyum değerinin (148,521 ppm) ise esansiyel yağa ait olduğu görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen potasyum miktarlarına ait veriler, *Ferula orientalis* L. ile aynı familyadan bitkilerle çalışan; Arceusz *et al.* (2010)'un bulguları (2,29-26,3 mg/g) ve Tunctürk and Ozgökce (2015)'nin bulgularından (13,8-25,6 g/kg) yüksek bulunmuştur. Ulusal Tıp Enstitüsü (Food & Nutritional Board 2005) gıdalar aracılığıyla günlük alınacak 4,7 g potasyumun yeterli olacağını rapor etmiştir. Dolayısıyla salamura çasının yaklaşık 115 g tüketiminin günlük potasyum ihtiyacını karşılayabileceği düşünülmektedir.

Krom, çinko ve kobalt gibi eser elementler arasında yer alan mangan insan vücudunda birçok fizyolojik fonksiyonun yerine getirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Renna *et al.* 2015). Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi, örneklerin mangan içeriği 0,120- 11,880 ppm arasında değişim göstermektedir. En düşük değer esansiyel yağa ait iken; en yüksek değer

ultrasonik yöntem ile elde edilmiş n-hekzan ekstraktına aittir. Burada dikkat çeken en önemli nokta, mangan elementinin apolar özellikteki n-hekzan ve diğer polar çözücülere kıyasla polarite indeksi en düşük çözücü olan kloroforma ait ekstraktlarda daha yüksek oranda belirlenmiş olmasıdır. Bu durum, mangan ile kompleks oluşturmuş grupların apolar çözücülerde daha iyi çözüldüğünü düşündürmektedir. Ekstraktların mangan içeriği üzerine çözücü tipi değişkeni ile işlem x çözücü tipi interaksyonun etkisi $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçları mangan değerleri açısından, Tunçtürk and Özcelik (2015) tarafından *Ferula rigidula* DC (27,2 mg/kg) ve *Ferula haussknechtii* (48,5 mg/kg) üzerine yapılan çalışma bulguları ile kıyaslandığında çok düşük kalmaktadır.

Krom, insülinin etkisini güçlendiren ve dolayısıyla karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasını etkileyen önemli bir eser elementtir (Renna *et al.* 2015). Ekstraktlar ve esansiyel yağ krom minerali açısından analize tabi tutulmuş ancak krom saptanmamıştır.

Çinko, birçok enzimin yapısına katılması, düzenleyici ve katalitik rol üstlenmesi dolayısıyla insanlar için önemli bir eser elementtir. Büyüme ve gelişme, bağışıklık tepkisi, nörolojik fonksiyon ve üreme (reproduction) üzerinde önemli rolleri vardır. Gıda Bilimsel Komitesi (Scientific Committee for Food 1993) erkek ve kadınlar için sırasıyla 9,5 ve 7,0 mg/gün çinko alımını tavsiye etmektedir. Bu önemli eser element açısından ekstraktlar ve esansiyel yağ kıyaslandığında; çinko miktarının ekstraktlarda 24,247-125,195 ppm arasında değiştiği, esansiyel yağda ise çinko mineralinin bulunmadığı görülmektedir. En yüksek çinko miktarı ultrasonik kloroform ekstraktında bulunurken; en düşük miktar klasik yöntemle elde edilen etanol: su ekstraktına aittir. Ultrason uygulamasının metanol: su ekstraktı hariç diğer tüm ekstraktlarda çinko miktarını $p < 0,05$ düzeyinde artırdığı belirlenmiştir. Çadır ekstraktlarında belirlenen çinko miktarları, Tunçtürk ve Özgökçe (2015) tarafından farklı *Ferula* türleri üzerinde yapılan çalışma ile kıyaslandığında daha yüksek olarak bulunmuştur.

Kobalt, fiziksel ve kimyasal özellikleri demir elementine benzer olan bir geçiş elementidir ve B 12 vitaminin ayrılmaz bir parçası olarak görev yapmaktadır (Yang *et al.* 2014).

İndüktif Eşleşmiş Plazma- Kütle Spektrometresi kullanılarak ekstraktlar ve esansiyel yağ ile yapılan mineral madde tayininde, demir elementine benzer şekilde hiçbir örnekte kobalt da tespit edilememiştir.

Kadmiyum, böbrek ve karaciğerlerde fonksiyon bozukluğuna ve uzun vadede osteoporoza neden olduğundan bu mineralin gıdalarla alımının toksik etki göstereceği düşünülmektedir (Godt *et al.* 2006). En yüksek kadmiyum içeriğine sahip ekstrakt 0,076 ppm değeri ile ultrasonik kloroform ekstraktı iken; en düşük değer (0,012 ppm) klasik ve ultrasonik etanol: su ekstraktlarında belirlenmiştir. Esansiyel yağda kadmiyum saptanmamıştır. Ekstraktların kadmiyum içerikleri üzerine işlem ve çözücü tipi değişkenleri ile işlem x çözücü tipi interaksiyonunun etkisi istatistiki olarak $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Belirlenen kadmiyum değerleri Avrupa Birliği Komisyonu yönetmeliği (1881/2006, European Commission 2006)'nde sebzeler ve bitkiler için belirlenmiş olan sınırın (0,20 mg/kg yaş ağırlık) çok altında kalmıştır.

Nikel, bazı bitki ve bakteri enzimlerinin katalitik aktivitesi için esansiyel bir elementtir. Ancak, insan vücudundaki biyokimyasal işlevleri ve beslenme ihtiyaç miktarı henüz belirlenememiştir. Zicari *et al.* (2011) nikelin insanlar için düşük konsantrasyonlarda mikro besleyici bir madde olabileceğini ancak ağız yoluyla alındığında büyük dozların toksik olabileceğini ifade etmişlerdir. Bununla birlikte günlük alınan 500 µg'lık dozun el egzamasını ağırlaştırdığı tespit edilmiş ve günlük alım sınırının bu dozun altında olması gerektiği vurgulanmıştır (European Food Safety Authority 2006). Çalışmamızda salamura çadır, ekstraktlar ve esansiyel yağda nikel elementi saptanmamıştır.

Kurşun, insan vücudunda tespit edilmiş hiçbir biyokimyasal ve fizyolojik görevi olmayan toksik etkiye sahip bir ağır metaldir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından II. Sınıf kanserojen bir metal (Osma 2009) olarak sınıflandırılmaktadır. Gıdalara daha çok kirli hava, su ve toprak yoluyla bulaşmaktadır. Bu toksik metal açısından ekstraktlar ve esansiyel yağ değerlendirildiğinde; esansiyel yağda kurşun saptanmamış olup, ekstraktlarda ise kurşun miktarının 1,048 ppm (klasik yöntemle elde edilmiş etanol: su ekstraktı) ile 2,130 ppm (ultrasonik yöntemle elde edilmiş metanol: su ekstraktı) aralığında değişim gösterdiği

görülmektedir. Yapılan varyans analizinde, işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun ekstraktların kurşun miktarları üzerine $p<0,01$ düzeyinde etkili olduğu görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO 1993) haftalık olarak alınan 1,5 ve 175 mg arası kurşunun tolere edilebilir olduğunu rapor etmiştir. Salamura çayı, ekstraktları ve esansiyel yağı için kurşun düzeyleri belirtilen toksik limitlerin altında kalmaktadır.

İnsan sağlığına zararlı etkileri olan diğer bir element civadır. Sinir sistemimiz civaya karşı oldukça hassastır. Civadan etkilenen başka bir sistem ise boşaltım sistemidir (İstanbuluoğlu 2011). Yapılan analizlerde salamura çayı, ekstraktlar ve esansiyel yağda bu toksik elemente rastlanmamıştır.

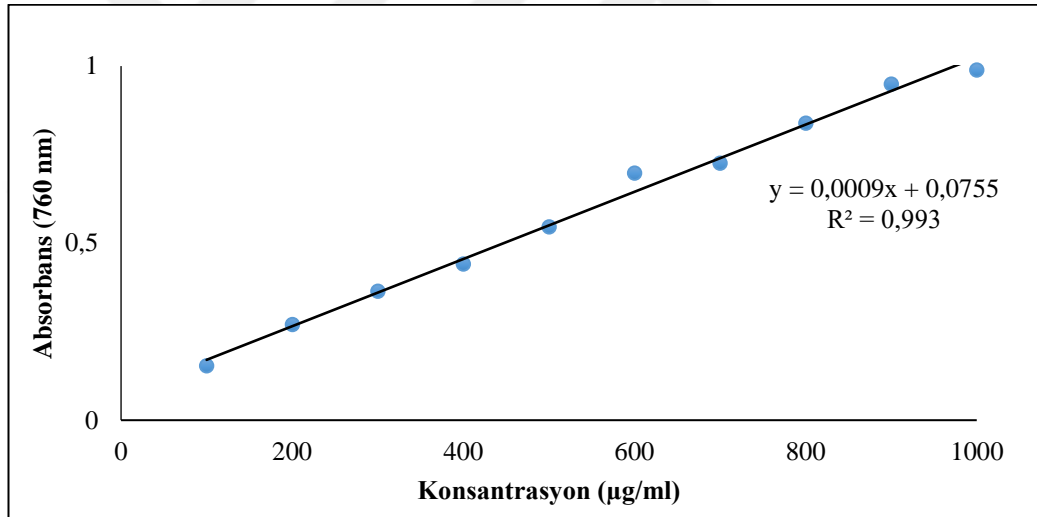
İnsanların gıda ambalajları, mutfak aletleri, ilaçlar veya içme suları aracılığıyla fazlaca alüminyuma maruz kalmaları (You and Song 2013) ve bu elementin insanlar üzerindeki muhtemel olumsuz etkileri nedeniyle son zamanlarda iz miktarının belirlenmesine olan ilgi artmaktadır (Mailloux *et al.* 2011). Özellikle çözülmüş formu biyoyararlanım ve toksisitesi yüksek olduğundan daha önemli olarak görülmektedir (Luo and Bi 2003). JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), alüminyum bileşikleri vücuda alındığında metabolizmanın tolere edebileceği limiti haftada 2 mg/kg olarak belirlemiştir (WHO 2012). Ekstraktlar ve esansiyel yağın alüminyum içeriği 0,558-57,210 ppm aralığında belirlenmiştir. Çizelge 4.5’de verilen varyans analizi sonuçlarına göre; ekstraktların içerdiği alüminyum miktarları üzerine, çözücü tipi değişkeni ile işlem x çözücü tipi interaksiyonu $p<0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli olarak belirlenmiştir. Ayrıca, en yüksek alüminyum değerinin ultrasonik kloroform ekstraktına ait olduğu saptanmıştır.

4.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Singleton ve arkadaşları tarafından toplam fenolik madde miktarını ölçmek için kullanılan bu yöntem, bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayracı ile oksitlenen fenolik bileşiklerin oluşturduğu mavi renkli kompleksin 760 nm’de absorbanasının belirlenmesine

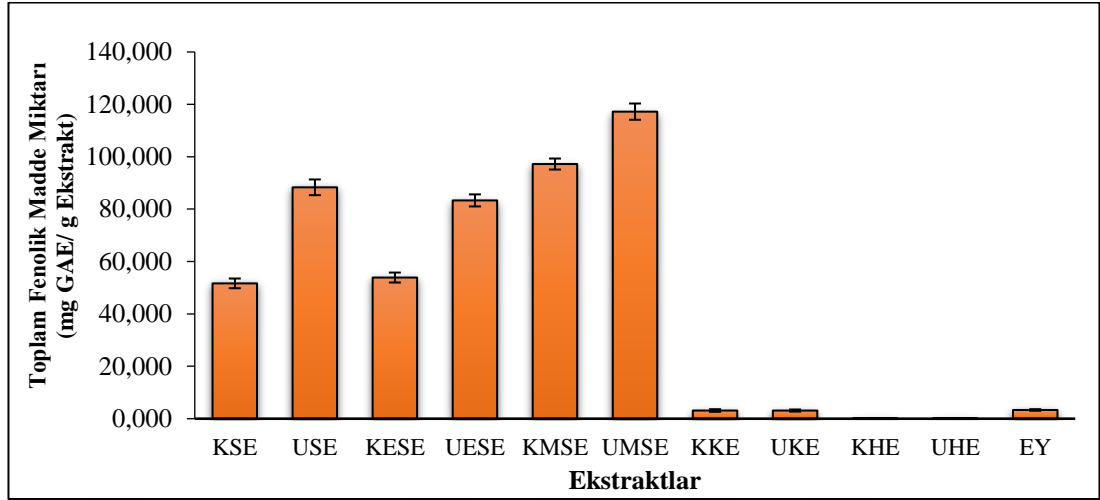
dayanmaktadır (Albayrak 2010). Metotta standart bileşik olarak; gallik asit, tannik asit, klorojenik asit, kafeik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferrulik asit kullanılabilir (Prior *et al.* 2005). Bitkisel ekstraktlar ve gıdaların antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir.

Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktlar ve esansiyel yağda toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi amacıyla standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Standart grafikten elde edilen denklem ($y=0,0009x+0,0755$ $R^2 = 0,993$) yardımıyla toplam fenolik madde miktarı gallik asit ekivaleni (GAE) olarak hesaplanmıştır. Analiz için hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.3’de verilmiştir.



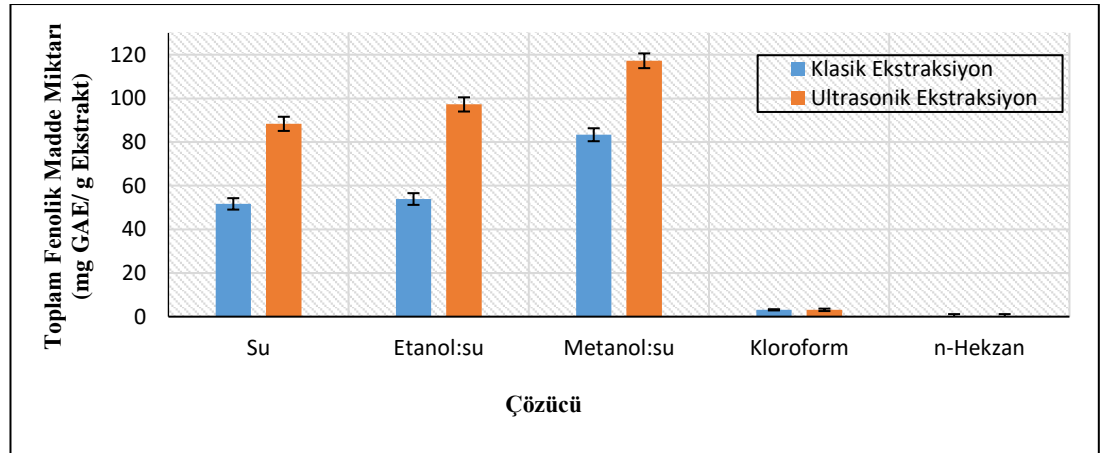
Şekil 4.3. Toplam fenolik madde miktarı tayini için gallik asit kullanılarak hazırlanan standart grafik

Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktlar ve esansiyel yağda belirlenmiş olan toplam fenolik madde miktarları Şekil 4.4 ve Çizelge 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.4. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağın toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması

Şekil 4.5 incelendiğinde çözücü türü değişikçe ilgili ekstraktta tespit edilen toplam fenolik madde miktarının değiştiği ve ultrason uygulamasının klasik yöntemle kıyasla toplam fenolik madde miktarını artırdığı görülmektedir.



Şekil 4.5. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi

Çizelge 4.7 incelendiğinde, esansiyel yağ ve ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının 0,110 mg GAE/g ile 117,222 mg GAE/g arasında oldukça geniş bir aralıkta değişim gösterdiği görülmektedir. Tespit edilen en düşük toplam fenolik madde miktarı

klasik n-hekzan ekstraktına ait iken, en yüksek değer ultrasonik metanol: su ekstraktına aittir. LC-MS/MS ile belirlenen fenolik bileşen profilinde kullanılan standart fenolik bileşenleri toplamda en yüksek konsantrasyonda içeren örneğin de ultrasonik metanol: su ekstraktı olması belirlemiş olduğumuz sonucu desteklemektedir. Kloroform ve n-hekzanın çözücü olarak kullanıldığı ekstraktlar ile esansiyel yağın, diğer ekstraktlara kıyasla toplam fenolik madde miktarlarının çok düşük olduğu da dikkat çekmektedir.

Çizelge 4.7. Ekstraktlar ve esansiyel yağda bulunan toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları

| Ekstrakt | Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g Ekstrakt) | Toplam Flavonoid Madde Miktarı (mg KE/g Ekstrakt) |
|----------|--|---|
| KSE | 51,660±2,616 ^b | 13,012±1,131 ^c |
| USE | 88,333±4,243 ^c | 13,976±0,919 ^{cd} |
| KESE | 53,889±2,687 ^b | 14,699±0,460 ^d |
| UESE | 83,333±2,970 ^c | 18,193±0,354 ^e |
| KMSE | 97,222±3,253 ^d | 20,843±1,237 ^f |
| UMSE | 117,222±4,384 ^e | 21,325±0,984 ^f |
| KKE | 3,120±0,283 ^a | 1,796±0,081 ^b |
| UKE | 3,111±0,566 ^a | 1,815±0,007 ^b |
| KHE | 0,110±0,042 ^a | 0,020±0,008 ^a |
| UHE | 0,130±0,028 ^a | 0,030±0,003 ^a |
| EY | 3,333±1,768 ^a | 1,710±0,106 ^b |

*GAE: Gallik Asit Ekvivalen, *KE: Kuersetin Ekvivalen

* Her sütun için istatistikî analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar P<0,05 önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.8’de verilen varyans analizinde görüldüğü gibi, ekstraktların toplam fenolik madde miktarı üzerine işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü etkileşiminin etkisi p<0,01 düzeyinde çok önemlidir.

Çizelge 4.8. Toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde değerlerine ait varyans analiz sonuçları

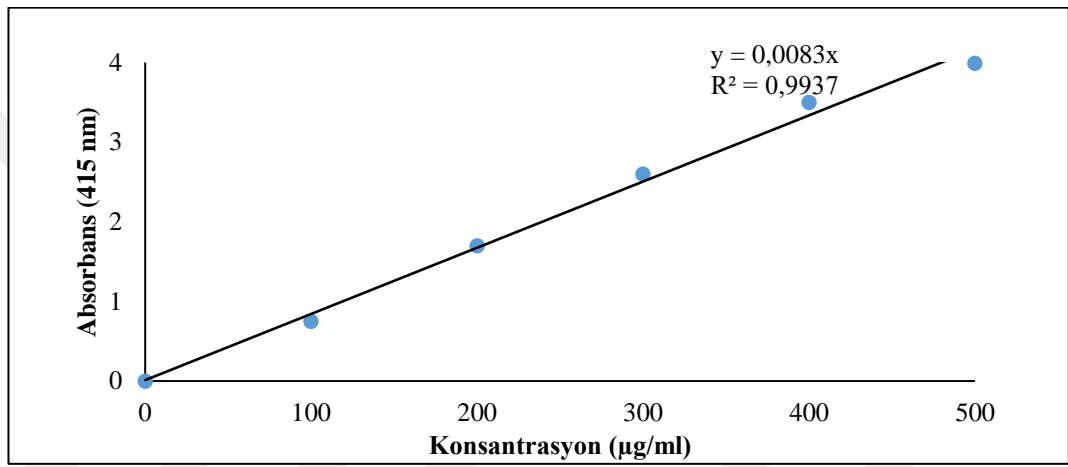
| Varyasyon Kaynağı | SD | Toplam Fenolik Madde | | | Toplam Flavonoid Madde | | |
|-------------------|----|----------------------|----------|---------|------------------------|---------|---------|
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 2594,915 | 365,031 | 0,000** | 0,848 | 1,708 | 0,221 |
| Çözücü | 4 | 8266,766 | 1162,889 | 0,000** | 341,613 | 687,637 | 0,000** |
| A x B | 4 | 444,052 | 62,465 | 0,000** | 3,130 | 6,301 | 0,008** |
| Hata | 20 | 7,109 | | | 0,497 | | |
| Genel | 30 | | | | | | |

*p<0,05 düzeyinde önemli **p<0,01 düzeyinde önemli

Google Scholar, Science Direct, Web of Science ve Pub Med veri tabanlarında yapılan literatür taramalarında, *Ferula orientalis*'in toplam fenolik madde miktarının belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Ancak, araştırma kapsamı genişletildiğinde; diğer *Ferula* türlerinin toplam fenolik madde miktarının belirlendiği bazı çalışmalar görülmektedir. Bu çalışmalardan biri, Akbarian *et al.* (2017) tarafından İran'da yetişen 15 farklı *Ferula* türünün morfolojik özellikleri ve antioksidan aktivitesinin belirlendiği çalışmadır. Çalışma kapsamında belirlenen toplam fenolik madde miktarları; farklı bölgelerinde yetişen *F.assafoetida* bitkilerinde 12,77±0,45-84,63±5,41 mg TAE (Tannik Asit Ekvivalenti)/g aralığında, *F.ovina* bitkilerinde 26,86±0,65-90,98±0,3 mg TAE/g aralığında ve *F.gummosa* bitkilerinde 12,83±0,75-13,64±0,55 mg TAE/g aralığında belirlenmiştir. Belirlenen diğer çalışmalarda ise toplam fenolik madde miktarları; *F.assafoetida* oleogam reçinesinde 55.56-90.14 mg GAE/g aralığında (Kavoosi and Rowshan 2013), *Ferula lutea* çiçeklerinin n-bütanol ve etil asetat ekstraktlarında sırasıyla; 52,3±0,4 mg GAE/g ve 40,7±0,2 mg GAE/g (Znati *et al.* 2014), *F.assafoetida* metanolik ekstraktında 94,8±5,9 mg GAE/g (Dehpour *et al.* 2009) ve *F. microcolea* metanolik ekstraktının polar ve apolar alt fraksiyonlarında sırasıyla; 211,4±1,9 ve 50,1±0,4 µg GAE/ mg (Amiri 2014) olarak rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada, *F. orientalis* ekstraktlarına ait veriler Dehpour *et al.* (2009) tarafından belirtilen sonuçlarla kıyaslandığında; *F.assafoetida* metanol ekstraktının toplam fenolik madde içeriğinin; *F. orientalis* klasik metanol: su ekstraktından yüksek, ultrasonik metanol: su ekstraktından ise oldukça düşük olduğu görülmektedir.

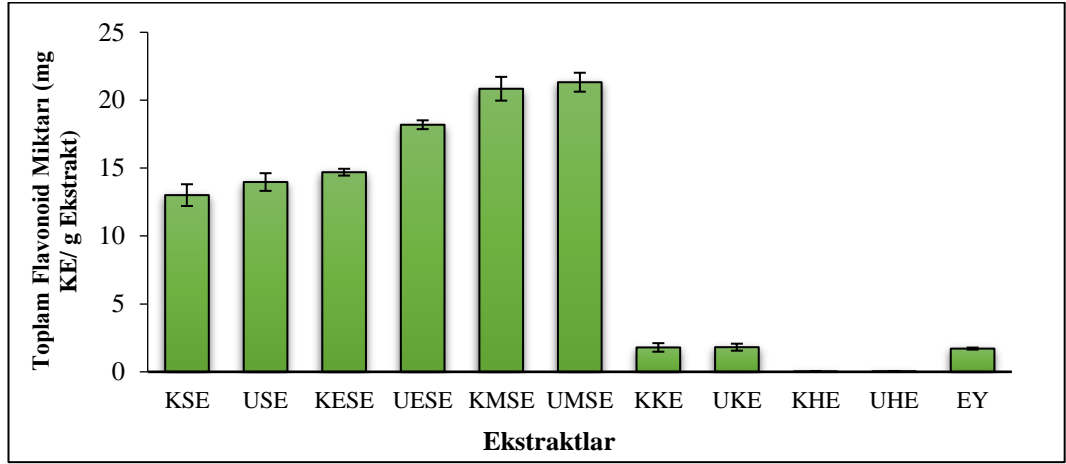
4.5. Toplam Flavonoid Miktarı

Flavonoidler, fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Standart olarak kuersetin kullanılarak çizilen grafikten (Şekil 4.6) elde edilen denklem ($y=0,0083x$ $R^2=0,994$) yardımıyla klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağın toplam flavonoid miktarları hesaplanmıştır.



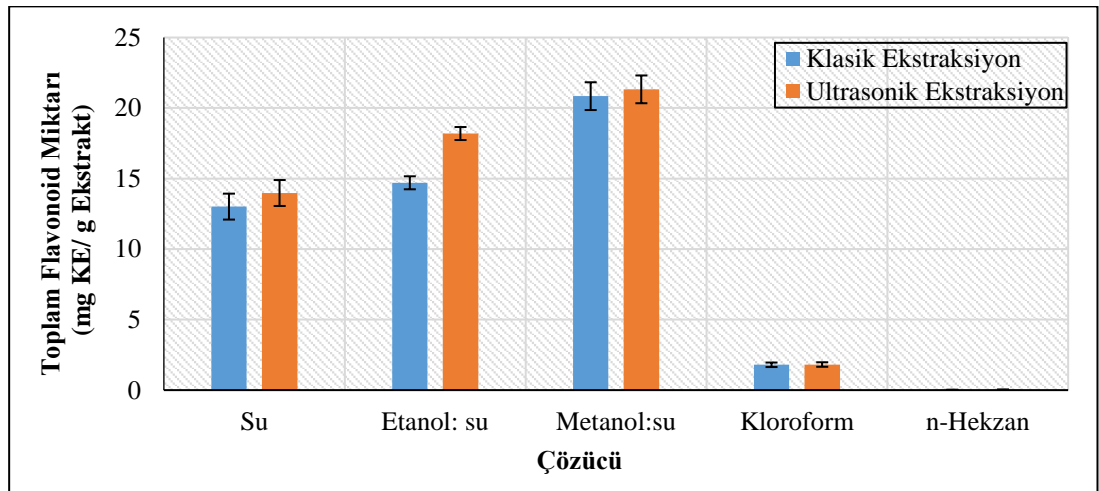
Şekil 4.6. Toplam flavonoid tayini için hazırlanmış olan standart grafik

Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağın toplam flavonoid madde miktarları Şekil 4.7 ve Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Çizelge 4.8'de verilen varyans analizi sonuçlarında görüldüğü gibi, toplam flavonoid madde miktarı üzerine çözücü türü değişkeni ile işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi istatistiki olarak $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli; işlem değişkeni ise $p > 0,05$ düzeyinde önemsizdir.



Şekil 4.7. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen ekstraktlar ve esansiyel yağın toplam flavonoid madde miktarlarının karşılaştırılması

Şekil 4.8 incelendiğinde çözücü türü değişikçe ilgili ekstraktta tespit edilen toplam flavonoid madde miktarının değiştiği ve ultrason uygulamasının klasik yöntemle kıyasla toplam flavonoid madde miktarını artırdığı görülmektedir.



Şekil 4.8. Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi

Çizelge 4.7 incelendiğinde, esansiyel yağ ve ekstraktların toplam flavonoid madde miktarlarının 0,020 mg KE/g ile 21,325 mg KE/g arasında değişim gösterdiği görülmektedir. En düşük toplam flavonoid madde miktarı klasik n-hekzan ekstraktında,

en yüksek değer ise ultrasonik metanol: su ekstraktında tespit edilmiştir. Ekstraktlar ve esansiyel yağın toplam flavonoid madde miktarının toplam fenolik madde miktarlarına paralel olarak artış gösterdiği görülmektedir. **EK 1**'de görüldüğü gibi toplam fenolik madde ile toplam flavonoid madde miktarları arasında $p < 0,01$ seviyesinde pozitif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir ($r=0,973$). Ayrıca, kloroform ve n-hekzanın çözücü olarak kullanıldığı ekstraktlar ile esansiyel yağın, diğer ekstraktlara kıyasla toplam flavonoid madde miktarlarının çok düşük olduğu da dikkat çekmektedir.

Bir ekstraktın çözünen madde bileşimi ve bileşen miktarları kullanılan çözücü ve çözünen maddenin kimyasal yapısına göre değişim göstermektedir. Fenolik bileşiklerde ise bitki materyalinden ekstraksiyon büyük ölçüde kullanılan solvente bağlıdır (Farnad *et al.* 2014). Metanolün antioksidan özellik gösteren bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili bir çözücü olduğu kanıtlanmıştır (Arabshahi-Delouee and Urooj 2007).

Google Scholar, Science Direct, Web of Science ve Pub Med veri tabanlarında yapılan literatür taramalarında, *F. orientalis*'in toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Ancak, araştırma kapsamı genişletildiğinde; diğer *Ferula* türlerinin toplam flavonoid madde miktarının belirlendiği bazı çalışmalar görülmektedir. Bu kapsamda, Akbarian *et al.* (2017)'ın İran'ın farklı bölgelerinde yetişen 15 farklı *Ferula* türünün morfolojik özellikleri ve antioksidan aktivitesini belirledikleri çalışmada toplam flavonoid madde miktarları; *F. assafoetida* bitkilerinde $5,45 \pm 0,11 - 7,72 \pm 0,21$ mg KE/g, *F. ovina* bitkilerinde $6,22 \pm 0,10 - 8,09 \pm 0,15$ mg KE/g ve *F. gummosa* bitkilerinde $6,07 \pm 0,12 - 8,02 \pm 0,04$ mg KE/g olarak tespit edilmiştir. Farklı çalışmalarda ise toplam flavonoid madde miktarları; *F. assafoetida* oleogam reçinesinde $21,48 \pm 1,33 - 35,75 \pm 2,5$ mg KE/g (Kavoosi and Rowshan 2013), *F. lutea* çiçeklerinin n-bütanol ve etil asetat ekstraktlarında sırasıyla; $14,7 \pm 0,1$ mg KE/g ve $12,4 \pm 0,1$ mg KE/g (Znati *et al.* 2014), *F. assafoetida* metanolik ekstraktında $90,9 \pm 6,3$ mg KE/g (Dehpour *et al.* 2009) ve *F. microcolea* metanolik ekstraktının polar ve apolar alt fraksiyonlarında sırasıyla; $37,6 \pm 0,4$ ve $19,4 \pm 0,3$ µg KE/mg (Amiri 2014) olarak belirlenmiştir. Dehpour *et al.* (2009) tarafından *F. assafoetida*'nın metanolik ekstraktında tespit edilmiş olan toplam flavonoid madde miktarının *Ferula*

orientalis'in klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş metanol: su ekstraktları ile kıyaslandığında; *F.assa-foetida* metanol ekstraktının toplam flavonoid madde içeriğinin, elde ettiğimiz verilerden çok yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, çalışmamızda çözücü olarak saf metanolün kullanılırsaydı toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarının daha yüksek çıkabileceğini düşündürmektedir.

4.6. LC-MS/MS ile Belirlenen Fenolik Bileşen Profili

Bitkilerde yüksek düzeyde bulunan sekonder metabolitler olan fenolik bileşikler daha önce de değinildiği gibi; kardiyovasküler hastalıkları önlemenin (Cassidy 2017) yanı sıra sergiledikleri antidiyabetik (Huang *et al.* 2015), antioksidan (Benmeddour *et al.* 2013; Wu *et al.* 2015) ve nöroprotektif aktivite (Jones *et al.* 2012) gibi potansiyel faydalar sebebiyle son zamanlarda oldukça dikkat çeken bileşikler haline gelmişlerdir. Günümüzde bu konuda birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen; *Ferula orientalis* L. bitkisinin fenolik bileşen profilinin daha önceden belirlenmemiş olması nedeniyle yapılan çalışma bu konuda ilk araştırma olma özelliği taşımaktadır.

Ferula orientalis L. bitkisinin klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen; su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarına ait fenolik bileşen profilleri LC-MS/MS cihazı ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Analizde, 19 standart fitokimyasal bileşik kullanılmıştır. Kullanılan standart bileşikler;

- Fenolik asitlerden; klorojenik asit, kafeik asit, 4-hidroksi benzoik asit, gallik asit, p-kumarik asit, gentisik asit, salisilik asit, prokateşuik asit ve
- Flavanoidlerden
 - Flavonlar: Apigenin, diosmin, luteolin-7-o-glukozit, apigenin-7-o-glukozit, tangeretin, baicalin ve gardenin-B,
 - Flavanonlar: Hesperidin,
 - Flavanoller: Morin, rutin ve kuersetindir.

Standart fitokimyasal bileşiklere ait LC-MS/MS parametreleri Çizelge 4.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Standart fenoik bileşiklere ait LC-MS/MS parametreleri

| Fenolikler | RT | +/- | MS ¹ (m/z) | MS ² (m/z) |
|-----------------------|------|-----|-----------------------|-----------------------|
| Tangeretin | 7,09 | + | 372.60 | 297.10 |
| Baicalin | 4,33 | + | 447.00 | 271.10 |
| Gardenin-B | 7,88 | + | 358.60 | 329.00 |
| Gentisik Asit | 3,13 | - | - | 108.10 |
| Klorojenik Asit | 3,11 | - | 352.90 | 191.10 |
| Kafeik Asit | 3,59 | - | 179.00 | 134.10 |
| Rutin | 3,78 | - | - | 300.00 |
| p-Kumarik Asit | 4,16 | - | 163.00 | 119.10 |
| Hesperidin | 4,23 | - | 609.00 | 301.50 |
| Apigenin-7-O-glikozit | 4,24 | - | - | 268.10 |
| Kuersetin | 5,04 | - | 300.90 | 151.10 |
| Protokateşuik Asit | 3,12 | - | - | 108.10 |
| Gallik Asit | 2,34 | - | 169.10 | 125.10 |
| 4-OH-Benzoik Asit | 4,46 | - | 137.20 | 93.00 |
| Diosmin | 4,13 | - | 607.30 | 284.00 |
| Morin | 5,04 | - | - | 151.10 |
| Apigenin | 5,60 | - | 269.10 | 117.10 |
| Salisilik Asit | 4,49 | - | - | 93,00 |
| Luteolin-7-O-glukozit | 3,94 | - | 447.20 | 300.20 |

*RT: alıkonma süresi

** MS^(m/z): Standart bileşenlerin moleküler iyonları (kütle: yük oranı)

Çizelge 4.10'da *Ferula orientalis* L. bitkisine ait ekstraktlarda tespit edilen fenolik bileşenler ortalama değerleri \pm standart sapma şeklinde verilmiştir. Çizelge incelendiğinde, kullanılan fenolik standartların, düşük veya yüksek düzeyde ancak her örnekte tespit edildiği görülmektedir.

Çizelge 4.10. Su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarının LC-MS/MS ile kantitatif analizi

| | MF | RT (dk) | mg Fenolik Bileşen/g Ekstrakt | | | | | |
|------------------------------|---|-------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | | KSE | USE | KESE | UESE | KMSE | UMSE |
| Gentisik Asit | C ₇ H ₆ O ₄ | 2,96 | 0,325±0,010 e | 0,251±0,002 d | 0,063±0,001 c | 0,625±0,010 f | 0,019±0,002 a | 0,027±0,001 b |
| Klorojenik Asit | C₁₆H₁₈O₉ | 3,12 | 13,042±0,020 a | 28,799±0,030 e | 19,950±0,050 c | 32,843±0,030 f | 15,238±0,012 b | 25,554±0,030 d |
| Kafeik Asit | C ₉ H ₈ O ₄ | 3,60 | 0,118±0,003 d | 0,125±0,000 e | 0,125±0,000 e | 0,106±0,000 c | 0,061±0,000 b | 0,055±0,001 a |
| p-Kumarik Asit | C ₉ H ₈ O ₃ | 3,58 | 0,199±0,010 d | 0,184±0,003 c | 0,088±0,002 b | 0,089±0,001 b | 0,084±0,002 a | 0,087±0,003 b |
| Protokateşuik Asit | C ₇ H ₆ O ₄ | 2,95 | 0,015±0,001 b | 0,016±0,001 c | 0,012±0,001 a | 0,016±0,001 c | 0,012±0,000 a | 0,018±0,002 d |
| Gallik Asit | C ₇ H ₆ O ₅ | 2,55 | 0,213±0,010 e | 0,197±0,000 d | 0,159±0,010 c | 0,154±0,006 b | 0,250±0,005 f | 0,125±0,006 a |
| Salisilik Asit | C ₇ H ₆ O ₃ | 4,47 | 0,490±0,010 f | 0,385±0,010 a | 0,437±0,010 b | 0,466±0,010 d | 0,451±0,006 c | 0,473±0,010 e |
| 4-OH Benzoik Asit | C ₇ H ₆ O ₃ | 4,46 | 0,431±0,007 a | 0,566±0,010 e | 0,449±0,000 b | 0,478±0,005 c | 0,484±0,010 d | 0,799±0,030 f |
| Tangeretin | C ₂₀ H ₂₀ O ₇ | 7,13 | 0,010±0,000 a | 0,015±0,000 c | 0,010±0,000 a | 0,013±0,000 b | 0,016±0,000 d | 0,010±0,002 a |
| Baicalin | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 4,39 | 0,015±0,000 c | 0,015±0,001 c | 0,014±0,000 b | 0,017±0,000 d | 0,008±0,000 a | 0,008±0,001 a |
| Gardenin-B | C ₁₉ H ₁₈ O ₇ | 7,92 | 0,012±0,004 b | 0,019±0,001 d | 0,010±0,001 a | 0,010±0,000 a | 0,015±0,000 c | 0,012±0,000 b |
| Rutin | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 3,79 | 0,005±0,000 a | 0,008±0,000 b | 0,026±0,001 d | 0,054±0,000 e | 0,005±0,000 a | 0,015±0,003 c |
| Hesperidin | C ₁₆ H ₁₄ O ₆ | 4,88 | 0,256±0,010 d | 0,287±0,010 e | 0,075±0,002 a | 0,078±0,000 b | 0,195±0,010 c | 0,482±0,010 f |
| Apigenin-7-O-Glikozit | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 4,95 | 0,011±0,002 a | 0,016±0,001 d | 0,118±0,010 f | 0,098±0,004e | 0,015±0,000 c | 0,012±0,000 b |
| Kuersetin | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 5,17 | 0,016±0,002 a | 0,033±0,000 b | 0,117±0,005 f | 0,058±0,001 c | 0,068±0,000 e | 0,065±0,000 d |
| Diosmin | C₂₈H₃₂O₁₅ | 4,14 | 2,580±0,010 a | 5,815±0,020 b | 13,459±0,010 d | 12,878±0,010 c | 14,263±0,020 e | 23,652±0,030 f |
| Morin | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 5,17 | 0,009±0,000 a | 0,048±0,002 b | 0,089±0,004 d | 0,114±0,002 f | 0,065±0,001 c | 0,112±0,000 e |
| Apigenin | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 5,61 | 0,012±0,001 a | 0,015±0,001 b | 0,020±0,001 e | 0,021±0,001 f | 0,019±0,003 d | 0,017±0,002 c |
| Luteolin-7-Glukozit | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 4,49 | 0,128±0,003 a | 0,258±0,005 c | 0,325±0,010 d | 0,254±0,010 b | 0,325±0,010 d | 0,342±0,010 e |

*RT: Retention Time (Alıkonma süresi),

** MF: Moleküler Formül,

***Her satır için istatistiki analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar P<0,05 önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

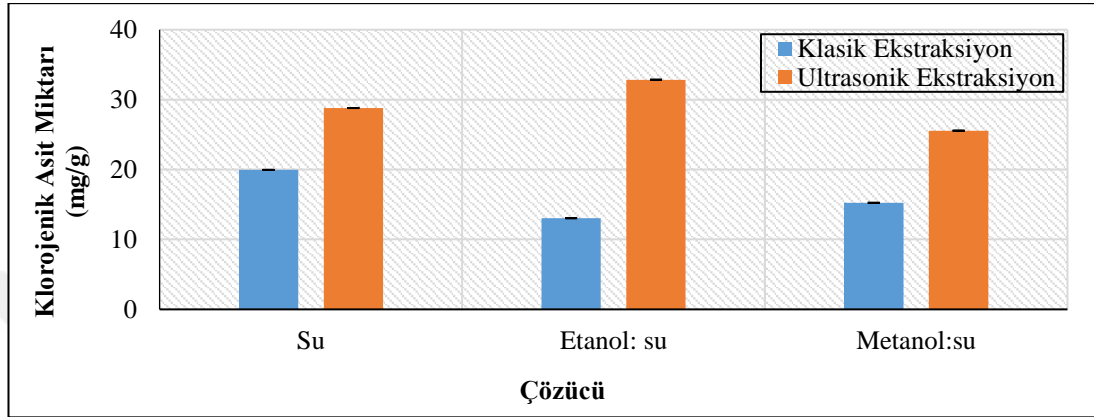
Ekstraktlarda majör bileşen olarak belirlenen klorojenik asit, 13,042- 32,843 mg/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. UESE, ekstraktlar arasında en yüksek düzeyde klorojenik asit içeren ekstrakt iken; KSE'nın diğer ekstraktlara kıyasla en düşük düzeyde klorojenik asit içerdiği görülmektedir. Klorojenik asite ait varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde, işlem ve çözücü değişkeni ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun klorojenik asit üzerine etkisi $p<0,01$ düzeyinde çok önemli olarak belirlenmiştir. Ayrıca, tüm ekstraktlarda ultrason uygulamasının klorojenik asit ekstraksiyonunu belirgin şekilde artırdığı da dikkat çekmektedir. Klasik solvent ekstraksiyon metodlarıyla kıyaslandığında ultrason yardımcı ekstraksiyon yönteminin fenolik bileşenlerin kazanımını önemli düzeyde artırdığı Mane *et al.* (2015) tarafından da ifade edilmektedir. Benzer bir sonuç Li *et al.* (2005) tarafından, %70'lik konsantrasyonda metanol, 20:1 çözücü: numune oranı ve 30 dk süreyle uygulanan ultrason yardımcı ekstraksiyon yönteminin, diğer klasik ekstraksiyon yöntemlerine göre, *Eucommia ulmodies* Oliv.'in taze yaprak, taze kabuk ve kurutulmuş kabuklarından klorojenik asidin daha yüksek verimle geri kazanımının sağlanmasıdır.

Çizelge 4.11. Çayır ekstraktlarının fenolik bileşenlerine ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | Gentisik Asit | | | Klorojenik Asit | | | Kafeik Asit | | | p-Kumarik Asit | | | Prokateşuik Asit | | |
|-------------------|----|----------------|----------|---------|-----------------------|------------|---------|-------------|---------|---------|----------------------|---------|---------|------------------|------------|---------|
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 0,082 | 1223,960 | 0,000** | 496,808 | 259474,797 | 0,000** | 0,029 | 1,129 | 0,000** | 0,001 | 39,690 | 0,001** | 0,011 | 182886,914 | 0,000** |
| Çözücü (B) | 2 | 0,118 | 1755,244 | 0,000** | 16,018 | 8366,061 | 0,000** | 0,08 | 0,319 | 0,000** | 0,027 | 801,160 | 0,000** | 0,010 | 165249,657 | 0,000** |
| A x B | 2 | 0,120 | 1786,408 | 0,000** | 32,935 | 17201,269 | 0,000** | 0,026 | 1,010 | 0,000** | 0,001 | 32,520 | 0,001** | 0,009 | 153804,057 | 0,000** |
| Hata | 6 | 0,0000670 | | | 0,002 | | | 0,026 | | | 0,00025 | | | 0,000000058 | | |
| Genel | 12 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Varyasyon Kaynağı | SD | Salisilik Asit | | | 4-OH Benzoik Asit | | | Tangeretin | | | Baicalin | | | Gardenin-B | | |
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 0,082 | 1223,960 | 0,000** | 496,808 | 259474,797 | 0,000** | 0,029 | 1,129 | 0,000** | 0,001 | 39,690 | 0,001** | 0,011 | 182886,914 | 0,000** |
| Çözücü (B) | 2 | 0,118 | 1755,244 | 0,000** | 16,018 | 8366,061 | 0,000** | 0,08 | 0,319 | 0,000** | 0,027 | 801,160 | 0,000** | 0,010 | 165249,657 | 0,000** |
| A x B | 2 | 0,120 | 1786,408 | 0,000** | 32,935 | 17201,269 | 0,000** | 0,026 | 1,010 | 0,000** | 0,001 | 32,520 | 0,001** | 0,009 | 153804,057 | 0,000** |
| Hata | 6 | 0,0000670 | | | 0,002 | | | 0,026 | | | 0,00025 | | | 0,000000058 | | |
| Genel | 12 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Varyasyon Kaynağı | SD | Hesperidin | | | Apigenin-7-O-Glikozit | | | Kuersetin | | | Diosmin | | | Morin | | |
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 0,082 | 1223,960 | 0,000** | 496,808 | 259474,797 | 0,000** | 0,029 | 1,129 | 0,000** | 0,001 | 39,690 | 0,001** | 0,011 | 182886,914 | 0,000** |
| Çözücü (B) | 2 | 0,118 | 1755,244 | 0,000** | 16,018 | 8366,061 | 0,000** | 0,08 | 0,319 | 0,000** | 0,027 | 801,160 | 0,000** | 0,010 | 165249,657 | 0,000** |
| A x B | 2 | 0,120 | 1786,408 | 0,000** | 32,935 | 17201,269 | 0,000** | 0,026 | 1,010 | 0,000** | 0,001 | 32,520 | 0,001** | 0,009 | 153804,057 | 0,000** |
| Hata | 6 | 0,0000670 | | | 0,002 | | | 0,026 | | | 0,00025 | | | 0,000000058 | | |
| Genel | 12 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Varyasyon Kaynağı | SD | Apigenin | | | Gallik Asit | | | Rutin | | | Luteolin-7- Glukozit | | | | | |
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | | | |
| İşlem (A) | 1 | 0,036 | 360,030 | 0,000** | 0,036 | 360,030 | 0,000** | 0,036 | 360,030 | 0,000** | 0,009 | 68,188 | 0,000** | | | |
| Çözücü (B) | 2 | 0,005 | 54,236 | 0,000** | 0,005 | 54,236 | 0,000** | 0,005 | 54,236 | 0,000** | 0,079 | 577,526 | 0,000** | | | |
| A x B | 2 | 0,009 | 95,030 | 0,000** | 0,009 | 95,030 | 0,000** | 0,009 | 95,030 | 0,000** | 0,004 | 32,284 | 0,001** | | | |
| Hata | 6 | 0,000099 | | | 0,000099 | | | 0,000099 | | | 0,000 | | | | | |
| Genel | 12 | | | | | | | | | | | | | | | |

*p<0,05 düzeyinde önemli **p<0,01 düzeyinde önemli

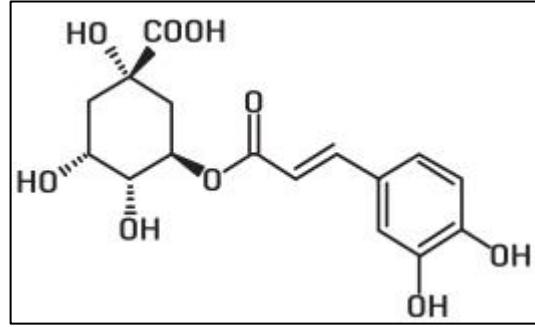
Şekil 4.9 incelendiğinde çözücü türü değişikçe ilgili ekstraktta tespit edilen klorojenik asit miktarının değiştiği ve ultrason uygulamasının klasik yöntemle kıyasla klorojenik asit miktarını artırdığı görülmektedir.



Şekil 4.9. Ekstraktların klorojenik asit miktarları üzerine işlem x çözücü etkisinin etkisi

Ferula orientalis L. su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarının baskın bileşeni olan klorojenik asit (Şekil 4.10) bir kafeik ve kuinik asit esteridir (Chen and Ho 1997). Bitkilerin tohum, kök ve yaprakları ile özellikle kahve çekirdekleri ve elma, armut, şeftali, erik, kayısı, kiraz, yaban mersini, çilek, patlıcan, domates ve patates gibi birçok meyve ve sebze de değişik formlarda bulunmaktadır (Naczki and Shahidi 2004). Klorojenik asitin antioksidan, antikanserijen ve antiinflamatuvar özelliklerinin olduğu rapor edilmektedir (Dorea *et al.* 2005; Bonita *et al.* 2007). Bu fenolik bileşik, yüksek antioksidan aktivitesi sayesinde saç ağarması ve deride buruşmanın engellenmesi ile kalp hastalıkları riskinin azaltılması için serbest radikallere karşı adeta bir savunma mekanizması oluşturmaktadır (Jang *et al.* 2014).

Ferula türleri kapsamında yapılan literatür taramasında klorojenik asit ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak, Delnavazi *et al.* (2015) *Apiaceae* familyasından *Dorema glabrum* bitkisine ait n-hekzan, kloroform, etil asetat ve metanol ekstraktlarından; Zidorn and Perry (2002) ise, *Anistome pilifera* ekstraktlarından klorojenik asiti ekstrakte ettiklerini rapor etmişlerdir.

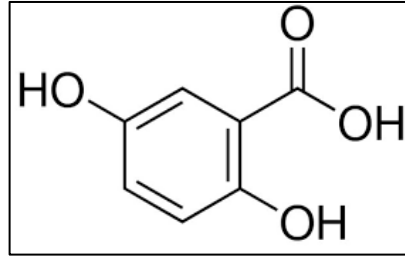


Şekil 4.10. Klorojenik asitin moleküler yapısı (Bilia *et al.* 2000)

Bir benzoik asit türevidir olan gentisik asit (2,5-dihidroksi benzoik asit) (Şekil 4.11), düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe etmekte ve lipid hidroperoksitlerinin oluşumunu engellemektedir (Exner *et al.* 2000; Ashidate *et al.* 2005). Bu özellik gentisik asitin serbest radikalleri ve diğer oksidanları süpürme kabiliyetine atfedilmektedir (Juurlink *et al.* 2014). Ma *et al.* (2014) gentisik asit üzerine yaptığı bir çalışmada, bu fenolik bileşiğin cilt rengini belirleyen, çil oluşumuna sebep olan ve ciddi estetik problemlere neden olabilen melanin pigmentinin üretimini sağlayan tirozinaz enzimini inhibe eden bir aydınlatıcı ajan olduğunu rapor etmektedir.

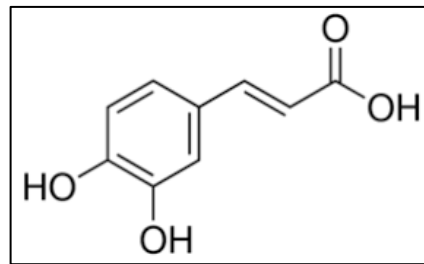
Yapılan çalışmaya ait bulgular incelendiğinde, *Ferula orientalis*'e ait klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında belirlenmiş olan gentisik asit düzeylerinin 0,019 mg/g ile 0,625 mg/g arasında değişim gösterdiği görülmektedir. En yüksek değer, ultrasonik yöntemle elde edilmiş etanol ekstraktına ait iken; klasik yöntem ile yapılan metanol: su ekstraksiyonunun en düşük gentisik asit konsantrasyonuna sahip olduğu saptanmıştır. Varyans analizi sonuçlarına göre, işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun ekstraktların gentisik asit miktarları üzerine $p < 0,01$ düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır. Yapılan literatür taramasında *Ferula* türlerinin gentisik asit içeriğinin belirlenmesi yönünde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, aloe vera bitkisinin yapraklarında 0,06 mg/g (López *et al.* 2013) düzeyinde; domates, kavun, salatalık, kivi, narenciyeler, üzüm, tarçın, karanfil, kakule, hindistan cevizi gibi meyve, sebze ve baharatlarda ise 0,04

mg/kg'a kadar (Tomas-Barberan and Clifford 2000), gentisik asit bulunduğu rapor edilmiştir.



Şekil 4.11. Gentisik asitin moleküler yapısı (Wikipedia 2018)

Ferulik ve p-kumarik asit gibi hidroksisinnamik asit grubunun bir üyesi olan kafeik asit (Şekil 4.12); marul, brokoli, ıspanak, elma, üzüm ve yaban mersini, zeytinyağı, kahve ve çay gibi birçok üründe doğal olarak oluşan bir polifenolik bileşiktir (Nardini *et al.* 2001; Bhat *et al.* 2007). İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan bu fenolik asit; antioksidan aktivite, enzim aktivitesi inhibisyonu (5- ve 12-lipoksigenazlar, glutatyon S-transferaz ve ksantin oksidaz üzerine), antitümör aktivitesi ve antienflamatuar etkinin yanı sıra vücutta kolesterol, fosfolipid, yağ asitleri ve trigliserit seviyelerinin düşürülmesi gibi oldukça geniş yelpazede biyolojik ve farmakolojik etkiler sergilemektedir (Nardini *et al.* 2001; Medina *et al.* 2012).

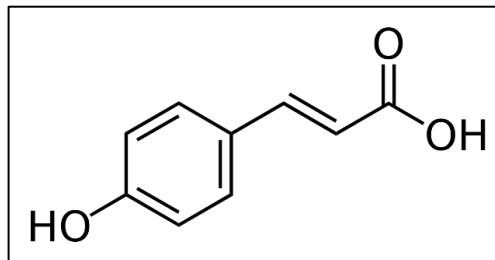


Şekil 4.12. Kafeik asitin moleküler yapısı (Nurdağ 2013)

Yapılan bu çalışmada kafeik asitin en yüksek klasik yöntem ile elde edilmiş etanol: su ekstraktında bulunduğu görülmektedir (0,125 mg/g). Çizelge 4.10'a göre, kafeik asitin en az çözüldüğü ekstraksiyon işlemi ise metanol: su çözücüsü ile yapılan ultrasonik

ekstraksiyondur (0,055 mg/g). İşlem ve çözücü değişkenleri ile işlem x çözücü interaksyonu ekstraktların kafeik asit içeriklerini $p < 0,01$ düzeyinde etkilemiştir. Yapılan literatür taramasında *Ferula* türlerinin kafeik asit içeriği üzerine yapılmış yalnızca iki araştırma tespit edilebilmiştir. NMR spektroskopisinin kullanıldığı bu çalışmalarda; Salem *et al.* (2013) *Ferula lutea* köklerinden kafeik asiti, El-Razek (2007) ise *Ferula assa-foetida* L. gamının metanol ekstraktından kafeik asit esterlerini izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

p-kumarik asit (Şekil 4.13), genellikle bitkiler ve mantarlarda serbest veya bağlı şekilde bulunan hidroksisinnamik asit grubundan fenolik bir bileşiktir. p-kumarik asitin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) peroksidasyonunu azalttığı, hücrel melanogenezi inhibe ettiği, antimutajenik, anti-genotoksik ve antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmektedir (Ferguson *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2007; Bodini *et al.* 2009). *Phaseolus vulgaris* (fasülye) (Luthria and Pastor-Corrales 2006), *Fistulina hepatica* (biftek mantarı) (Ribeiro *et al.* 2007), Komatsuna (uzak doğu kökenli bir bitki) (Khanam *et al.* 2012), ıspanak, marul (Kelebek *et al.* 2015), ginseng kök, yaprak ve meyvesi (Chung *et al.* 2015) ile *Ganoderma lucidum*, *Cantharellus cibarius*, *Lentinus sajorçaju* ve *Lactarius deliciosus* (Yıldız *et al.* 2015) gibi mantar türlerinde p- kumarik asit bulunduğu rapor edilmektedir. Ayrıca, portakal (Sousa *et al.* 2004), kiraz, kahve, çikolata ve şarapta (Abdel-Wahab *et al.* 2003) da bulunmaktadır.



Şekil 4.13. p-kumarik asitin moleküler yapısı

Yapılan varyans analizinde *Ferula orientalis*'in su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarının p-kumarik asit konsantrasyonu üzerine; işlem ve çözücü değişkenleri ile işlem x çözücü interaksyonunun $p < 0,01$ düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır (Çizelge

4.11). Çizelge 4.10 incelendiğinde p-kumarik asitin etanol ve metanol solventlerine kıyasla suda daha iyi çözüldüğü görülmektedir. En yüksek p- kumarik asit içeriği klasik su ekstraktına ait (0,199 mg/g) iken; en düşük miktar klasik metanol: su ekstraktına aittir (0,084 mg/g).

Web of Science, Scopus, Science Direct ve Scholar Google veri tabanlarında p-kumarik asit ve *Ferula* türleri üzerine yapılmış olan literatür taramalarında *Ferula* türlerinin p-kumarik asit içeriği üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak konu biraz genişletilip *F. orientalis*'in içerisinde bulunduğu *Apiaceae* familyasına bakıldığında; *Dorema aucher* üzerine yapılan bir çalışmada, bitki yapraklarının 0,245 mg/g, çiçeklerinin ise 0.528 mg/g düzeyinde p-kumarik asit içerdiği tespit edilmiştir (Mianabadi *et al.* 2015). Başka bir çalışmada, Sharififar *et al.* (2010) *Bunium persicum* metanolik ekstraktın hidrolize bütanol fraksiyonunda p-kumarik asit ve kafeik asitin baskın bileşenler olarak bulduklarını ifade etmektedirler. Alavi *et al.* (2009), *Apiaceae* familyasından *Peucedanum ruthenicum*'un toprak üstü kısımlarından MS, 1H, 13C NMR spektroskopisi ile p-kumarik asitin tespit edildiğini bildirmişlerdir. Skalicka-Woz'niak and Kazimierz Głowniak (2008) ise *Peucedanum alsaticum* bitkisine uyguladığı soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu yöntemlerinde p-kumarik asitin 1,27- 3,19 mg/100 g aralığında ekstrakte edildiğini ve en etkin sonucun ultrason uygulaması ile elde edildiğini rapor etmişlerdir.

Gallik asit, özellikle emülsiyon ile lipid sistemlerinde etki gösteren ve gıda sanayinde ransiditenin önlenmesi için gıda ambalaj materyallerinde kullanılan antioksidan aktivitesi yüksek olan fenolik bir bileşendir. Antioksidan etkisi, askorbik asit gibi suda çözünen antioksidanlardan yüksek olup nereseyse tokoferoller kadar etkilidir (Yen *et al.* 2002).

Ekstraktların gallik asit içerikleri 0,125 mg/g - 0,250 mg/ g olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Verilerde dikkat çeken nokta; gallik asit konsantrasyonunun en yüksek ve en düşük olduğu numunelerin sırasıyla KMSE ve UMSE oluşudur. Tüm ekstraktlara bakıldığında genel olarak ultrason uygulamasının gallik asit konsantrasyonunu düşürdüğü ve ultrason uygulamasının gallik asit konsantrasyonunu en fazla etkilediği çözücünün metanol: su

karışımı olduğu görülmektedir. Zucca *et al.* (2013) *Ferula* türlerinde gallik asidin bulunduğunu rapor etmektedir. Skalicka-Woz'niak and Kazimierz Głowniak (2008), *Apiaceae* familyasından *Peucedanum alsaticum* bitkisine uygulanan soxhlet ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu yöntemlerinin hiç birinde gallik asitin tespit edilemediğini bildirmiştir. Rawson *et al.* (2013) *Feoniculum vulgare*'nin taze, kavrulmuş ve su içerisinde kaynatılmış formlarında gallik asit içeriğini sırasıyla; $305,48 \pm 7,2$, $312,51 \pm 5,13$ ve $248,34 \pm 2,49$ $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak tespit etmiştir.

Salisilik asit, hidroksibenzoik asitler grubuna giren bir fenolik bileşendir. Doğal olarak oluşan bitki hormonlarından birisi olan bu fenolik asit, bitkilerde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları etkileyen çeşitli stres faktörlerine karşı (metal (Zhang *et al.* 2015b), tuzluluk (Khan *et al.* 2014; Nazar *et al.* 2015), sıcaklık (Khan *et al.* 2013), kuraklık (Fayez and Bazaid 2014) gibi) önemli bir sinyal molekülü olarak işlev görmektedir (Nazar *et al.* 2011). Szopa and Ekiert (2015), *Apiaceae* familyasından *Anethum graveolens* in vitro şartlarda bitkinin salisilik asit içeriğini $57,88 \pm 1,76$ mg/100 g olarak belirlemiştir. Elde ettiğimiz verilere göre, *F. orientalis*'in klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında salisilik asit düzeyi işlem ve çözücü değişkenleri ile işlem x çözücü interaksyonundan $p < 0,01$ düzeyinde etkilenmektedir. Ekstraktların salisilik asit düzeyleri 0,385- 0,495 mg/g aralığında değişim gösterdiği ve en yüksek değer KSE numunesine ait olduğu görülmektedir.

Benzoik asitin fenolik bir derivatı olan 4-hidroksibenzoik asit, suda az; alkol ve aseton gibi polar organik çözücülerde ise daha fazla çözünme özelliğine sahiptir (Wikipedia 2017). *Ferula orientalis*'in su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarının 4-hidroksi benzoik asit düzeyleri üzerine, işlem ve çözücü değişkenleri ile işlem x çözücü interaksyonunun $p < 0,01$ düzeyinde etkili olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.11 incelendiğinde, literatürle uyumlu olarak 4-hidroksibenzoik asitin su ekstraktlarında en düşük düzeyde bulunduğu, metanol: su ekstraktlarında ise en yüksek miktarda bulunduğu görülmektedir. En yüksek 4-hidroksibenzoik asit miktarı (0,799 mg/g) ultrasonik metanol: su ekstraktında, en düşük ise klasik su ekstraktında (0,431 mg/g) belirlenmiştir.

Iranshahi *et al.* (2010b) *Ferula gummosa* köklerinin metanolik ekstraktında 4-hidroksibenzoik asit bulunduğunu rapor etmişlerdir. Zellagui *et al.* (2012) *Ferula vesceritensis*'in 1:1 metilen klorid: metanol ekstraktından 4-hidroksibenzoik asit ve türevlerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. *F. orientalis*'e ait bu konuda yapılmış bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

F. orientalis salamurasından ekstrakte edilen fenolik asitlerden prokateşuik asit, flavanlardan tangeretin, baicalin ve gardenin-B miktarlarının kullanılan çözücü çeşidi ve ekstraksiyon metoduna bağlı olarak değiştiği ve diğer fenolik bileşenlere göre oldukça düşük düzeyde buldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.10).

Flavonoid grubunun içerisinde yer alan Rutin (3',4',5,7-tetrahydroxy-flavone-3-rutinoside) bir flavanol glukozitidir. Antimikrobiyal, antifungal ve antialerjik olarak kullanımının yanı sıra, mevcut araştırmalar rutin; kanser, diyabet, hipertansiyon ve hiperkolesterol gibi çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde farmakolojik yararlarının görüldüğünü rapor etmektedir (Sharma *et al.* 2013). En büyük dezavantajı, sudaki düşük çözünürlüğü, zayıf stabilitesi ve sınırlı membran geçirgenliğinden dolayı biyoyararlanımının düşük olmasıdır (Gullon *et al.* 2017). Bu araştırmada *F.orientalis*'de rutin miktarı oldukça düşük düzeyde belirlenmiş olup, ekstraktlarda 0,005 mg/g ile 0,054 mg/g aralığında değişim göstermektedir. En düşük miktar klasik su ve metanol: su ekstraktlarına ait iken; en yüksek rutin miktarı ultrasonik etanol: su ekstraktına aittir. Rutin miktarı üzerine, çözücü türü ve işlem değişkeni ile işlem x çözücü interaksyonu ise $p<0,01$ düzeyinde etkili olmuştur.

Ferula orientalis'in su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında belirlenmiş olan diğer bir flavanol olan morin (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone)'in antioksidan, antialerjik, antienflamatuar, antimutajenik, antikarsinojenik ve sitoprotektif etkileri çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmektedir (Hanasaki *et al.* 1994; Kawabata *et al.* 1999; Brown *et al.* 2003; Fang *et al.* 2003; Sivaramakrishnan *et al.* 2008; Sreedharan *et al.* 2009, Subash and Subramanian 2009; Zhang *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2010). Çizelge 4.10 incelendiğinde ekstraktların içerdiği morin miktarının 0,009-0,114 mg/g aralığında

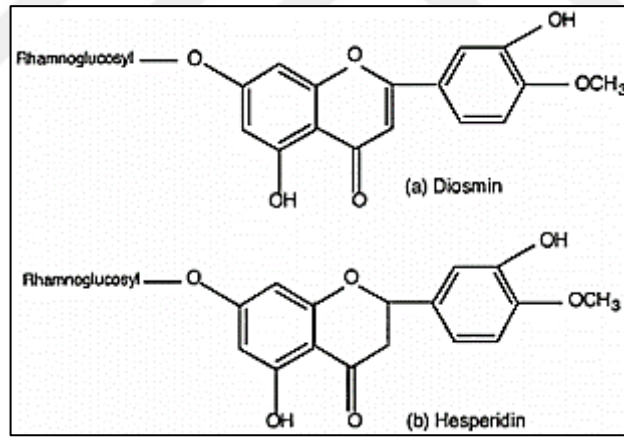
değiştii görölmektedir. Morin içeriğinin en yüksek olduğu numune ultrasonik etanol ekstraktı iken, en düşük morin konsantrasyonu klasik su ekstraktına aittir. Numunelerin morin içeriği üzerine, işlem ve çözücü değişkenleri ile işlem x çözücü interaksiyonunun $p < 0,01$ düzeyinde etkili olduğu varyans analizi ile saptanmıştır.

Yapılan çalışmada belirlenen diğer flavanol kuersetindir. Kuersetinin antioksidatif, antibakteriyel, antikanser ve antiinflamatuvar aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Chopra *et al.* 2000; Granado-Serrano *et al.* 2010; Yetük, 2013). Kuersetinin antioksidan aktivitesi, serbest radikalleri süpürme ve B halkasının 3. pozisyonda bulunan fenolik hidroksil grupları yardımıyla geçiş metal iyonlarını bağlama özellikleri ile ilişkilidir (Heijnen *et al.* 2002; De Souza and De Giovanni 2004). Bu özellikler sayesinde kuersetin lipid peroksidasyonunu da önlemektedir (Hollman and Katan 1997). Bu önemli bileşik kırmızı soğan, yeşil sebzeler, meyve kabukları, brokoli ve birçok meyvede yüksek oranda bulunmaktadır (Hakkinen and Törrönen 2000; Zhang *et al.* 2005; Volpi and Bergonzini 2006; Sultana *et al.* 2008). Suda çok az çözünen kuersetin; etanol, metanol ve diğer organik çözücülerde daha iyi çözünmektedir (Cengiz 2011). *F. orientalis* ekstraktları içerdikleri kuersetin açısından değerlendirildiğinde; literatür ile uyumlu olarak su ekstraktlarında düşük miktarda kuersetin bulunduğu (0,016 ve 0,033 mg/g); klasik etanol: su ekstraktının kuersetin miktarının ise yüksek olduğu (0,114 mg/g) görölmektedir. İşlem ve çözücü değişkenleri ile işlem x çözücü interaksiyonunun ekstraktların kuersetin içeriği üzerine etkisinin $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olduğu tespit edilmiştir.

Ferula türlerinin içediği rutin, morin ve kuersetin flavonolleri üzerine yapılan literatür taramalarında bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Alavi *et al.* (2009) tarafından yapılan araştırmada, *Apiaceae* familyasından *Peucedanum ruthenicum*'dan ince tabaka kromatografisi ve kristalizasyon yoluyla rutin, kuersetin ve morin flavanollerini elde etmiş ve bileşen yapılarını MS, ¹H, ¹³C NMR spektroskopisi ile belirlemiştir. Benedec *et al.* (2017) *Heracleum sphondylium* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarında rutin miktarını sırasıyla; 983,88 mg/100 g ve 477,08 mg/100g, kuersetin miktarını ise 13,38 mg/100 g ve 15,60 mg/100 g olarak tespit etmiştir. Farklı bir çalışmada, Achouri *et al.* (2017) tarafından iki adet triterpenoid saponin, isorhamnetin 3-

rutinosid ve rutin tespit edildiği bildirilmiştir. Oke Altuntas *et al.* (2016) yine *Apiaceae* familyasından bir bitki türü olan *Prangos meliocarpoides*'e ait metanol ekstraktında HPLC yöntemi ile yüksek düzeyde (3.17 ± 0.06) $\mu\text{g}/\text{mg}$ rutin izole ettiklerini ifade etmişlerdir.

Flavononlar grubundan bir fenolik bileşen olan hesperidin açısından ekstraktlar kıyaslandığında; en yüksek miktar (0,482 mg/g) ultrasonik metanol: su ekstraktında tespit edilmiş olup, klasik etanol: su ekstraktının ise en düşük miktarda (0,075 mg/g) hesperidin içerdiği belirlenmiştir. Ekstraktların hesperidin içerikleri üzerine çözücü tipi değişkeni ile işlem x çözücü tipi interaksyonunun etkisi istatistiki olarak $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Cornara *et al.* (2009) *Apiaceae* familyasından *Crithmum maritimum* L. bitkisinde HPLC yöntemi ile baskın bileşenler olarak %0,63 oranında hesperidin ve %0,60 oranında diosmini belirlediklerini rapor etmişlerdir.



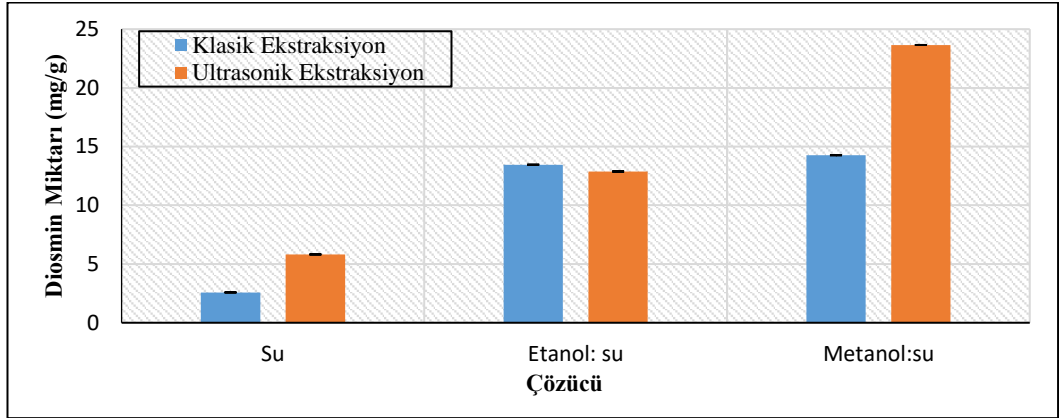
Şekil 4.14. Hesperidin ve diosmin molekülleri

Flavon grubu içerisinde yer alan diosmin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone 7-rutinoside) (Şekil 4.14), hesperidinden türetilmiş doğal bir glikozittir. Moleküler yapısı ve biyolojik aktiviteleri hesperidine benzemektedir (Hitzenberger 1997). Bitki anatomik çalışmalarında, hesperidin ve diosmin, iğne şeklinde veya tüysü kristaller olarak tanımlanmakta ve benzer görünümünden dolayı sıklıkla karıştırılmaktadır (Cornara *et al.* 2009). Diosmin merkezinde bulunan karbon halkasındaki bir çift bağ ile hesperidinden ayrılmaktadır. Diosminin kronik venöz yetmezlik, hemoroid ve varis tedavisinde damar

koruyucu ajan olarak etki gösterdiği belirlenmiş ve son zamanlarda kanser, kolit, diyabet gibi hastalıkların tedavisinde kullanımı araştırılmaya başlanmıştır (Doğan 2011).

Solereeder (1908) ve Metcalfe and Chalk (1950), *Apiaceae* familyasından *Aethusa*, *Bupleurum*, *Chaerophyllum*, *Conium*, *Coriandrum*, *Cuminum*, *Oenanthe*, *Sium* ve *Trinia* bitkilerinde hesperidin olduğunu düşündükleri kristalleri rapor etmişlerdir. Metcalfe and Chalk (1989) ise *Apiaceae* familyasından *Crithmum maritimum* yaprak epidermisi ve sap damarlarında yapısı diosmin ve hesperidine benzeyen kristal kümeleri olduğunu ifade etmiş fakat bu duruma dair herhangi bir kanıt bulunamamıştır. *Apiaceae* familyasından bir bitkide hesperidin ve diosmin olduğunu kanıtlayan ilk araştırma Cornara *et al.* (2009) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar *Crithmum maritimum* L. bitkisinde bulunan hesperidin (%0,60±0,02) ve diosmin (%0,63±0,02) miktarlarını yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlerken, bileşiklerin morfolojik yapılarını taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülemişlerdir. Yapılan literatür taramasında *Ferula* türlerinin hesperidin ve diosmin içerikleri üzerine yapılmış herhangi bir araştırma bulunmaması yapılan çalışmanın bu konuda bir ilk olduğunu göstermektedir.

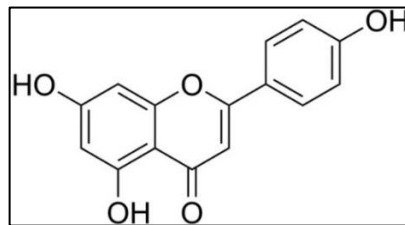
Ferula orientalis su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında bulunan en baskın flavonoid diosmindir. Çizelge 4.10 incelendiğinde, ekstraktların içerdiği diosmin miktarlarının 2,580- 23,652 mg/g aralığında değişim gösterdiği görülmektedir. En yüksek diosmin içeriğine sahip numune 23,652 mg/g değeri ile ultrasonik metanol: su ekstraktı iken, 2,580 mg/g değeri ile en düşük diosmin içeriği klasik su ekstraktına aittir. Ekstraktların diosmin miktarının toplam fenolik madde miktarı ile $p<0,05$ seviyesinde pozitif korelasyon ($r= 0,851$) gösterdiği saptanmıştır (Ek 1). Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi diosmin miktarı üzerine işlem ve çözücü tipi değişkenleri ile işlem x çözücü tipi interaksiyonunun etkisi istatistiki olarak $p<0,01$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.15. Ekstraktların diosmin miktarları üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi

Şekil 4.15 incelendiğinde çözücü türü değişikçe ilgili ekstraktta tespit edilen diosmin miktarının değiştiği ve ultrason uygulamasının etanol: su ekstraktı hariç klasik yöntemle kıyasla diosmin miktarını artırdığı görülmektedir.

Apigenin, kimyasal yapısı itibarıyla 4',5,7-trihidroksiflavon olarak da bilinmektedir (Şekil 4.16). Suda hemen hemen hiç çözünmemekte, metanolde ise çok az çözünmektedir (Serim 2017). *Matricaria chamomilla* çiçekleri, *Apium graveolens* yaprakları, *Allium sativum* L. ve *Petroselinum crispum* L. bitkilerinin özellikle yaprak kısımlarında yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir (Candwell 2013; Venigalla *et al.* 2015). Hidrojen peroksitinin neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucu etki sağladığı ve eritrositlerin antioksidatif aktivitelerini artırdığı rapor edilmektedir (An *et al.* 2015).

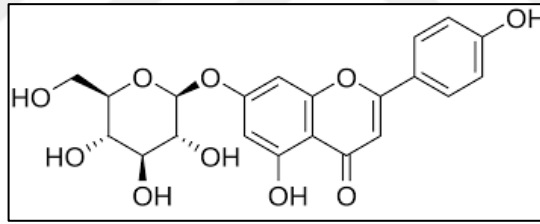


Şekil 4.16. Apigeninin kimyasal yapısı (Serim 2017)

Çizelge 4.10'da *Ferula orientalis*'in klasik ve ultrasonik yöntemler kullanılarak elde edilmiş su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında apigenin içeriklerinin oldukça düşük

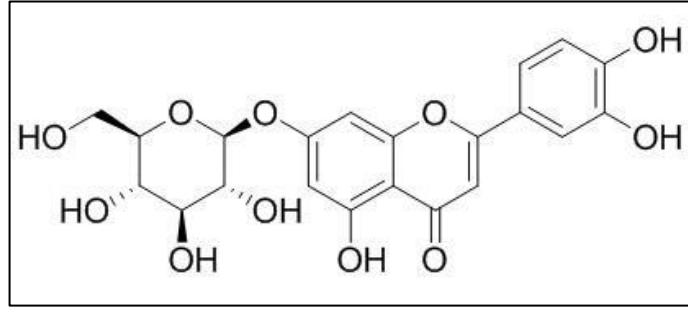
olduğu görülmektedir. En yüksek apigenin içeriğinin 0,021 mg/g değeri ile ultrasonik etanol: su ekstraktına ait olduğu görülmektedir. Ayrıca işlem ve çözücü değişenleri ile işlem x çözücü interaksyonunun da apigenin düzeylerine $p < 0,01$ düzeyinde etkili oldukları saptanmıştır.

Apigenin 7-O-glikozit (Şekil 4.17) biyolojik etkileri tam olarak belirlenememiş doğal olarak oluşan bir flavon grubu bileşiğidir (Bolzon *et al.* 2017). Apigenine kıyasla çözünürlüğü daha yüksektir (Smiljkovic *et al.* 2017). *F. orientalis* ekstraktlarında 0,011 mg/g - 0,118 mg arasında değişim gösterdiği görülmektedir. En yüksek apigenin 7-O glukoze konsantrasyonu klasik etanol: su ekstraktına ait iken, en düşük değer klasik su ekstraktında belirlenmiştir. Ekstraktlarda oldukça düşük düzeyde belirlenmiş olan apigenin 7-O-glikozit konsantrasyonu üzerine işlem ve çözücü değişenleri ile işlem x çözücü interaksyonu apigenin düzeylerine $p < 0,01$ düzeyinde etkili olmuştur.



Şekil 4. 17. Apigenin-7-O-glikozitin kimyasal yapısı

Yapılan çalışmada salamura *F. orientalis* ekstraktlarında belirlenen diğer bir flavon olan luteolin-7-glikozit (Şekil 4.18); antioksidan, antimikrobiyal ve antitumör aktivitelere sahip biyoaktif bir bileşiktir (Zemlička *et al.* 2014). Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi, 0,128 mg/g ile 0,342 mg/g arasında değişim gösteren luteolin-7-glikozit konsantrasyonunun, en düşük olduğu ekstrakt klasik su ekstraktı iken, en yüksek olduğu ise ultrasonik metanol: su ekstraktıdır. Varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde luteolin 7-O-glikozit üzerine işlem değişkeni ve işlem x çözücü interaksyonunun $p < 0,01$ düzeyinde, çözücü değişkeninin ise $p < 0,05$ düzeyinde etkili olduğu görülmektedir.



Şekil 4.18. Luteolin 7-O-glikozitin kimyasal yapısı (Popovic *et al.* 2017)

Web of Science, Science Direct, Scholar Google ve Pub Med veri tabanlarında yapılan literatür taramalarında *Ferula orientalis* L.'nin içerdiği diosmin, apigenin, apigenin-7-O-glikozit ve luteoilin-7- glikozit flavonları üzerine yapılmış herhangi bir çalışma tespit edilememiştir. Ancak, literatürde bazı *Ferula* türleri ve *Apiacea* familyasından diğer bitki türlerinde bahsi geçen flavonlar üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan biri Maksumova *et al.* (1994)'de *Ferula varia*'nın toprak üstü kısımları kullanılarak %80'lik etanol ile hazırlanan ekstraktlardan HPLC yöntemi ile luteolin glikozitlerinin tespiti üzerinedir. Farklı bir çalışmada, Zidorn and Perry (2002), *Anistome pilifera* bitkisinin 1:1 metanol: su ekstraktının n-bütanol fazında yüksek miktarda luteolin 7-O glikozit belirlediklerini ifade etmişlerdir. Rawson *et al.* (2013) *Feoniculum vulgare*'nin taze, kavrulmuş ve su içerisinde kaynatılmış ekstraktlarında luteolin 7-O glikozit içeriğini sırasıyla; $352,04 \pm 6,8$, $94,18 \pm 1,38$ ve $41,04 \pm 0,07$ $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık olarak saptamıştır. Cornara *et al.* (2009), *Apiaceae* familyasından *Crithmum maritimum* L. bitkisinin diosmin içeriğinin $0,60 \pm 0,02$ olduğunu ifade etmişlerdir. Abdulmanea *et al.* (2012), *Ferula assa foetida*'da baskın flavonoidin apigenin olduğunu belirtmektedir. Popovic *et al.* (2017) *Apiaceae* familyasından *Laserpitium zernyi* bitkisinin metanol ekstraktlarında sırasıyla luteolin 7-O-glukozit, apigenin 7-O-glukozit, luteolin ve apigenin flavonoidlerini çiçek kısmında; $9,71 \pm 0,19$, $6,46 \pm 0,01$, $2,50 \pm 0,01$ ve $2,27 \pm 0,01$; bitki kısmında ise $0,45 \pm 0,01$, $0,19 \pm 0,00$, $0,00 \pm 0,00$ ve $0,02 \pm 0,00$ olarak belirlemiştir.

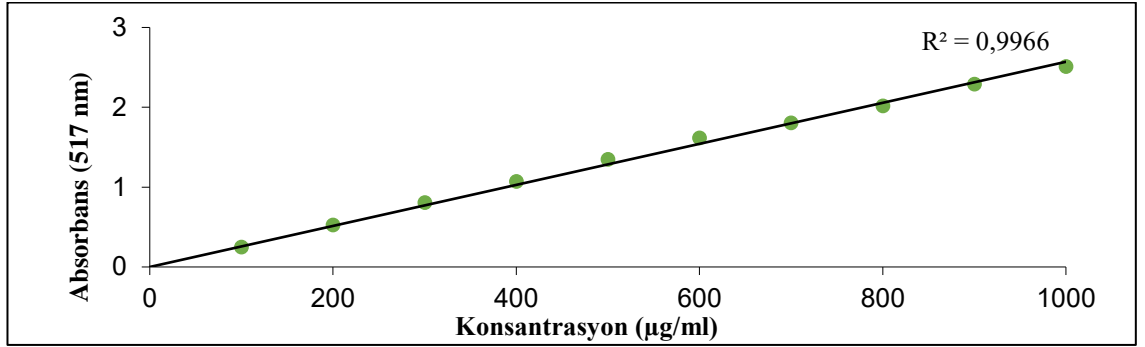
4.7. Antioksidan Aktivite

Antioksidanlar; serbest radikal oluşumunu sağlayan oksijen ve katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etkilerin yanı sıra; serbest radikallere karşı temizleyici (scavenging), bastırıcı (quencher) ve zincir kırıcı (chain breaking) etkiler de göstermektedirler (Mao *et al.* 2006). Antioksidanların etkinliğini değerlendirmek için çeşitli analitik yöntemler ve farklı substratlar kullanılmaktadır. Araştırmada kullanılan metotlar, bitki ekstraktlarında antioksidan aktivitenin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemlerdir.

4.7.1. DPPH• radikali giderme aktivitesi

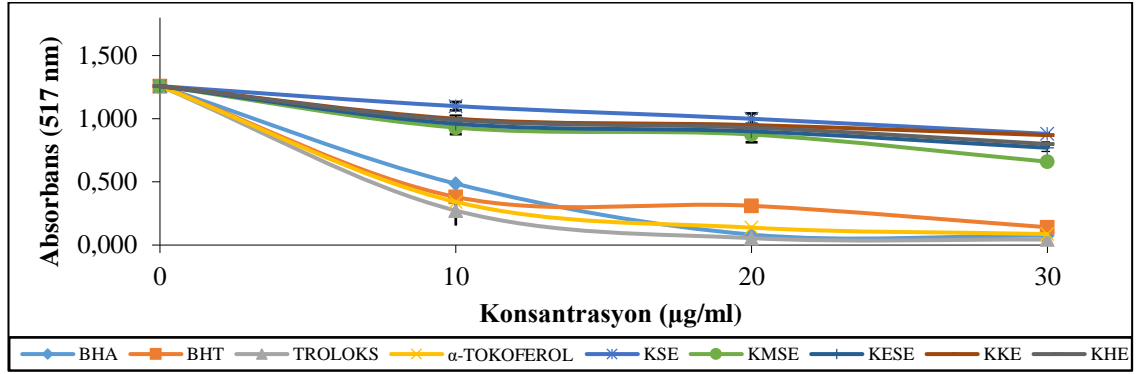
DPPH• radikali giderme kapasitesi analizi, bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde sık kullanılan bir metottur (Mot *et al.* 2011). Yöntem, ortamda oluşan DPPH• serbest radikallerine antioksidanların proton transferi yapması sonucu 517 nm’de okunan absorbans değerlerinin azalmasına dayanmaktadır (Albayrak 2010). Metot, oldukça basit, hızlı ve birçok örneğin aynı anda radikal giderme aktivitelerinin belirlenebilmesini sağladığı için tercih edilmektedir. Ancak, ışık, oksijen ve kirliliğe karşı oldukça hassas olan bu metodun uygulanması sırasında dikkat edilmelidir (Mot *et al.* 2011).

Şekil 4.19’da DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik yer almaktadır.

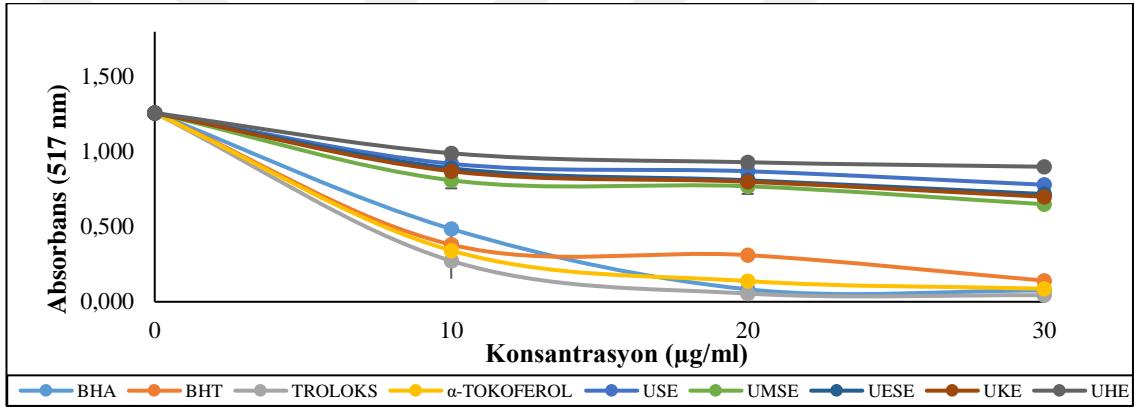


Şekil 4.19. DPPH• serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik

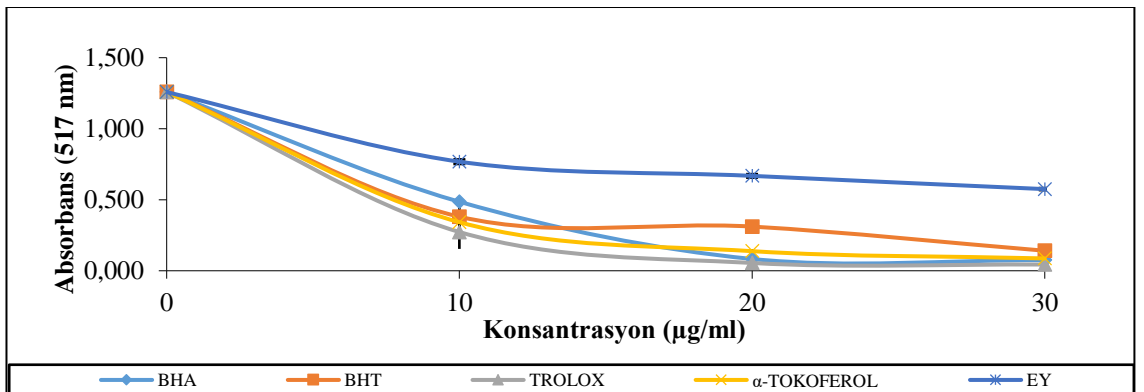
Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22'de; 10-30 µg/ml konsantrasyonlarda klasik ve ultrasonik ekstraktlar ile esansiyel yağın 517 nm dalga boyunda belirlenmiş DPPH• serbest radikali giderme aktiviteleri görülmektedir.



Şekil 4.20. Klasik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH• serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması



Şekil 4.21. Ultrasonik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH• serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması



Şekil 4.22. Esansiyel yağın farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) DPPH• serbest radikali giderme aktivitesinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması

BHA, BHT, troloks, α -tokoferol, klasik ve ultrasonik ekstraktlar ile esansiyel yağı 10, 20 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda içeren çözeltilerin 517 nm dalga boyunda belirlenen absorbans değerleri kullanılarak belirlenmiş olan IC_{50} değerleri (radikalin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon) Çizelge 4.12'de verilmiştir.

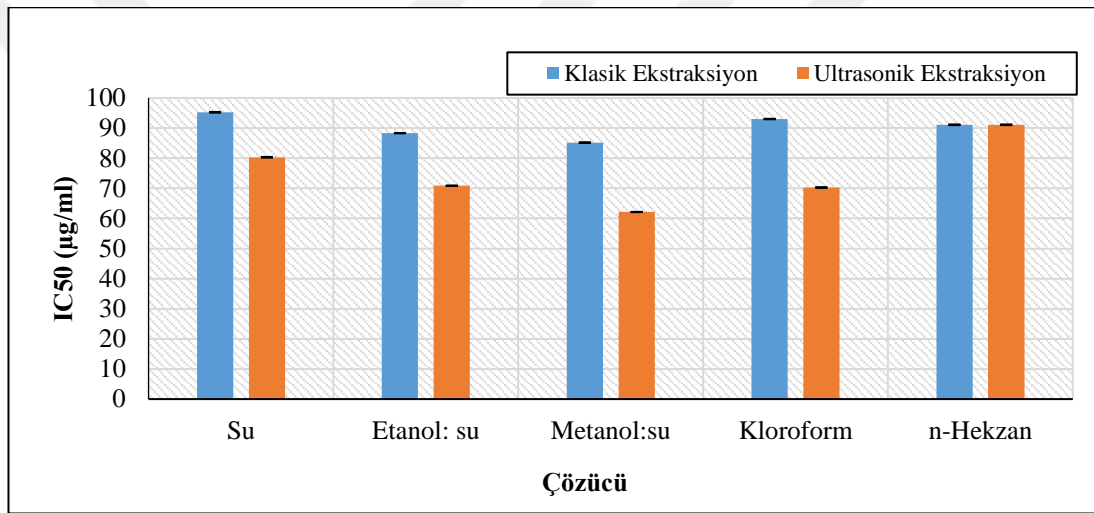
Çizelge 4.12. Ekstraktlar, esansiyel yağ ve standart antioksidanların DPPH• ve ABTS^{•+} serbest radikal giderme aktivitelerinin (IC_{50} değerlerinin) karşılaştırılması

| Örnekler | DPPH• Giderme Aktivitesi | ABTS ^{•+} Giderme Aktivitesi |
|---------------------|--------------------------------|--|
| BHA | 11,116±0,300 ^c | 8,753±0,125 ^b |
| BHT | 11,894±0,075 ^d | 7,810±0,150 ^a |
| TROLOKS | 9,262±0,060 ^a | 7,844±0,210 ^a |
| α -TOKOFEROL | 10,352±0,150 ^b | 8,389±0,100 ^b |
| KSE | 95,250±0,265 ⁿ | 180,318±0,110 ^h |
| KESE | 88,310±0,310 ^k | 110,384±0,125 ^e |
| KMSE | 85,180±0,250 ^j | 90,732±0,100 ^d |
| KKE | 93,000±0,130 ^m | 140,605±0,150 ^g |
| KHE | 91,100±0,150 ^l | 120,544±0,135 ^f |
| USE | 80,300±0,125 ⁱ | 110,770±0,200 ^e |
| UESE | 70,850±0,046 ^h | 90,730±0,230 ^d |
| UMSE | 62,125±0,065 ^f | 90,358±0,200 ^d |
| UKE | 70,250±0,075 ^g | 90,688±0,150 ^d |
| UHE | 91,100±0,115 ^l | 90,636±0,200 ^d |
| EY | 50,040±0,120 ^e | 80,777±0,100 ^c |

* Her sütun için istatistikî analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar $P < 0,05$ önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

Ekstraktların IC_{50} değerlerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.13'de görülmektedir. Çizelgenin incelenmesinden anlaşılacağı üzere, IC_{50} değerleri üzerine işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksyonunun etkisi ($p < 0,01$) istatistikî olarak

önemli bulunmuştur. Çizelge 4.12’de DPPH• radikali giderme aktivitesini gösteren IC₅₀ değerleri incelendiğinde, en yüksek değer klasik su ekstraktına (95,250 µg/ml); en düşük değerin ise 9,262 µg/ml ile Troloks antioksidanına ait olduğu görülmektedir. Yani tespit edilen en yüksek DPPH• radikali giderme aktivitesi Troloks’a ait iken, klasik su ekstraktı en düşük antioksidan aktiviteye sahiptir. Çünkü reaksiyon ortamındaki DPPH• radikalinin %50’sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu olarak bilinen IC₅₀ değeri ile radikal giderme aktivitesi ters orantılıdır (İşbilir 2008). Yani aynı miktardaki serbest radikali daha düşük konsantrasyonda süpürebilmektedir.



Şekil 4.23. Ekstraktların DPPH• radikali giderme aktiviteleri üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisi

Şekil 4.23 incelendiğinde çözücü türü değiştiğinde ilgili ekstraktların DPPH• radikali giderme aktivitelerinin değiştiği ve ultrason uygulamasının n-hekzan ekstraktı hariç klasik yöntemle kıyasla DPPH• radikali giderme aktivitesini artırdığı görülmektedir. Bu durumun, ultrason uygulamasının bitki hücre çeperlerini parçalaması ve antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin çözücüye daha fazla geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Standart antioksidanlar, ekstraktlar ve esansiyel yağın DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi analizi ile tespit edilmiş antioksidan aktiviteleri; Troloks>α-Tokoferol>BHA>BHT>EY>UMSE> UKE>UESE>USE>KMSE>KESE>KHE=UHE>KKE>KSE

şeklinde. Burada dikkat çeken en önemli nokta, esansiyel yağın DPPH• serbest radikal giderme aktivitesinin (50,040 µg/ml) tüm ekstraktlardan yüksek olduğudur.

Çizelge 4.13. Ekstraktların IC₅₀ değerlerine ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | DPPH IC ₅₀ | | | ABTS IC ₅₀ | | |
|-------------------|----|-----------------------|-----------|---------|-----------------------|------------|---------|
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 1139,295 | 16185,882 | 0,000** | 5739,340 | 104789,844 | 0,000** |
| Çözücü | 4 | 175,189 | 2488,901 | 0,000** | 1769,948 | 32316,003 | 0,000** |
| A x B | 4 | 91,620 | 1301,634 | 0,000** | 717,550 | 13101,148 | 0,000** |
| Hata | 20 | 0,070 | | | 0,055 | | |
| Genel | 30 | | | | | | |

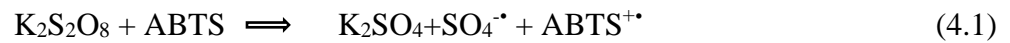
*p<0,05 düzeyinde önemli **p<0,01 düzeyinde önemli

Science Direct, Web of Science, Pub Med ve Google Scholar veri tabanlarında yapılan literatür taramalarında *F. orientalis*'in DPPH• radikali giderme aktivitesi üzerine yapılmış olan sadece iki çalışma olduğu görülmüştür. Kartal *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmada, Sivas'ta yetişen *F. orientalis* bitkisinin deodorize su, deodorize aseton, n-hekzan, aseton oleoresin ve metanol: su ekstraktları ile esansiyel yağı elde edilmiştir. Araştırmacılar, en yüksek DPPH• radikal giderme aktivitesinin 99.1±0,5 µg/ml ile metanol: su ekstraktına ait olduğunu, esansiyel yağın IC₅₀ değerinin 423±0,8 µg/ml olarak belirlendiğini ve hekzan ekstraktının DPPH• radikali giderme aktivitesinin çok düşük olduğunu belirtmişlerdir. Razavi *et al.* (2016) ise İran'da yetişen *F. orientalis* kökünden izole ettiği Ferulone A ve Ferulone B isimli iki kumarin esterinin DPPH• radikali giderme aktivitesi analizi ile belirlemiş oldukları IC₅₀ değerlerini sırasıyla; 0,252 mg/ml ve 0,556 mg/ml olarak belirlemişlerdir. Tespit edilen araştırma bulguları yapılan çalışma ile kıyaslandığında IC₅₀ değerlerinin çalışmada daha düşük olduğu yani; DPPH• radikali giderme aktivitesinin Kartal *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmadan yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, Kartal *et al.* (2007) çalışmalarında esansiyel yağın baskın bileşenini β-fellandren (%23,6) olarak belirlemiştir. Oysa yapılan çalışmada, baskın bileşen olarak α-pinen (%20,55) tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Wang *et al.* (2008) α-pinenin DPPH• radikali giderme aktivitesini IC₅₀ cinsinden %2.28±0.23 olarak çok yüksek düzeyde bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada esansiyel yağın antioksidan aktivitesinin yüksek olması α-pinenden kaynaklanıyor olabilir. Yapılan çalışma ile Kartal

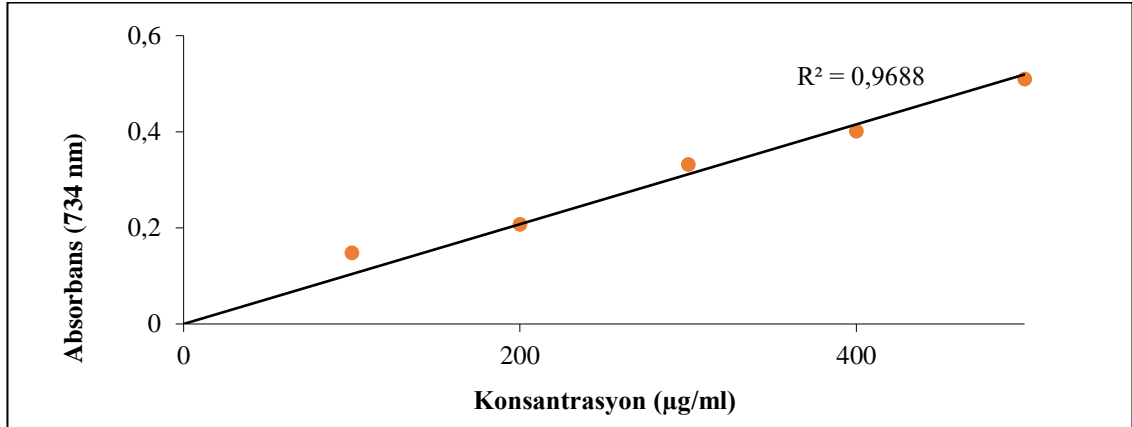
et al. (2007) tarafından rapor edilen sonuçlar arasındaki farklılıklar, ekolojik koşulların değişimine bağlı olarak; yetişen bitkilerin fenolik bileşenler dahil, birçok bileşenin farklılığından kaynaklanmış ve durum da ekstraktların antioksidan aktivitelerini etkilemiş olabilir. Fakat bu konuda mevcut çalışma dışında yapılmış herhangi bir çalışma olmadığı için kıyaslama yapılamamaktadır. Klasik ve ultrasonik yöntemler ile elde edilmiş su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarının baskın fenolik bileşeni olan klorojenik asitin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu; ratlar (Lee *et al.* 2012), fareler (Wu *et al.* 2014), ve tavşanlar (Lapchak 2007) üzerinde yapılmış çalışmalar ile rapor edilmiştir. Ancak, antioksidan aktivite sadece baskın bileşenlere bağlı olmayıp, kimyasal kompozisyonda yer alan farklı bileşenler arasında meydana gelen sinerjistik etki ile de sağlanabilmektedir.

4.7.2. ABTS^{•+} radikal giderme aktivitesi

Bu antioksidan aktivite belirleme yönteminde, oksidan olarak kullanılan K₂S₂O₈ (potasyum peroksidisülfat) tarafından yükseltgenen ABTS, ABTS^{•+} radikale dönüşmektedir (Eşitlik 4.2). Belirlenen antioksidan kapasite, test edilen maddenin direk ABTS^{•+} radikali ile etkileşime girmesi ile azalan rengin 734 nm dalga boyunda spektroskopik olarak ölçülmesidir. Geniş pH aralıklarında kullanılabilen (Gülçin 2012) ve hem lipofilik hemde hidrofilik bileşenlere uygulanabilen (Ali *et al.* 2008) kullanışlı bir metottur.

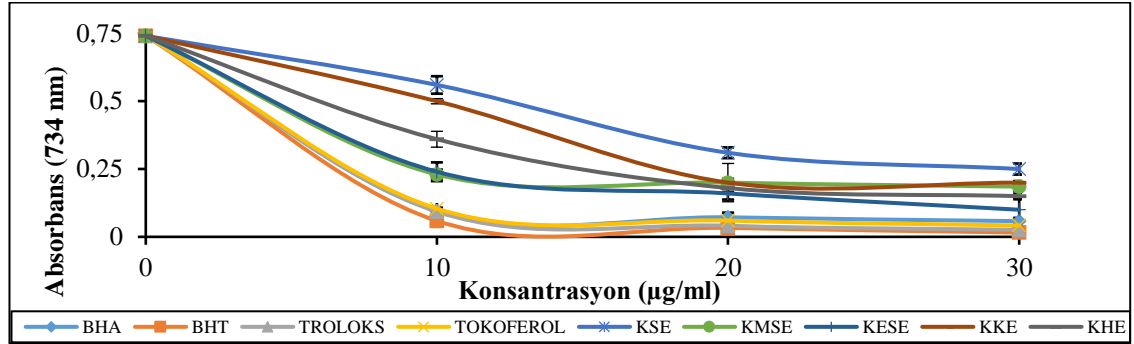


Şekil 4.24'de ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik yer almaktadır.

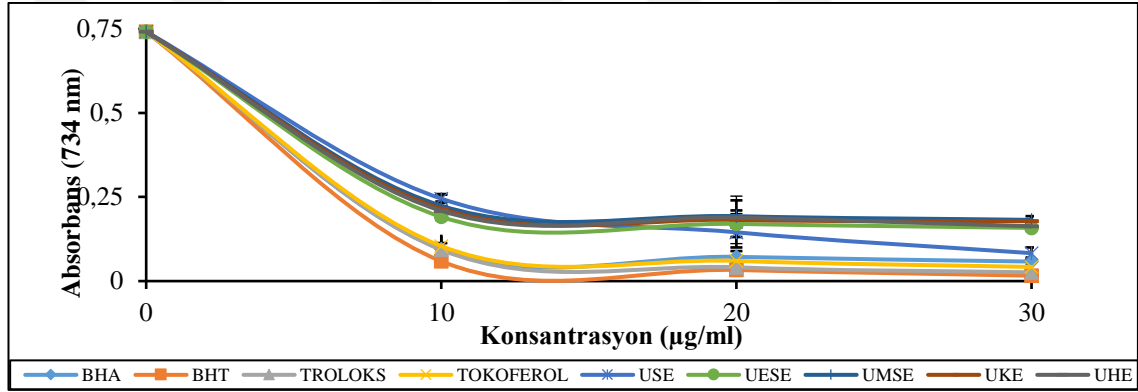


Şekil 4.24. ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktivitesi için hazırlanmış standart grafik

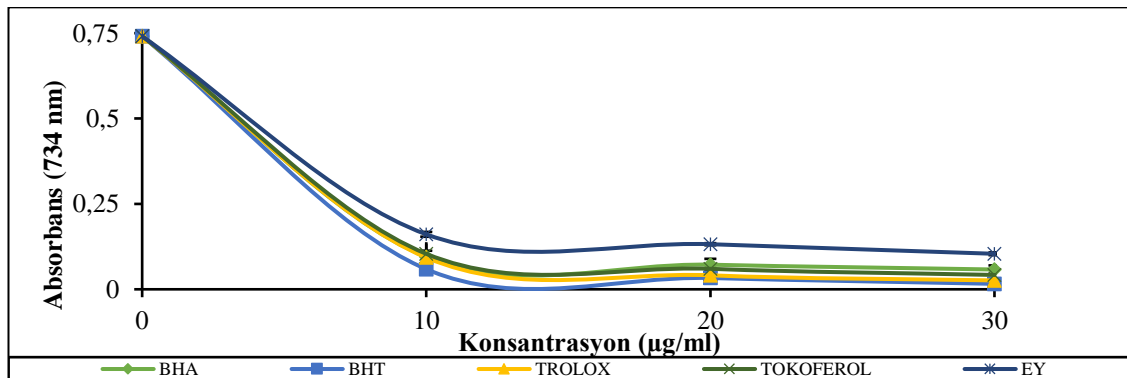
Şekil 4.25, 4.26 ve 4.27'de ise; 10-30 µg/ml konsantrasyonlarda klasik ve ultrasonik ekstraktlar ile esansiyel yağ örneklerinin 734 nm dalga boyunda belirlenmiş ABTS^{•+} serbest radikali giderme aktiviteleri görülmektedir.



Şekil 4.25. Klasik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS⁺ serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması

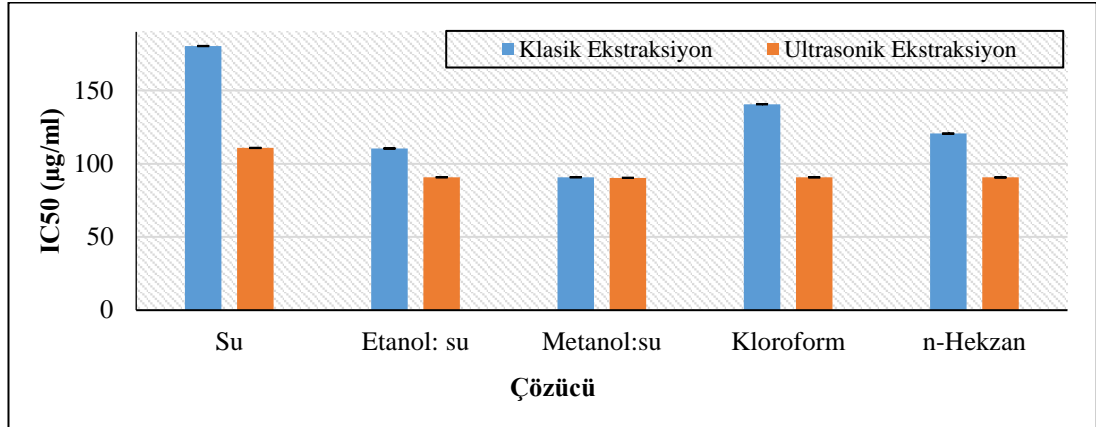


Şekil 4.26. Ultrasonik yöntem ile elde edilmiş su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS⁺ serbest radikali giderme aktivitelerinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması



Şekil 4.27. Esansiyel yağın farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) ABTS⁺ serbest radikali giderme aktivitesinin BHA, BHT, α-tokoferol ve troloks standart antioksidanları ile karşılaştırması

Çizelge 4.12’de IC₅₀ cinsinden ekstraktların ABTS•+ radikal giderme aktiviteleri, Çizelge 4.13’de ise bu değerlere ait varyans analiz sonuçları verilmiştir. Çizelgenin incelenmesinden anlaşılacağı üzere, IC₅₀ değerleri üzerine işlem ve çözücü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun etkisi p<0,01 düzeyinde istatistiki olarak çok önemli olarak belirlenmiştir. Ayrıca, DPPH• ve ABTS•+ radikal giderme aktiviteleri arasında p<0,05 düzeyinde pozitif korelasyon (r=0,664) olduğu görülmektedir (Ek 1). ABTS•+ radikaline karşı belirlenen IC₅₀ değerleri incelendiğinde, en yüksek değer klasik su ekstraktına (180,318 µg/ml); en düşük değerin ise 7,810 µg/ml ile BHT standart antioksidanına ait olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12). Yani tespit edilen en yüksek ABTS•+ radikali giderme aktivitesi BHT antioksidanına ait iken, klasik su ekstraktı en düşük antioksidan aktiviteye sahiptir. Standart antioksidanlar, ekstraktlar ve esansiyel yağın ABTS•+ serbest radikal giderme aktivitesi analizi ile tespit edilmiş antioksidan aktiviteleri; BHT> Troloks>α-Tokoferol> BHA> EY>UMSE>UHE>UKE>UESE>KMSE>KESE>USE>KHE>KKE>KSE şeklindedir. Esansiyel yağın ABTS•+ serbest radikal giderme aktivitesinin (80,777 µg/ml) tüm ekstraktlardan yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, ABTS•+ serbest radikal giderme aktivitesi üzerine işlem x çözücü interaksiyonunun etkisinin gösterildiği grafikte (Şekil 4.28) de görüldüğü gibi ultrasonik ekstraktların klasik yöntemle elde edilen ekstraktlara kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları anlaşılmaktadır. Bu durumun, ultrasonik dalgaların bitki hücre çeperlerini parçalaması ve antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin çözücüye daha fazla geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.28. Ekstraktların ABTS⁺ radikali giderme aktiviteleri üzerine işlem x çözücü interaksyonunun etkisi

Çeşitli veri tabanlarında yapılan literatür taramalarında *F. orientalis*'in ABTS⁺ radikali giderme aktivitesi üzerine yapılmış olan herhangi bir çalışma olmadığı fakat diğer *Ferula* türlerinin ABTS⁺ radikali giderme aktiviteleri ile ilgili bir kaç çalışmanın mevcut olduğu görülmektedir.

Nguir *et al.* (2016) Tunus'da yetişen *F. communis* L. bitkisinin taze yaprak, çiçek, kök ve sap kısımlarından hidrodistilasyon yöntemi ile elde ettiği esansiyel yağların ABTS⁺ radikali giderme aktivitelerini IC₅₀ değerleri olarak; sap esansiyel yağında 0,229±0,01 mg/ml, yaprak esansiyel yağında 260 µg/ml, çiçek esansiyel yağında 510 µg/ml ve kök esansiyel yağında 569 µg/ml olarak düşük düzeyde belirlemiştir. Znati *et al.* (2014), *F. lutea* çiçeklerinin n-bütanol ve etil asetat ekstraktlarının ABTS⁺ radikali giderme aktivitelerini IC₅₀ değerleri cinsinden sırasıyla; 300±5,0 µg/ml ve 184,0±7,0 µg/ml olarak rapor etmiştir. Znati *et al.* (2017) ise, *F. tunetana* kökünün ABTS⁺ radikali giderme aktivitesini 234,2±12,9 µg/ml olarak belirlerken, pozitif kontrol olarak kullandığı BHT ve askorbik asitin antioksidan aktivitelerini ise sırasıyla; 6,85±0,56 µg/ml ve 14,64±1,50 µg/ml olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar tarafından tespit edilen ABTS⁺ radikali giderme aktivitelerinin *F. orientalis* esansiyel yağı ve ekstraktlarından düşük olduğu görülmektedir. Özellikle esansiyel yağ, standart antioksidanlar kadar yüksek olmasa da orta düzeyde antioksidan aktivite sergilemektedir. Ibraheim *et al.* (2012)'da benzer şekilde, *Ferula* türlerinin orta düzeyde antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ifade

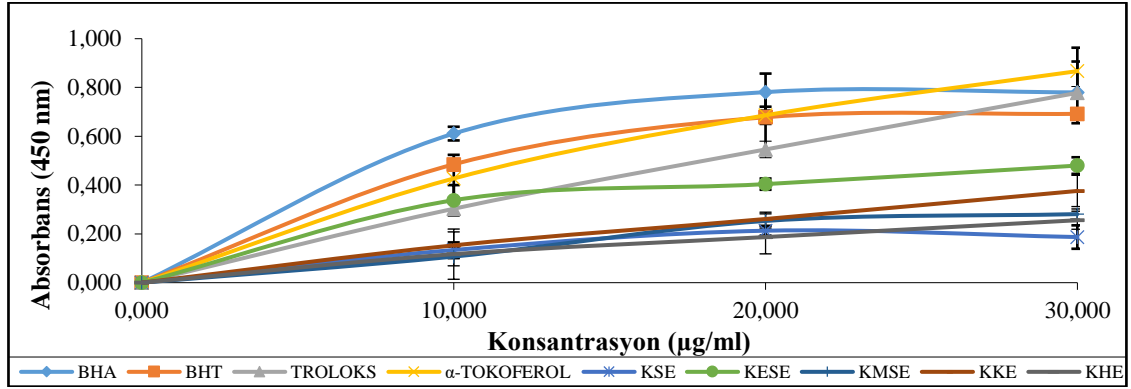
etmekte ve bu etkinin içerdikleri fenoller, flavonoidler ve seskiterpenlere bağlı olduğunu belirtmektedir.

4.7.3. Cu^{+2} - Cu^+ indirgeme kapasitesi (Kuprak Metodu)

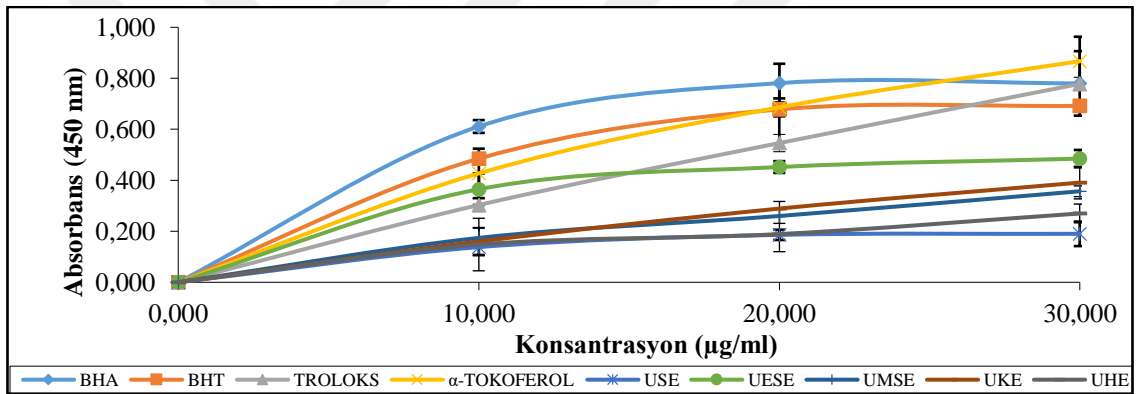
Metal iyonları, serbest radikal ve lipid peroksidlerini üretebilen lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedirler (Özyürek *et al.* 2010). Bu nedenle, bir bileşik veya ekstraktın melat çelatlama aktivitesi, onun antioksidan ve antiradikal özelliklerinin bir göstergesidir.

Kuprak analizi Apak vd (2004) tarafından geliştirilen ve indirgeme kapasitesinin tespitinde birçok araştırmacı tarafından kullanılan bir antioksidan aktivite yöntemidir. Fiziyojik pH değerine (pH:7,0) yakın pH'da çalışılan, düşük maliyetli, kolay uygulanan, hızlı ve hidrofilik antioksidanların yanında lipofilik antioksidanlara da uygulanabilen bir yöntemdir (Özyürek vd 2011). Metodun temeli, neokuprin varlığında (çelatlayıcı ajan) Cu^{+2} (kuprik) iyonlarının Cu^+ (kupröz) iyonlarına indirgenmesidir. 450 nm'de kaydedilen yüksek absorbans değeri kuprik iyon (Cu^{+2}) indirgeme gücünün yüksek olduğunu göstermektedir (Selamoğlu *et al.* 2017).

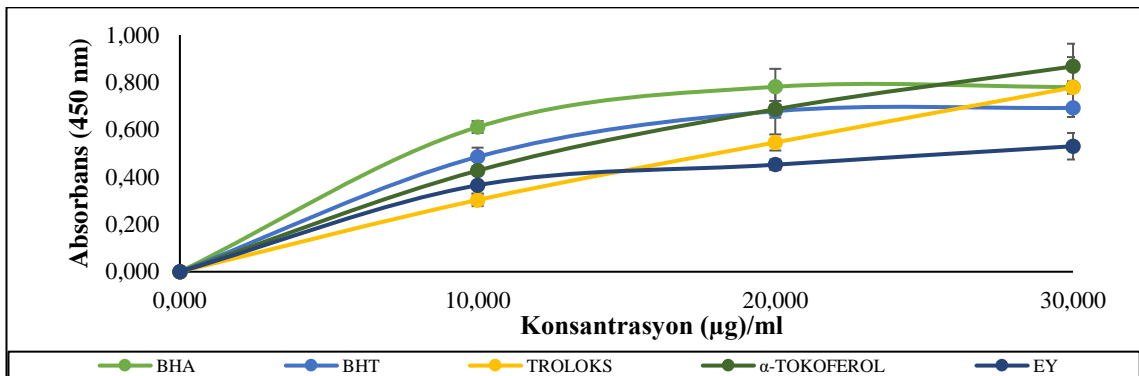
Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen; su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktları ile esansiyel yağ ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) çözeltilerinin 450 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri tespit edilerek kuprik iyonlarını (Cu^{+2}) indirgeme grafikleri çizilmiştir. Grafikler Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de; ölçülen absorbans değerleri ise Çizelge 4.14'de görülmektedir.



Şekil 4.29. Klasik yöntemle elde edilen ekstraktlar ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme aktivitelerinin karşılaştırılması



Şekil 4.30. Ultrasonik yöntemle elde edilen ekstraktlar ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme aktivitelerinin karşılaştırılması



Şekil 4.31. Esansiyel yağ ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki (10-30 µg/ml) kuprik iyonlarını (Cu²⁺) indirgeme aktivitelerinin karşılaştırılması

Grafiklerde görüldüğü gibi, klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktları ile esansiyel yağın kuprik iyonlarını indirgeme kapasitelerinin ekstrakt konsantrasyonu arttıkça yükseldiği görülmektedir. 30 µg/ml konsantrasyonda belirlenen en yüksek kuprik iyonu indirgeme kapasitesi standart antioksidanlardan α-tokoferol'e ait (0,867) iken; 0,187 değeri ile en düşük indirgeme kapasitesi klasik su ekstraktında ölçülmüştür.

Çizelge 4.14. 10, 20 ve 30 µg/ml konsantrasyonlarda esansiyel yağ ve ekstraktların kuprik (Cu⁺²) iyonlarını indirgeme kapasitelerinin standart antioksidanlarla karşılaştırılması

| Ekstraktlar | Absorbans (450 nm) | | |
|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 10µg/ml | 20 µg/ml | 30 µg/ml |
| BHA | 0,611±0,020 ^j | 0,781±0,025 ^g | 0,780±0,035 ^h |
| BHT | 0,485±0,015 ⁱ | 0,678±0,031 ^e | 0,692±0,036 ^g |
| TROLOKS | 0,303±0,021 ^f | 0,546±0,023 ^d | 0,778±0,021 ^h |
| α-TOKOFEROL | 0,427±0,030 ⁱ | 0,686±0,025 ^f | 0,867±0,025 ⁱ |
| KSE | 0,134±0,021 ^b | 0,213±0,031 ^{ab} | 0,187±0,037 ^a |
| USE | 0,138±0,035 ^b | 0,186±0,025 ^a | 0,190±0,034 ^a |
| KESE | 0,338±0,020 ^g | 0,404±0,030 ^c | 0,480±0,041 ^e |
| UESE | 0,237±0,018 ^e | 0,450±0,017 ^c | 0,482±0,056 ^e |
| KMSE | 0,107±0,013 ^a | 0,253±0,014 ^b | 0,281±0,028 ^b |
| UMSE | 0,174±0,017 ^d | 0,260±0,017 ^b | 0,357±0,054 ^c |
| KKE | 0,153±0,015 ^c | 0,261±0,025 ^b | 0,376±0,064 ^c |
| UKE | 0,160±0,012 ^c | 0,289±0,034 ^b | 0,391±0,064 ^d |
| KHE | 0,117±0,020 ^a | 0,187±0,012 ^a | 0,256±0,023 ^b |
| UHE | 0,148±0,030 ^c | 0,189±0,020 ^a | 0,270±0,021 ^b |
| EY | 0,365±0,080 ^h | 0,452±0,018 ^c | 0,530±0,056 ^f |

* Her sütun için istatistikî analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar P<0,05 önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

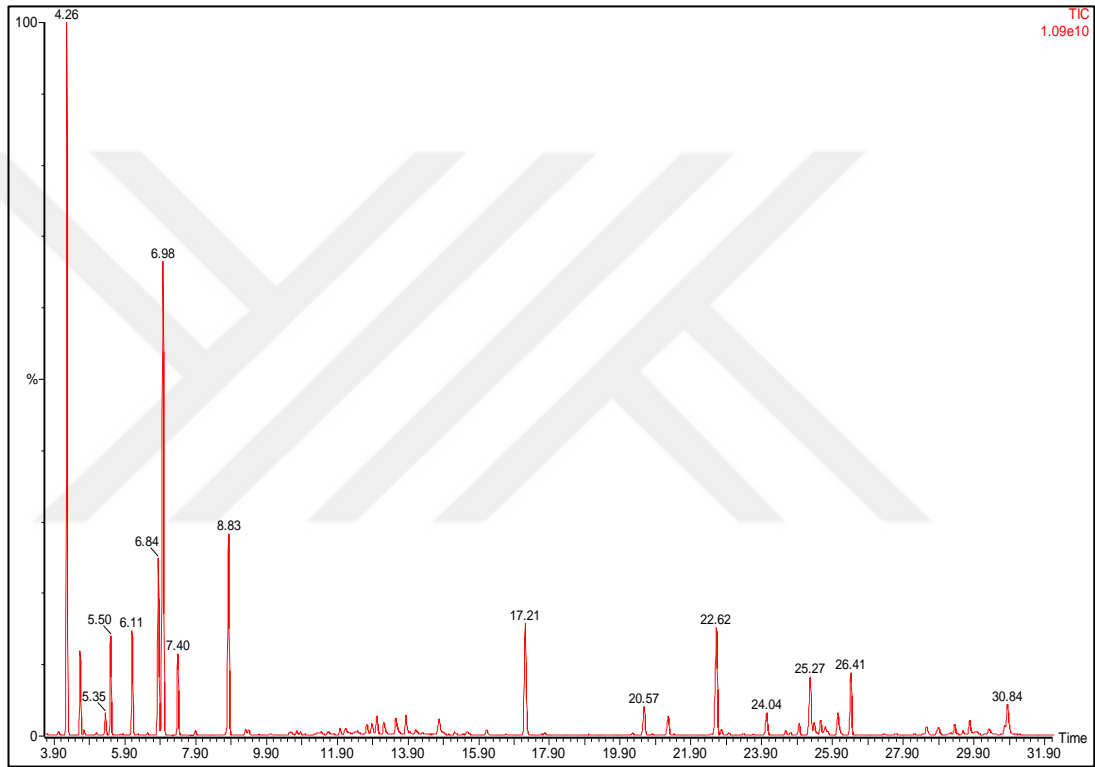
Çizelge 4.14 incelendiğinde, ABTS^{•+} ve DPPH[•] serbest radikalleri indirgeme aktivitelerinde olduğu gibi; esansiyel yağın kuprik indirgeme kapasitesinin diğer ekstraktlardan çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, çözücü değişkeninin ekstraktların kuprik iyonu indirgeme kapasitesi üzerine p<0,05 düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

30 µg/ml konsantrasyonda ekstraktlar, esansiyel yağ ve standart antioksidanların Cu⁺² indirgeme kapasiteleri sırasıyla; α-Tokoferol> BHA> Troloks> BHT> EY> UESE> KESE> UKE> KKE> UMSE> KMSE> UHE> KHE> USE> KSE şeklindedir. Yapılan çalışmada ABTS^{•+} ve DPPH[•] serbest radikalleri indirgeme aktivitelerine ait verilere baktığımızda metanol: su ekstraktının her iki yöntemde de daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmişti. Ancak kuprik iyonu indirgeme kapasitesi verilerine bakıldığında etanol: su ekstraktlarının esansiyel yağdan sonra en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterdiği görülmektedir (Çizelge 4.14). Yapılan çalışmada ultrason uygulamasının hemen hemen tüm ekstraktlar ve uygulanan antioksidan aktivite yöntemlerinde klasik ekstraksiyona kıyasla antioksidan aktiviteyi artırdığı görülmektedir.

Ferula türlerinin kuprik iyon indirgeme kapasiteleri üzerine Web of Science, Pub Med ve Science Direct veri tabanlarında bu konuda yapılmış literatür taramalarında yalnızca iki çalışma olduğu, *F. orientalis* üzerine ise herhangi bir çalışma olmadığı görülmüştür. Tespit edilen çalışmalardan ilki, Çelik *et al.* (2008) tarafından *Ferula rigidula* üzerine yapılan çalışmada Cu⁺² indirgeme kapasitesi TEAC cinsinden 0,07±0,003 mmol/g olarak rapor edilmiştir. Bauratoua *et al.* (2017) ise, *Ferula longipes*'ten izole ettiği 11 farklı flavonoidin (kuersetin-3-O-α-L-ramnopiranosid-7-O-β-D-[2-O-kafeoil]-glukopiranosid, kaempferol-3-O-α-L-ramnopiranosid, kuersetin-3-O-α-L-ramnopiranosid, kaempferol-3-O-β-D-glukopiranosid-7-O-α-L-ramnopiranosid, isorhamnetin-3-O-α-L-ramnopiranosid-7-O-β-D-glukopiranosid, kuersetin-3-O-α-L-ramnopiranosid-7-O-β-D-glukopiranosid, isohramnetin-3,7-di-O-β-D-glukopiranosid, apigenin, apigenin-7-O-β-D-glukopiranosid, 3,5-dikafeoilkuinik asit, deltoin). Cu⁺² indirgeme kapasitelerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada 450 nm dalga boyunda flavonoidlerin indirgeme kapasitelerini 7,250±0,120 ile 13,480±0,380 aralığında belirlemişlerdir.

4.8. GC-MS ile Belirlenen Uçucu Bileşen Kompozisyonu

Hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilmiş esansiyel yağın uçucu bileşen kompozisyonu GC-MS cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 4.32’de uçucu bileşenlere ait GC-MS kromatogramı yer almaktadır.



Şekil 4.32. *Ferula orientalis* L. uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS kromatogramı

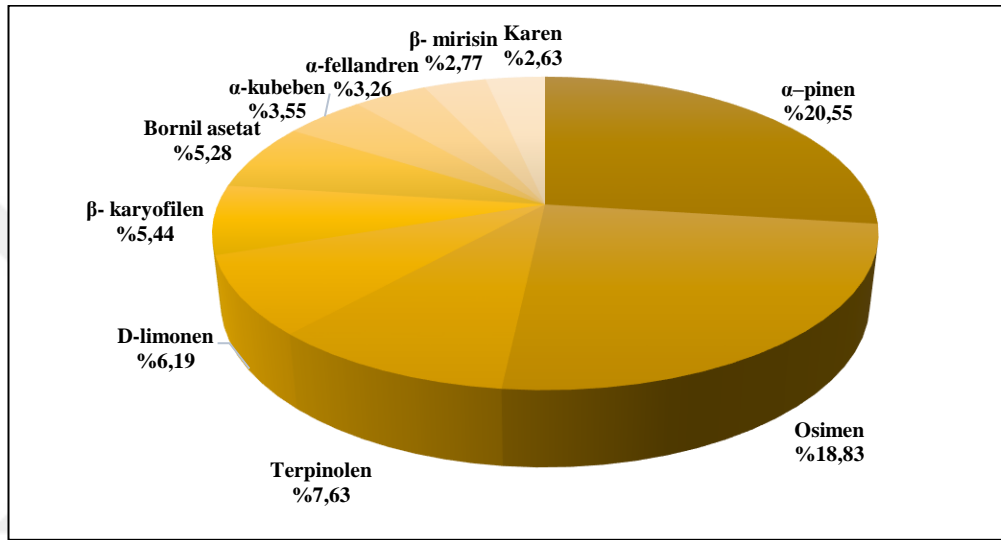
F. orientalis esansiyel yağının %96,29’unu oluşturan 35 uçucu bileşen tespit edilmiştir (Çizelge 4.15). Belirlenen bileşenlerin %67,90’ı monoterpen hidrokarbonlar (kamfen, α -pinen, β -pinen, β -mirsen, α -fellandren, *D*-limonen, osimen, 3-karen, terpinolen, β -pironen), %9,60’ı oksijenli monoterpenler (borneol, kamfenol, isoborneol, terpinen-4-ol, 8-Hidroksi-p-simen, terpineol, safranil, krisantanil asetat, bornil asetat, ojenol), %20,31’i seskiterpen hidrokarbonlar (kopaen, β -elemen, β -karyofilen, humulen, β -Selinen, kurkumen, α -kubeben, selinen, eliksen, murolen, β -humulen) ve %2,19’u oksijenli seskiterpenler (spatulanol, viridiflorol, karyofilen oksit, muurolol)’den oluşmaktadır.

Çizelge 4.15. *Ferula orientalis* L. uçucu yağ bileşenleri

| Bileşenler | RT | % |
|--------------------------------------|--------------|--------------|
| <i>Monoterpen Hidrokarbonlar</i> | | |
| Kamfen | 4,64 | 2,57 |
| α-pinen | 4,26 | 20,55 |
| β -pinen | 5,35 | 0,71 |
| β -mirsen | 5,50 | 2,77 |
| α -fellandren | 6,11 | 3,26 |
| D-limonen | 6,85 | 6,19 |
| Osimen | 6,98 | 18,83 |
| 3-karen | 7,40 | 2,63 |
| β -pironen | 11,43 | 0,24 |
| Terpinolen | 8,83 | 7,63 |
| <i>Oksijenli Monoterpenler</i> | | |
| Borneol | 9,31 | 0,46 |
| Kamfenol | 10,60 | 0,24 |
| Isoborneol | 12,13 | 0,23 |
| Terpinen-4-ol | 12,74 | 0,41 |
| 8-Hidroksi- <i>p</i> -simen | 13,02 | 0,74 |
| Terpineol | 13,55 | 0,62 |
| Safranal | 13,84 | 0,77 |
| Krisantanil asetat | 16,12 | 0,27 |
| Bornil asetat | 17,21 | 5,28 |
| Ojenol | 22,76 | 0,22 |
| <i>Seskiterpen Hidrokarbonlar</i> | | |
| Kopaen | 20,57 | 1,42 |
| β -elemen | 21,26 | 0,92 |
| β-Karyofilen | 22,62 | 5,44 |
| Humulen | 24,04 | 1,07 |
| β -Selinen | 24,57 | 0,21 |
| Kurkumen | 24,96 | 0,54 |
| α -kubeben | 25,27 | 3,55 |
| Selinen | 25,56 | 0,55 |
| Eliksen | 26,04 | 1,05 |
| Murolen | 26,41 | 2,61 |
| β -humulen | 30,84 | 2,20 |
| <i>Oksijenli Seskiterpenler</i> | | |
| Spatulenol | 28,56 | 0,55 |
| Viridiflorol | 28,90 | 0,53 |
| Karyofilen oksit | 29,35 | 0,46 |
| Muurolol | 29,77 | 0,57 |
| TOPLAM | - | 96,29 |

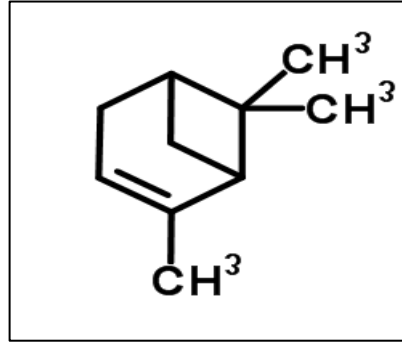
*RT: Alikonma süresi (dk)

F. orientalis esansiyel yağının uçucu bileşen konsantrasyonları %0,21 ile %20,55 arasında değişim göstermektedir (Çizelge 4.15). Konsantrasyonu en düşük bileşen β -Selenin iken, esansiyel yağın majör bileşeni α -pinendir. α -pineni takiben ilk on bileşen; osimen > terpinolen > *D*-limonen > β - karyofilen > bornil asetat > α -kubeben > α -fellandren > β - mirisin > karen şeklinde sıralanmaktadır (Şekil 4.33).



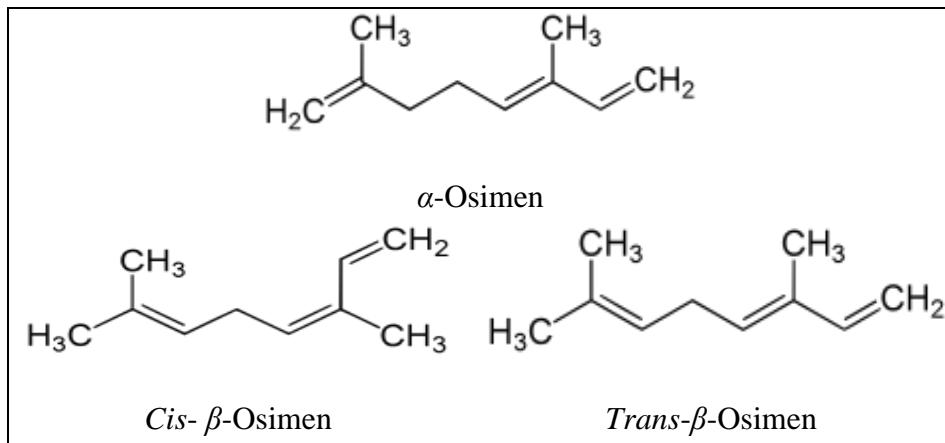
Şekil 4.33. *Ferula orientalis* esansiyel yağının başlıca uçucu bileşenleri

Ferula orientalis esansiyel yağının %20,55'lik oranla majör bileşeni olan α -pinenin (Şekil 4.34) ($C_{10}H_{14}$) IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) adlandırması 2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene'dir. α -pinen hafif çam kokulu, renksiz bir sıvıdır. Bu bileşik doğada en bol bulunan ve en kolay elde edilen hidrokarbonlardan olup kullanım alanları çok geniştir (Balkancı 2010). α -pinen doğada birçok bitkinin uçucu yağlarında çok yaygın bir şekilde görülmekte olup, özellikle kozalaklı ağaçların esansiyel yağlarında yüksek miktarda bulunmaktadır (Yoo 2000; Azizoglu 2004). α -pinenin izomerizasyonu ile ticari değeri α -pinenden daha yüksek olan kamfen, isoborneol, isobornilasetat ve kamfor bileşikler sentezlenmektedir (Roma'n-Aguirre 2007). Toksik etkileri açısından α -pinen tam olarak incelenmemiş olup; yüksek konsantrasyonlarının cilt, göz, solunum sistemi ve mukozal membranlarda tahrip edici olduğu belirlenmiştir (Balkancı 2010).



Şekil 4.34. α -pinenin moleküler yapısı

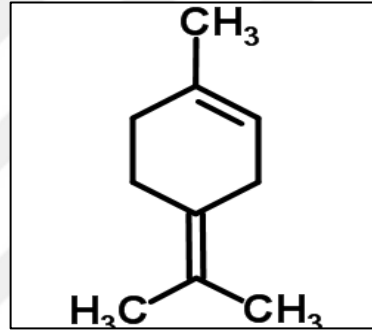
F. orientalis esansiyel yağının ikinci büyük uçucu bileşeni olan (%18,83) osimenin ismi; Eski Yunanca'da 'fesleğengiller' anlamına gelen *Ocimum* ('ώκτιμον') familyasından gelmektedir. Osimenin kokusu meyvemsi ve çiçeğimsi olarak tanımlanmaktadır. Monoterpen ailesinin önemli bir üyesi olan osimen bitkiler tarafından vejetasyon sürecinde atmosfere salınmaktadır (Alvarado *et al.* 1998; Noe *et al.* 2006). Osimenin α -osimen (3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene) ve β -osimen (3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene) anomerleri bulunmaktadır. β -osimen, *cis*- β -osimen ve *trans*- β -osimen izomerlerini içermektedir (Şekil 4.35). Osimenin insanlarda etkili *Candida* türleri üzerine antifungal aktivite gösterdiği rapor edilmektedir (Golfakhrabadi *et al.* 2014).



Şekil 4.35. Osimen izomerlerinin moleküler yapıları

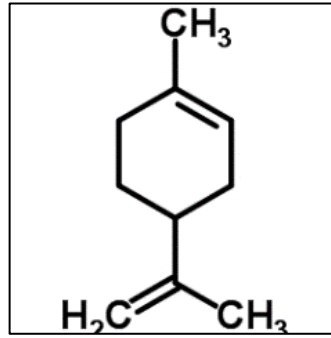
Terpinolen (1-methyl-4-(propan-2-ylidene)cyclohexene) (Şekil 4.36), saydamdan açık sarı renge kadar değişim gösteren, suda çözünmeyen ve sudan daha düşük yoğunluğa

sahip olan bir sıvıdır (Cameo 2018). Plastik ve salatalık benzeri bir aromasının olduğu ifade edilmektedir (Seo and Baek 2005). Birçok esansiyel yağın bileşiminde bulunan terpinolen özellikle turunçgil, nane, yabanmersini (*Pastinaca sativa*) yağlarında majör bileşen olup, oranı %40-70 aralığında değişmektedir (HMDB 2017). Bu uçucu bileşenin, *F. orientalis* esansiyel yağındaki miktarı ise %7,63 olarak tespit edilmiştir. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Escherichia coli*'ye karşı antibakteriyel etki gösterdiği (Eftekhari *et al.* 2005; Habibi *et al.* 2010) ve antioksidan etkisi sayesinde düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu önlediği (Grassmann *et al.* 2005) rapor edilmektedir.



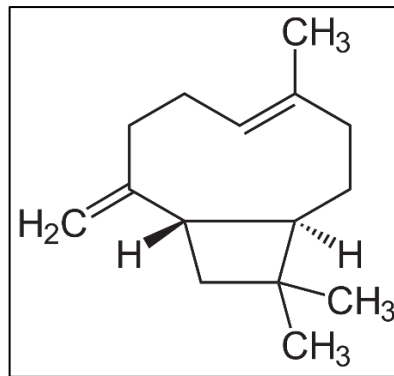
Şekil 4.36. Terpinolenin moleküler yapısı

%6,9 oranı ile *F. orientalis* esansiyel yağının dördüncü büyük bileşeni olan *D*-limonen (1-metil-4-(1-metiletenil)sikloheksan), limon benzeri kokuya sahip GRAS (genel olarak güvenilir kabul edilen) listesinde yer alan, renksiz ve sıvı formda bulunan monosiklik bir monoterpendir (Şekil 4.37). Güzel narenciye kokusu nedeniyle parfüm, sabun, yiyecek ve içeceklerde bir lezzet ve koku maddesi olarak kullanılmaktadır (Sun 2007). *D*-limonenin antikanser aktivitesi (Sun 2007), anti-inflamatuar etkisi (Hirota *et al.* 2010) kanda açlık kan şekeri ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) konsantrasyonunu düşürdüğü (Jing *et al.* 2013) ve obez farelerde yağ hücrelerini parçalayarak kilo kaybı sağladığı (Shen *et al.* 2005) tespit edilmiştir.



Şekil 4.37. *D*-limonenin moleküler yapısı

UIPAC adlandırması (1R,4E,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene olan β -karyofilen *Ferula orientalis* esansiyel yağının beşinci büyük bileşenidir (Şekil 4.38). β -karyofilen karanfil ve terebentin arası bir kokuya sahip olan, soluk sarı renkli yağlı bir sıvıdır. Bir seskiterpen olan β -karyofilen *Eugenia caryophyllata*, *Myrica gale* ve *Comptonia peregrina* gibi çeşitli bitkilerin esansiyel yağlarında bulunmaktadır (Zheng *et al.* 1992; Sylvestre *et al.* 2005). Esansiyel yağ bünyesinde β -karyofilen genellikle isokaryofilen ve/veya α -karyofilen (α -humulen) ile birlikte bulunmaktadır (Budavari 1996). β -karyofilenin antiinflamatuvar (Cho *et al.* 2007), antikarsinojenik (Kubo *et al.* 1996), antimikrobiyal (Pichette *et al.* 2006), antioksidan (Lourens *et al.* 2004; Singh *et al.* 2006) ve lokal anestezik (Ghelardini *et al.* 2001) aktiviteleri belirlenmiştir.



Şekil 4.38. β -karyofilenin moleküler yapısı

Yapılan literatür taramasında *F. orientalis* L. esansiyel yağ kompozisyonunu içeren iki çalışma tespit edilmiştir. Kartal *et al.* (2007) tarafından Sivas ilinde yetişen *F. orientalis*

esansiyel yağında GC-MS ile uçucu bileşenlerin %90,3'ünü oluşturan 39 bileşen tespit etmiş ve majör bileşeni β -fellandren (%23,6) olarak belirlemişlerdir. β -fellandren'in yanı sıra belirlenen ilk on bileşen arasında; β -o-simen (%13,8), α -pinen (%12,5), α -fellandren (11,5), dehidro seskisineol (%10,1), 2,5-dimetil-3-(1-hidroksietil)-furan (%2,4), α -bisabolol (%2,2), β -mirisin (%2), β -atlantol (%1,1) ve bornil asetat (%0,9) bulunmaktadır. Ozkan *et al.* (2012)'ın gerçekleştirdiği çalışmada ise Erzurum ilinde yetişen *F. orientalis* bitkisinin yaprak ve çiçek kısmına ait esansiyel yağ kompozisyonu belirlenmiştir. Bitkinin yaprak kısmından elde edilen esansiyel yağın %83,4'ünü oluşturan 103 bileşenin saptandığı görülmektedir. Esansiyel yağın majör bileşenini α -kadinol (%10,4) olarak belirleyen araştırmacılar, diğer ana bileşenleri δ -kadinen (%8,1), germakren *D*-4-ol (%6,8), epi- α -muurolol (%5,9), karyofilen oksit (%3,9), himachalol (%3,5), α -muurolen (%3,4), γ -kadinen (%2,6), α -muurolol (%1,5), spatulenol (%1,2) ve oplapanon (%0,9) olarak sıralamışlardır. Kartal *et al.* (2007) ve Ozkan *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmalar ile yaptığımız bu çalışma karşılaştırıldığında; tespit edilen bileşenlerin genel olarak benzer olduğu ancak majör bileşenler ve konsantrasyonlarının farklı olduğu dikkat çekmektedir. Bu durumun toprak kompozisyonu, iklim ve coğrafik orjin gibi çevresel (Munoz-Bertomeu *et al.* 2007) ve genetik (Hannover 1992) farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

F. orientalis'in uçucu bileşen profili ana bileşenlerinden bazıları diğer *Ferula* türleri ile aynı olsada bazı bileşenler farklılık göstermektedir. *Ferula heuffelii* esansiyel yağının majör bileşenleri elemisin (%35,4) ve miristisin (%20,6) (Pavlovic' *et al.* 2012), 9 farklı yerde yetişen *F. assafoetida* bitkisinin incelendiği bir araştırmada ise majör bileşen, %37,30 - %53,99 aralığında değişim gösteren (*E*)-profenil sek-butyl disülfid olarak tespit edilmiştir (Moghaddam and Farhadi 2015). Kavooosi *et al.* (2012) ise *F. assafoetida*'nın esansiyel yağ kompozisyonunun ağırlıklı olarak; (*E*)-profenil sek-butyl disülfid (%62,7)'in yanı sıra β -osimen (%21,7%) ve β -pinen (%5)'i de içerdiğini belirlemişlerdir. Farklı ülkelerde yetişen *F. communis* bitkileri üzerine yapılmış araştırmalarda ana bileşenlerin, İtalya'da yetişen bitkilerde α -odesmol ve β -odesmol (Maggi *et al.* 2015), Fransa'ya bağlı Korsika Adası'nda yetişen *Ferula* yapraklarında mirsen (Ferrari *et al.*

2005), Yunanistan'da yetişen aynı bitkide α -odesmo ve γ -kadinen (Manolakou *et al.* 2013) olduğu rapor edilmiştir.

F. gummosa oleogam reçinesinde Mortazaienezhad and Sadeghian (2006) yağ kompozisyonunun %82'sini monoterpenlerin oluşturduğunu ifade etmektedir. Ghannadi and Amree (2002), Ghasemi *et al.* (2005) Abedi *et al.* (2008) ve Kouyakhi *et al.* (2008) ise aynı reçinenin ortalama %73 ile %88 aralığında ağırlıklı olarak α - pinen, β - pinen, δ -3-karen ve sabineni içeren monoterpen hidrokarbonlardan oluştuğunu rapor etmişlerdir. Jalali *et al.* (2013) ise *Ferula gummosa* oleogam reçinesinin monoterpenlerin yanı sıra; bulnesol, α -eudesmol ve α -bisabolol gibi seskiterpenik bileşikler de içerdiğini vurgulamışlardır. Maggi *et al.* (2009) tarafından farklı bir *Ferula* türü olan *F. glauca*'nın esansiyel yağ kompozisyonu üzerine yapılan çalışmada, bitkinin yaprak ve köklerinden ekstrakte edilmiş esansiyel yağın ağırlıklı olarak (*E*)-karyofilen, karyofilen oksit, miristisin ve elemisinden oluştuğunu belirlemişlerdir. Mandegary *et al.* (2004)'e göre, yapılan fitokimyasal çalışmalar *F.gummosa*'nın umbelliprenin ve terpenoidler gibi kumarin türevlerini ve linalool, terpinolen ve valencene gibi seskiterpenleri içerdiği belirlenmiştir. *Ferula hermonis* rizom ve kök esansiyel yağlarında 79 uçucu bileşen belirlenmiş ve bu bileşenlerin içerisinde konsantrasyonu en yüksek olanların sırasıyla α - pinen (%43,3), α -bisabolol (%11,1) ve 3,5-nonadiyn (%4,4) olduğu tespit edilmiştir (Al-Ja'fari *et al.* 2013).

4.9. Antimikrobiyal Aktivite

İnsan sağlığı üzerine olumsuz etkisi olan birçok mikroorganizma yanlış antibiyotik ve yanlış doz kullanımı yüzünden ilaçlara karşı direnç göstermektedir. Ülkemizde antibiyotiklerin gereksiz ve aşırı düzeyde kullanımının önlenmesi adeta bir devlet politikası haline gelmiştir. Sentetik olarak üretilen ilaçlara ilave olarak, özellikle bitkisel kaynaklardan elde edilecek antimikrobiyal aktivite gösteren doğal bileşenlerin ve dozlarının belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Esansiyel yağlar uçucu bileşenlerin kompleks karışımları olup, temelde biyosentetik olarak ilişkili iki grup içermektedirler (Pichersky *et al.* 2006). Bu ana gruplar düşük molekül ağırlıkları ile karakterize edilen terpen ve terpenoidler ile aromatik ve alifatik bileşenleri içermektedir. Çoğu esansiyel yağın gösterdiği antimikrobiyal aktivite oksijenli terpenoidlere (alkoller ve fenolik terpenler gibi) bağlı iken; bazı hidrokarbonların da antimikrobiyal aktivite seğılediğı bilinmektedir (Delaquis *et al.* 2002; Burt 2004). Bu bileşenler arası sinerjistik etkileşimler olabileceğı gibi bazen aksine antogonistik etkileşim de görülebilmektedir. Esansiyel yağın tamamının genellikle majör bileşenlerin karışımından daha yüksek antibakteriyel etkiye sahip olduğu da bazı çalışmalarda görülmekte ve minör bileşenlerin sinerjistik veya antogonistik etki sağlayabildiğı öne sürülmektedir (Mourey and Canillac 2002; de Azeredo *et al.* 2011).

Doğal bileşenlerin antimikrobiyal aktivitelerinin mekanizması henüz tam olarak anlayılamamıştır. Bitki ekstraktları veya esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitesinin içerdikleri fenolik bileşenlerden kaynaklandığı düşünölmektedir. Terpenoid ve fenolik bileşenlerin membran parçalama etkileri, fenoller ve flavonoidlerin metal çelatlama aktiviteleri ve kumarinler ile alkaloidlerin genetik materyal üzerindeki etkilerinin mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe ettiğı düşünölmektedir (Negi 2012). Antimikrobiyal etkileşimin başlıca yeri olan bakterinin dış hücre zarı veya sitoplazmik zar, iki katmanlı fosfolipidler ve proteinlerden oluşmaktadır. Sitoplazmik zarın fiziksel olarak zarar görmesi sonucu; protonların hareket gücü ve elektron akışı bozulmakta; hücre içeriğı pıhtılaşmakta ve membranla ilişkili enzimlerin aktivitesi engellenerek içeriğın aktif transportu engellenmektedir. Bu durum bakterinin ölümü ile sonuçlanmaktadır (Burt 2004; Shimamura *et al.* 2007; Perumalla and Hettiarachchy 2011).

F. orientalis L. esansiyel yağı ve ekstraktları ile Ofloxacin ve Amphotericin B'nin antimikrobiyal aktiviteleri; inhibisyon zonu çapları ve MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$) ile tespit edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.16'da sunulmuştur.

Çizelge 4.16. Ekstraktlar ve esansiyel yağın antimikrobiyal aktivitesi

| Ekstraktlar | | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptococcus mutans</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Penicillium roqueforti</i> |
|-------------|-----|-------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| KSE | KD | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 12,7±0,2 ^{cd} | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a |
| | MİK | - | - | - | 125 | - | - | - | - |
| USE | KD | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 11,7±0,1 ^c | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a |
| | MİK | - | - | - | 125 | - | - | - | - |
| KESE | KD | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 12,7±0,2 ^b | 16,7±0,3 ^e | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 14,7±0,2 ^e | 0,0±0,0 ^a |
| | MİK | - | - | 500 | 31,25 | - | - | 250 | - |
| UESE | KD | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 12,7±0,2 ^b | 17,5±0,3 ^e | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 16,3±0,2 ^f | 0,0±0,0 ^a |
| | MİK | - | - | 500 | 31,25 | - | - | 125 | - |
| KMSE | KD | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 12,0±0,1 ^b | 13,7±0,3 ^d | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 12,7±0,1 ^{bc} | 0,0±0,0 ^a |
| | MİK | - | - | 500 | 62,5 | - | - | 500 | - |
| UMSE | KD | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 11,7±0,1 ^b | 13,7±0,3 ^d | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 13,3±0,2 ^d | 0,0±0,0 ^a |
| | MİK | - | - | 500 | 62,5 | - | - | 500 | - |
| KHE | KD | 10,3±0,3 ^e | 7,2±0,1 ^b | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 5,7±0,3 ^b | 11,1±0,3 ^b | 12,1±0,1 ^c | 14,7±0,3 ^d |
| | MİK | 500 | 500 | - | - | 500 | 500 | 500 | 500 |
| UHE | KD | 10,0±0,1 ^{de} | 8,1±0,2 ^d | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 6,0±0,1 ^c | 10,7±0,1 ^b | 13,0±0,3 ^{cd} | 13,3±0,2 ^c |
| | MİK | 500 | 500 | - | - | 500 | 500 | 500 | 500 |
| KKE | KD | 9,3±0,1 ^d | 8,2±0,2 ^d | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 6,1±0,2 ^c | 0,0±0,0 ^a | 11,3±0,2 ^{bc} | 10,7±0,3 ^b |
| | MİK | 500 | 500 | - | - | 500 | - | 500 | 500 |
| UKE | KD | 8,8±0,2 ^c | 7,7±0,1 ^c | 0,0±0,0 ^a | 0,0±0,0 ^a | 6,2±0,1 ^c | 11,3±0,3 ^b | 10,7±0,2 ^b | 11,0±0,3 ^b |
| | MİK | 500 | 500 | - | - | 500 | 500 | 500 | 500 |
| EY | KD | 7,3±0,1 ^b | 9,1±0,2 ^e | 16,7±0,2 ^c | 7,7±0,1 ^b | 6,7±0,2 ^d | 13,3±0,1 ^c | 21,3±0,4 ^g | 10,3±0,3 ^b |
| | MİK | 500 | 250 | 250 | 125 | 250 | 500 | 62,5 | 500 |
| A | KD | 14±0,1 ^f | 32,2±0,3 ^f | 33,0±0,3 ^d | 23,3±0,4 ^f | 8,2±0,1 ^e | 15,3±0,2 ^d | 21,3±0,1 ^g | 11,5±0,2 ^b |
| | MİK | 125 | 7,8 | 7,8 | 7,8 | 62,5 | 250 | 62,5 | 250 |

*Her sütun için istatistikî analiz kendi içerisinde yapılmış ve aynı harfle gösterilen ortalamalar P<0,05 önem seviyesinde aynı olarak kabul edilmiştir.

**KD; 100 µl ekstrakt ile doldurulmuş 5 mm çaplı kuyu etrafındaki inhibisyon zonu (mm)

*** -; belirlenememiştir.

****A; Antibiyotikler. Bakteriler için; Ofloxacin, Maya ve Küfler için; Amphotericin B'yi ifade etmektedir.

*****MİK değerleri µg/ml cinsindedir.

Klasik ve ultrasonik yöntemler kullanılarak elde edilen ekstraktların *E.coli*'ye karşı sergilemiş olduğu inhibisyon zonu çaplarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.17'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde çözücü türü değişkeninin *E.coli*'ye karşı inhibisyon çapları üzerine $p<0,01$ seviyesinde önemli olduğu belirlenirken; işlem değişkeni ile işlem x çözücü interaksiyonunun etkilerinin ise $p>0,05$ düzeyinde istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmektedir. Çizelge 4.16'da; su, etanol: su ve metanol: su çözücülerinin kullanıldığı klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş ekstraktlardan hiç birinin *E.coli*'ye karşı herhangi bir antimikrobiyal aktivite sergilemediği görülmektedir. Ekstraktlar, esansiyel yağ ve Oflaxacin açısından çizelge değerlendirildiğinde; en yüksek inhibisyon çapı ve MİK değerinin sırasıyla; 14 mm ve 125 µg/ml ile Oflaxacin antibiyotigine ait olduğu; klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş n-hekzan ve kloroform ekstraktları ile esansiyel yağın minimum inhibisyon konsantrasyonlarının ise 500 µg/ml olduğu dikkat çekmektedir. Yani n-hekzan ve kloroform ekstraktları ile esansiyel yağ *E.coli* üzerine düşük düzeyde antimikrobiyal aktivite sergilemektedir.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir Gram (-) bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı inhibisyon zonu çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçlarının incelenmesinden anlaşılacağı üzere; çözücü türü değişkeni ile işlem x çözücü interaksiyonunun *Pseudomonas aeruginosa* üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuştur (Çizelge 4.17). Diğer taraftan, işlem değişkeninin inhibisyon zonu çapı değerleri üzerine etkisi ise istatistiki olarak önemsiz ($p>0,05$) olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.16 incelendiğinde, *P. aeruginosa* üzerine ekstraktların sergilediği antimikrobiyal aktivitenin, *E.coli*'ye karşı gösterilen antimikrobiyal aktiviteye çok benzediği görülmektedir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu su, etanol: su ve metanol: su çözücülerinin kullanıldığı ekstraktlarda belirlenemezken, kloroform ve n-hekzanın kullanıldığı ekstraktlarda 500 µg/ml olarak bulunmuştur. Ekstraktlardan farklı olarak, esansiyel yağın orta düzeyde antimikrobiyal aktivite sergilediği ve inhibisyon zonu çapı 9,6 mm iken; MİK değerinin 250 µg/ml olduğu saptanmıştır.

Elde edilen veriler, kullanmış olduğumuz Gram (-) bakteri suşlarına karşı sergilenen antimikrobiyal aktivitenin, klasik veya ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş kloroform ve

n-hekzan ekstraktlarına kıyasla; Oflaxacin kadar olmasada, hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilmiş esansiyel yağda yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durumun, *Ferula orientalis* esansiyel yağının baskın bileşenlerinden α - pinen (%20,55), osimen (%18,83), terpinolen (%7,63), *D*-limonen (%6,19) veya diğer majör veya minör terpenoid bileşiklerden kaynaklabileceği düşünülmektedir. Aggarwall *et al.* (2002), *D*-limonen gibi terpenoid bileşiklerin geniş bir mikroorganizma spektrumunda oldukça aktif olduklarını ifade etmektedirler. Benzer şekilde, α -pinenin de bakteriyostatik etki gösterdiği belirtilmektedir (Lanciotti *et al.* 2004; Lima *et al.* 2005).

Divya *et al.* (2014), *F. asefoetida* bitkisine ait iki farklı çeşitten (Irani ve Pathani) hidrodistilasyon yöntemi ile izole ettiği esansiyel yağların *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella paratphi*, *Yersinia enterocolitica* ve *Salmonella typhi* bakterileri üzerine minimum inhibitör konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla kuyu difüzyon metodunu kullanmışlardır. Pathani çeşiti esansiyel yağın *E.coli* ve *B.subtilis* üzerine en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi sergilediğini belirten araştırmacılar, inhibisyon zonu ve MİK değerlerini her iki bakteri için sırasıyla; $18\pm0,04$ mm; 5 $\mu\text{g/ml}$ ve $28\pm0,05$ mm; 5 $\mu\text{g/ml}$ olarak rapor etmiş ve esansiyel yağın antimikrobiyal aktivitesinin içerdiği β -pinen ve limonen ile disüfitler gibi bileşenlere bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Çizelge 4.17. Çayır ekstraktlarının çalışmada kullanılan bakteri, maya ve küflere karşı oluşturduğu inhibisyon zonu değerlerine ait varyans analiz sonuçları

| Varyasyon Kaynağı | SD | <i>Escherichia coli</i> | | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | <i>Staphylococcus aureus</i> | | | <i>Streptococcus mutans</i> | | |
|-------------------|----|---------------------------------|---------|---------|-------------------------------|----------|---------|------------------------------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 0,533 | 2,614 | 0,122 | 0,056 | 1,341 | 0,260 | 0,033 | 0,048 | 0,829 | 0,008 | 0,021 | 0,885 |
| Çözücü (B) | 4 | 163,783 | 802,859 | 0,000** | 108,871 | 2592,175 | 0,000** | 270,633 | 386,619 | 0,000** | 387,417 | 989,149 | 0,000** |
| A x B | 4 | 0,283 | 1,389 | 0,274 | 0,406 | 9,675 | 0,000** | 0,033 | 0,048 | 0,995 | 0,633 | 1,617 | 0,209 |
| Hata | 20 | 0,204 | | | 0,042 | | | 0,700 | | | 0,392 | | |
| Genel | 30 | | | | | | | | | | | | |
| Varyasyon Kaynağı | SD | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | | <i>Candida albicans</i> | | | <i>Aspergillus niger</i> | | | <i>Penicillium roqueforti</i> | | |
| | | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) | (KO) | (F) | (P) |
| İşlem (A) | 1 | 8,640 | 81,257 | 0,000** | 35,861 | 502,729 | 0,000** | 0,225 | 0,232 | 0,635 | 0,300 | 0,600 | 0,448 |
| Çözücü (B) | 4 | 98,080 | 922,386 | 0,000** | 144,045 | 2019,327 | 0,000** | 203,948 | 210,111 | 0,000** | 285,033 | 570,067 | 0,000** |
| A x B | 4 | 8,375 | 78,765 | 0,000** | 39,261 | 550,393 | 0,000** | 3,831 | 3,947 | 0,016* | 0,633 | 1,267 | 0,316 |
| Hata | 20 | 0,106 | | | 0,071 | | | 0,971 | | | 0,500 | | |
| Genel | 30 | | | | | | | | | | | | |

*p<0,05 düzeyinde önemli **p<0,01 düzeyinde önemli

İran’da yaygın olarak yetişen bir bitki türü olan *Ferula cupularis*’in çiçek, yaprak ve kök esansiyel yağlarının uçucu bileşenleri ile *E.coli* ve *P.aeruginosa*’ı içeren altı farklı bakteri üzerine minimum inhibitör konsantrasyonlarını belirleyen Alipour *et al.* (2015), en yüksek antibakteriyel aktiviteyi bitki kökünün esansiyel yağında belirlemişlerdir. MİK değerlerinin *E.coli* için 2,85 mg/ml, *P.aeruginosa* için 22,75 mg/ml olarak belirlendiği *F. cupularis* esansiyel yağının uçucu bileşen profili incelendiğinde; bir adet monoterpen hidrokarbon, 23 adet oksijenli monoterpen, 2 adet seskiterpen ve 6 adet oksijenli seskiterpenden oluştuğu belirlenmiş ve esansiyel yağın sergilediği antimikrobiyal aktivitenin içeriğinin büyük kısmını oluşturan oksijenli monoterpenlerden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir.

Nguir *et al.* (2016) Tunus’da yetişen *Ferula communis* L. bitkisinden hidrodistilasyon yöntemi ile elde ettiği yaprak esansiyel yağının *P. aeruginosa* üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilediğini (MİK: 0,156 mg/ml); aynı bitkinin kökünden elde edilen esansiyel yağın *S. aureus*’a karşı zayıf aktivite gösterirken (MİK:2,5 mg/ml), *E.coli*’ye karşı önemli düzeyde inhibisyon etkisi gösterdiğini (MİK: 0,312 mg/ml); çiçek esansiyel yağının ise yalnızca *P.aeruginosa*’a karşı etkili olduğunu (MİK: 1,25 mg/ml) belirtmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerini içerdikleri seskiterpenlere atfetmişlerdir.

Klasik ve ultrasonik yöntemler kullanılarak elde edilen ekstraktların *S. aureus*’a karşı sergilemiş olduğu inhibisyon zonu çaplarına ait varyans analiz sonuçları incelendiğinde (Çizelge 4.17); çözücü türü değişkeninin *S. aureus*’a karşı inhibisyon çapları üzerine $p<0,01$ seviyesinde önemli olduğu belirlenirken; işlem değişkeni ile işlem x çözücü interaksyonunun etkilerinin ise $p>0,05$ düzeyinde istatistiki olarak önemsiz olduğu görülmektedir. Çizelge 4.16’da görüldüğü gibi su, hekzan ve kloroform çözücülerinin kullanıldığı ekstraktlar *S.aureus* üzerine herhangi bir antibakteriyel aktivite göstermemektedir. Ekstraktlar ve esansiyel yağ açısından veriler değerlendirildiğinde, etanol: su ve metanol: suyun çözücü olarak kullanıldığı ekstraktlarda inhibisyon zonu çaplarının 11,7 mm ile 12,7 mm arasında değişim gösterdiği, MİK değerlerinin ise 500 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Ultrases işleminin genel olarak ekstraktların

antimikrobiyal aktivitesinde önemli bir değişikliğe sebep olmadığı görülmektedir. Esansiyel yağa ait antimikrobiyal aktivitenin ekstraktlara kıyasla daha yüksek olduğu (inhibisyon zonu çapı 16,7 mm, MİK değeri ise 250 µg/ml) fakat Oflaxacin'e göre (inhibisyon zonu çapı 33,0 mm, MİK değeri ise 7.8 µg/ml) oldukça düşük olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir Gram (+) bakteri olan *Streptococcus mutans*'a karşı inhibisyon zonu çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçları; çözücü türü değişkeninin *Streptococcus mutans* üzerine istatistiksel olarak çok önemli ($p<0,01$) düzeyde etkili olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.17). Diğer taraftan, işlem değişkeni ile işlem x çözücü interaksyonunun inhibisyon zonu çapı değerleri üzerine etkileri ise istatistiki olarak önemsiz ($p>0,05$) olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.16 incelendiğinde; ekstraktlar ve esansiyel yağın *Streptococcus mutans*'a karşı sergiledikleri antimikrobiyal aktivitenin, diğer test edilen mikroorganizmalardan çok farklı olduğu dikkat çekmektedir. Su ve etanolün çözücü olarak kullanıldığı ekstraktlar, test edilen diğer 7 mikroorganizmadan hiç birine karşı etkili olmazken, *S.mutans*'ı önemli düzeyde etkilemişlerdir. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş su ekstraktlarının MİK değerleri 125 µg/ml iken; etanolün kullanılması durumunda 31,25 µg/ml'ye yükselmiştir. MİK değerleri açısından antimikrobiyal aktivitenin saptandığı numuneler değerlendirildiğinde sıralamanın; Oflaxacin (7,8 µg/ml)> KESE ve UESE (31,25 µg/ml)> KMSE ve UMSE (62,5 µg/ml)> KSE, USE ve EY (125 µg/ml) şeklinde olduğu görülmektedir.

İnsan ağız boşluğunda doğuştan itibaren 200-300 tür bakteri, maya ve protozoa bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar arasındaki dengenin bozulması, günümüzün en yaygın kronik hastalıklarından biri olan diş çürüğüne sebep olmaktadır. Diş minesine yapışarak asit üreten ve ortam pH'sını 5,5 altına düşürerek diş minesi demineralizasyonuna ve sonuçta diş çürüğüne neden olan en önemli bakteri *S.mutans*'tır (Çakır vd 2010). Doğu Anadolu Bölgesi'nde halk tarafından salamura edilerek tüketilen çadır bitkisinin su ekstraktının bile antimikrobiyal aktivitesinin yüksek oluşu (MİK: 125 µg/ml), bitkiyi sıklıkla tüketenlerin diş çürüğü vakasıyla daha az karşılaşabileceğini akla getirmektedir.

Ferula orientalis'in, *S.mutans* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı gösterdiği antibakteriyel etki üzerine Web of Sciece, Google Scholar, Scopus ve Science Direct veri tabanlarında yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Maggi *et al.* (2009) *Ferula glauca* kök, çiçek, yaprak ve meyve esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini incelediği bir araştırmada, MİK değerlerini; *S.mutans* için 310-1250 µg/ml, *E.coli* için 625 µg/ml, *S.aureus* için 625-1250 µg/ml aralıklarında ve *C.albicans* için 1250 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Bulgular, *F.orientalis*'e ait verilerle kıyaslandığında; mikroorganizmaların her biri üzerine *F. glauca*'nın kök, çiçek, yaprak ve meyve esansiyel yağlarındansa, *F.orientalis* sap esansiyel yağının daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği net bir şekilde görülmektedir. Farklı bir çalışmada, Fani *et al.* (2015) *Ferula assafoetida* su ve etanol ekstraktlarında belirlediği minimum inhibisyon konsantrasyonlarını *S.mutans*'a karşı 12,5 mg/ml ve *S.sanguis*'a karşı 6,25 mg/ml olarak rapor etmişlerdir. Pavlovic *et al.* (2015) ise, *Ferula heuffelii* toprak altı kısımlarından elde ettiği kloroform ve metanol ekstraktlarında orta derecede antimikrobiyal aktivite belirlediklerini ifade etmişlerdir. Her iki ekstraktında Gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğunu vurgulayan araştırmacılar, en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi belirledikleri minimum konsantrasyonların kloroform ve metanol ekstraktlarında sırasıyla *Staphylococcus aureus* için 12.5 g/ml ve 12.5 g/ml; *Micrococcus luteus* için ise 50 g/ml ve 12.5 g/ml olduğunu rapor etmişlerdir.

Candida albicans'a karşı inhibisyon zonu çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçlarının incelenmesinden anlaşılacağı üzere (Çizelge 4.17); işlem ve çözücü türü değişkeni ile işlem x çözücü interaksyonunun *Candida albicans* üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) bulunmuştur. Çizelge 4.16 incelendiğinde, *Ferula orientalis*'in su, etanol: su ve metanol:suyun çözücü olarak kullanıldığı ekstraktları ile klasik yöntem ile elde edilmiş kloroform ekstraktının *C.albicans*'a karşı herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı görülmektedir. En yüksek antimikrobiyal aktivite Amphotericin B tarafından 250 µg/ml konsantrasyonunda 15,3 mm inhibisyon zonu ile sergilenirken; ekstraktlar ve esansiyel yağın 10,7-13,3 mm aralığında inhibisyon zonu ve 500 µg/ml konsantrasyonunda minimum inhibisyon gösterdikleri belirlenmiştir.

Saccharomyces cerevisiae'ya karşı inhibisyon zonu çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçları, işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun *Saccharomyces cerevisiae* üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.17). *Saccharomyces cerevisiae* açısından Çizelge 4.16 değerlendirildiğinde; en yüksek antimikrobiyal aktivitenin Amphotericin B antibiyotiği (8,2 mm inhibisyon zonu ve 62,5 µg/ml MİK değeri)'nin ardından esansiyel yağa ait olduğu (6,7 mm inhibisyon zonu ve 250 µg/ml MİK değeri) görülmektedir. Kloroform ve n-hekzanın çözücü olarak kullanıldığı ekstraktlarda inhibisyon zonu çapları 5,7 mm- 6,2 mm arasında değişim gösterirken, MİK değerleri 500 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Ferula heuffelii esansiyel yağının majör bileşenlerini elemisin (%35,4) ve miristin (%20,6) olarak belirleyen Pavlovic' *et al.* (2012), esansiyel yağın en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *Candida albicans*'ın iki farklı suşu, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis* ve *Micrococcus flavus*'a karşı gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar tarafından belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri sırasıyla; 7 µg/ml ve 13,7 µg/ml, 13,7 µg/ml, 17,6 µg/ml, 21,1 µg/ml ve 28,2 µg/ml'dir. Al-Ja'fari *et al.* (2013), *Ferula hermonis* köklerinden elde ettiği hekzan, diklorometan, metanol ve su ekstraktlarında *C.albicans* ve *S. cerevisiae* üzerine antimikrobiyal aktiviteyi tüm ekstraktlarda 256 µg/ml minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada kullandığımız küflerden biri olan *Aspergillus niger*'e karşı inhibisyon zonu çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçlarının incelenmesinden anlaşılacağı üzere; çözücü türü değişkeninin *Aspergillus niger* üzerine etkisi istatistiksel olarak çok önemli ($p<0,01$) bulunmuştur. Çizelge 4.16 *A.niger* açısından değerlendirildiğinde, klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilmiş su ekstraktlarının herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermedikleri anlaşılmaktadır. Diğer taraftan, çizelgede dikkati çeken en önemli nokta esansiyel yağın *A.niger*'e karşı Amphotericin B ile aynı düzeyde antimikrobiyal aktivite göstermesidir (inhibisyon zonu: 21,3 mm, MİK: 62,5 µg/ml). Esansiyel yağı takiben en yüksek antimikrobiyal aktivite değerleri ultrasonik yöntemle elde edilmiş etanol: su ekstraktı (inhibisyon zonu:16,3 mm, MİK: 125 µg/ml) ve klasik yöntemle elde edilmiş

etanol: su ekstraktı (inhibisyon zonu:14,7 mm, MİK: 250 µg/ml)'na aittir. Diğer ekstraktlarda ise inhibisyon zonları 10,7 mm ile 13,3 mm arasında değişirken, minimum inhibisyon konsantrasyonları 500 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Penicillium roqueforti'ye karşı inhibisyon zonu çapı değerlerine ait varyans analiz sonuçları; çözücü türü değişkeninin *Penicillium roqueforti* üzerine etkisinin istatistiksel olarak çok önemli ($p<0,01$) olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.17). Diğer taraftan, işlem değişkeni ile işlem x çözücü interaksyonunun inhibisyon zonu çapı değerleri üzerine etkileri ise istatistiki olarak önemsiz ($p>0,05$) olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.16 *Penicillium roqueforti* açısından incelendiğinde; su, etanol ve metanolün çözücü olarak kullanıldığı ekstraktların herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmektedir. Çizelgede görülen en yüksek antimikrobiyal aktivite değeri Amhotericin B antibiyotikine ait (inhibisyon zonu:11,5 mm, MİK: 250 µg/ml) iken; diğer ekstraktların inhibisyon zonu çapları 10,3 mm ile 14,7 mm arasında değişim göstermekte, MİK değerleri ise 500 µg/ml'dir.

Yapılan literatür taramasında *Ferula* türlerinin küfler üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin çalışıldığı çok az araştırmanın olduğu görülmektedir. Bu araştırmalardan biri, Zia-Ul-Haq *et al.* (2011) tarafından yapılmış ve *Ferula assafoetida* reçinesinin orta düzeyde antimikrobiyal aktivite sergilediğini ve MİK değerlerinin, *C.albicans* için; 5 mg/ml, *S.cerevisiae* için; 10mg/ml ve *A.niger* için; 10 mg/ml olduğu rapor edilmiştir. Kavooosi *et al.* (2013) ise, yine *Ferula assafoetida* reçinesinin antimikrobiyal aktivitesini; *A. niger*'e karşı 0,022-0,036 mg/ml, *C. albicans*'a karşı ise 0,018-0,028 mg/ml olarak belirlemiştir.

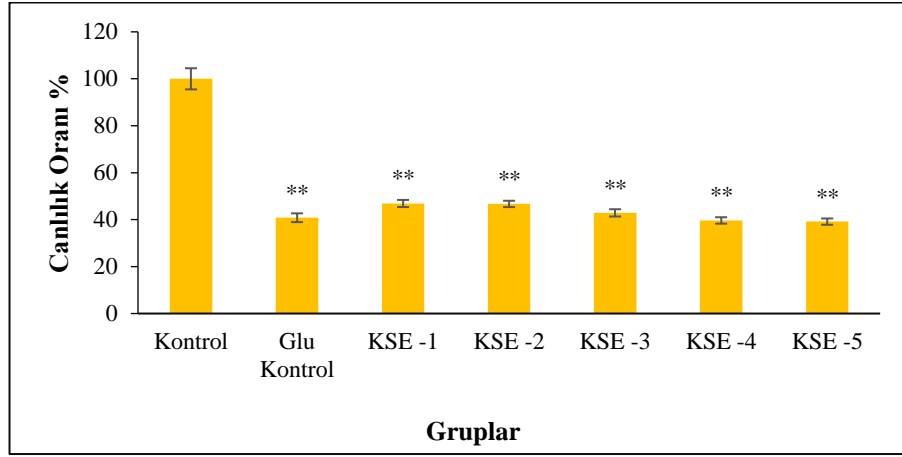
4.10. İn Vitro Nöroprotektif Aktivite

Hücre kültürü; herhangi bir çok hücreli canlıdan alınan hücrelerin, laboratuvar ortamında ısı, nem ve besin ihtiyacı gibi şartların kontrol edilmesine ilaveten kontaminasyonun engellenerek yaşatılmasıdır (Tokur ve Aksoy 2017). Canlıların herhangi bir organ veya dokusundan alınan hücrelerin kullanılabilmesi, alınan hücrelerin yapay olarak oluşturulmuş bir ortamda yaşatılabilmesi, hücre metabolizmasında spesifik bir fonksiyonun değerlendirilmesi, kısa zamanda çok sayıda numune ile çalışılabilmesi, alınan sonuçların kantitatif ve karşılaştırılabilir olması, toksik özellikteki materyallerin hayvan deneylerine geçmeden saptanmasını sağlaması ve etik kaygıların giderilmesi açısından hücre kültürü çalışmaları sıklıkla tercih edilmektedir. Hücre kültürleri kanser ile ilaç ve aşı geliştirme çalışmalarının yanı sıra in vitro sitotoksisite çalışmaları için de tercih edilmektedir (Gilbert and Boutros 2016).

4.10.1. Ekstraktlar ile esansiyel yağın MTT sitotoksisite sonuçları

‘Sitotoksik’ kelimesi, ‘hücre ölümüne neden olan zehirli madde’ anlamına gelmektedir. Sitotoksisite çalışmalarında, bir maddenin sitotoksik potansiyele sahip olup olmadığı belirlenmektedir. Kullanılan materyalin doz ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrenin sitotoksisite derecesi değişmektedir (Galluzzi *et al.* 2009).

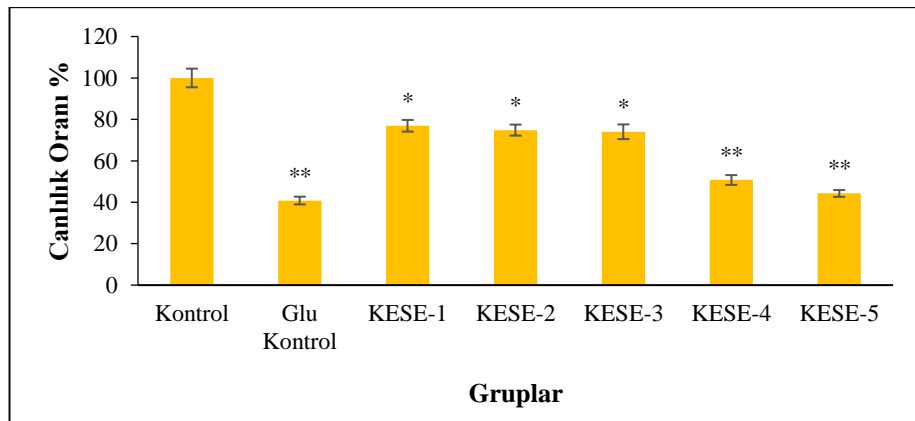
Klasik ve ultrasonik yöntemlerle hazırlanan su, etanol: su, metanol: su, n-hekzan ve kloroform ekstraktları ile esansiyel yağın glutamat ile oluşturulmuş nörotoksisite üzerine etkisi nöron hücre hattı kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraktlar ve esansiyel yağ nöron kültür ortamına ilave edildikten sonra 24 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında MTT solüsyonu ilave edilerek canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler One Way Anova yöntemiyle analiz edilip, anlamlılık değerleri negatif kontrol ile karşılaştırılmıştır. Ekstrakt ve esansiyel yağ stok çözeltilerinden hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki dozlar kullanılarak yapılmış olan MTT testi ile hücre canlılıklarına ait grafikler aşağıda sunulmuştur.



Şekil 4.39. Klasik yöntemle elde edilmiş su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri

* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Şekil 4.39'da görüldüğü gibi, canlılık oranı hiçbir işlem uygulanmamış olan kontrol grubunda %100 iken glutamat ile indüklenmiş kontrol grubunda canlılık oranı %40'lara kadar düşmektedir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında klasik su ekstraktına ait tüm deney grupları $p < 0,001$ düzeyinde anlamlılık gösterdiği görülmektedir. Yani, klasik yöntemle elde edilen su ekstraktının tüm konsantrasyonlarda hiçbir nöroprotektif etki göstermediği tespit edilmiştir. Glutamat tarafından oluşturulan nöron toksisitesini suda çözünen bileşenlerin hiçbirinin önleyemediği görülmektedir.

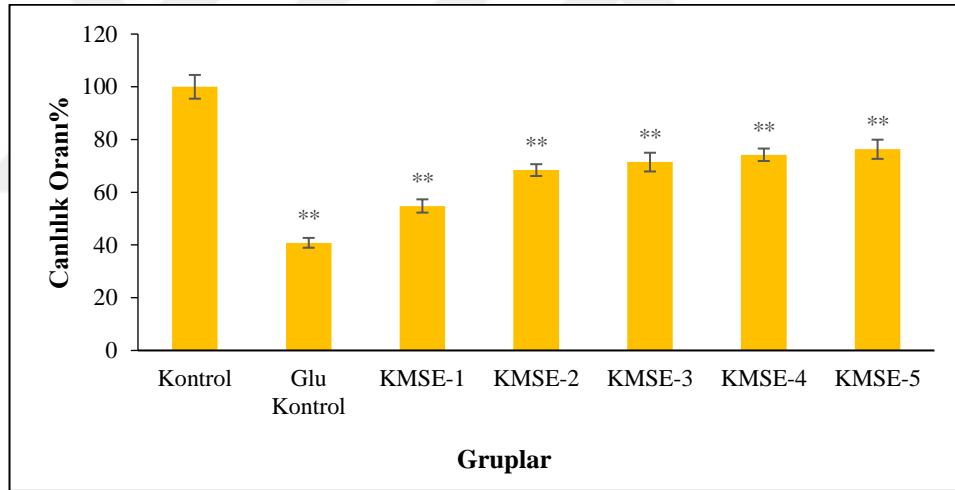


Şekil 4.40. Klasik yöntemle elde edilmiş etanol: su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri

* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Klasik yolla elde edilen etanol: su ekstraktına ait nöroprotektif etki MTT sonuçları Şekil 4.40'da gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, ölüm oranı glutamat kontrol grubunda yaklaşık %59 iken klasik yolla hazırlanan etanol: su ekstraktlarında 10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar %23- %26 aralığında değişim göstermektedir. 10^{-4} ve 10^{-5} 'lik gruplarda ise; ekstrakt konsantrasyonunun düşmesinden dolayı nöroprotektif etkinin zayıf olduğu belirlenmiştir.

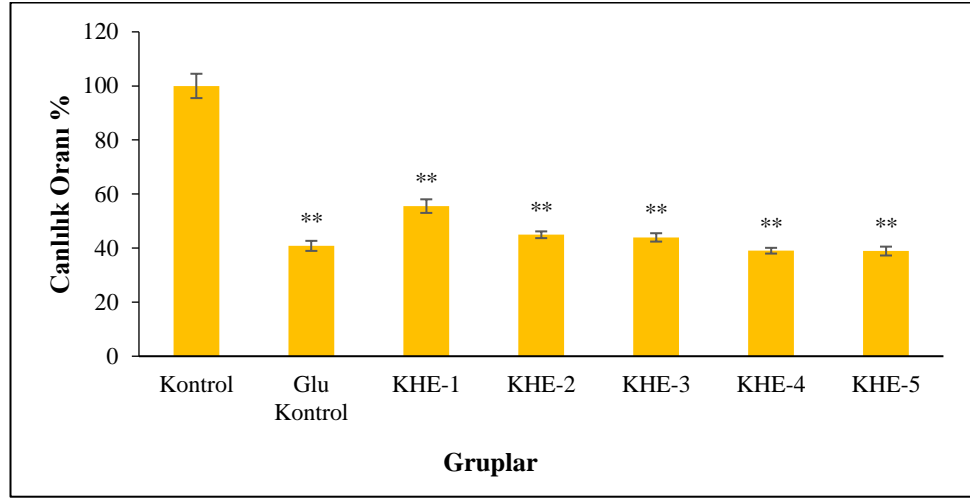
10^{-1} 'den 10^{-3} 'e kadar olan gruplar negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında $p<0,05$ düzeyinde anlamlılık gösterdikleri görülmektedir. 10^{-4} ve 10^{-5} konsantrasyonuna sahip gruplar ise kontrol grubuna göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlılık göstermektedir. Elde edilen verilere göre, klasik etanol: su ekstraktı yüksek konsantrasyonlarda çok düşük düzeyde de olsa nöroprotektif etkiyi yansıtmaktadır.



Şekil 4.41. Klasik yöntemle elde edilmiş metanol: su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri

* kontrol grubuna göre ($p<0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p<0,001$) düzeyinde anlamlı

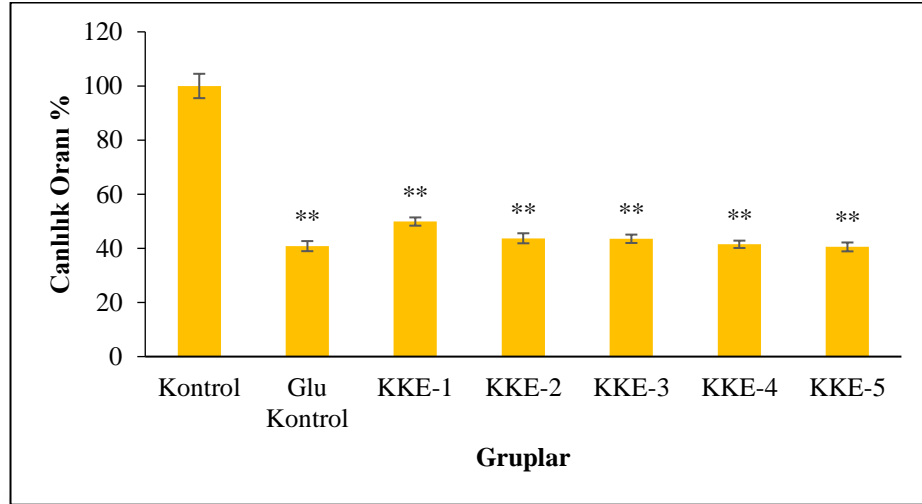
Şekil 4.41'de sunulan verilere göre, klasik metanol: su ekstraktının konsantrasyonundaki düşüşle birlikte canlılık oranlarının 10^{-1} 'den 10^{-5} 'e kadar arttığı görülmektedir. Ancak, bu artış kontrol grubuyla karşılaştırıldığında canlılık oranının en yüksek olduğu 10^{-5} grubunda bile, %24'lük bir ölüm oranını göstermektedir. Bu veriler kontrol grubundan $p<0,001$ düzeyinde farklılık göstermektedir. Yani nöroprotektif etki çok belirgin değildir.



Şekil 4.42. Klasik yöntemle elde edilmiş n-hekzan ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri

* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Klasik n-hekzan ekstraktına ait verileri içeren Şekil 4.42’de göre, canlılık oranı kontrol grubunda %100 iken; glutamat kontrol grubunda %40’lara kadar düşmektedir. Düşük düzeyde de olsa canlılık oranı ve dolayısıyla nöroprotektif etki, 10^{-1} konsantrasyonunda glutamat kontrol grubuna göre artış göstermektedir. Ancak, kontrol grubuyla kıyaslandığında deney grupları $p < 0,001$ düzeyinde anlamlılık göstermektedirler. Elde edilen verilere göre, n-hekzan ekstraktının en yüksek konsantrasyonunda çok hafif olmak kaydıyla, diğer konsantrasyonların hiçbir nöroprotektif etki göstermediği tespit edilmiştir. Bu durum, *F. orientalis*’in yağda çözünen bileşiklerin yüksek konsantrasyonda kullanılması durumunda nöron koruyucu etki gösterebileceği fikrini yansıtmaktadır.



Şekil 4.43. Klasik yöntemle elde edilmiş kloroform ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri

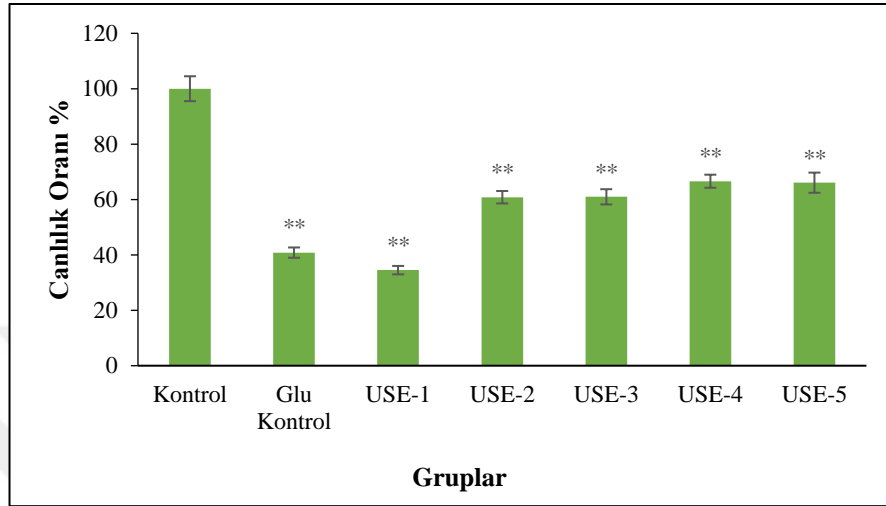
* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Klasik kloroform ekstraktına ait MTT analizi verileri değerlendirildiğinde (Şekil 4.43), yüksek konsantrasyonlarda (10^{-1} ve 10^{-2} gruplarında) glutamat kontrol grubuna göre canlılık oranlarında hafif bir artış gözlenmektedir. Ancak, negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm deney grupları $p < 0,001$ düzeyinde anlamlılık göstermektedir. Yani, klasik kloroform ekstraktının farklı konsantrasyonlarının nöroprotektif etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak, klasik kloroform ekstraktı ile klasik n-hekzan ekstraktlarının 10^{-1} 'lik konsantrasyonlarında diğer konsantrasyonlara göre daha yüksek canlılık oranlarına rastlanması, yağda çözünen bileşiklerin yüksek konsantrasyonda kullanılması durumunda nöron koruyucu etkinin görülebileceği ihtimalini güçlendirmektedir.

Genel olarak klasik yolla elde edilen farklı ekstraktların nöronları glutamat toksisitesinden koruyamadığı veriler ile tespit edilmiştir. Nöroprotektif aktivitenin ekstraksiyon yöntemi ile değişebilme durumunu ortaya koymak için aynı analizler ultrason ile elde edilmiş ekstraktlara da uygulanmıştır.

Ultrasonik banyoda 35 kHz frekansta elde edilen ekstraktlar nöron kültür ortamına ilave edildikten sonra 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edilmiştir. Sonrasında MTT solüsyonu ve çözücü (DMSO) ilavesi ile 570 nm dalga boyunda nöron hücrelerinin canlılık

yüzdeleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler One Way Anova yöntemiyle analiz edilmiş ve anlamlılık değerleri negatif kontrol ile karşılaştırılarak aşağıda sunulmuştur.

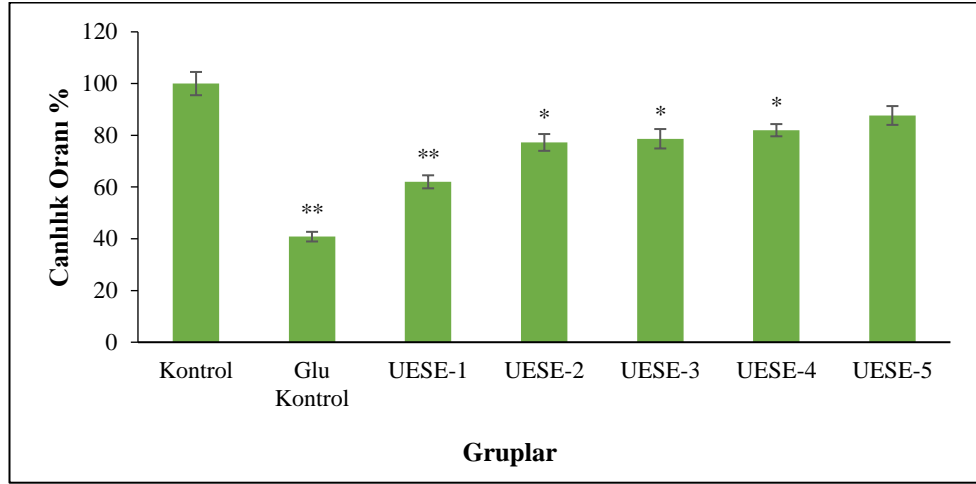


Şekil 4.44. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri

* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Ultrasonik yöntemle elde edilen su ekstraktının MTT verileri Şekil 4.44'de sunulmuştur. Verilere göre, ekstrakt konsantrasyonundaki düşüşle birlikte canlılık oranları 10^{-2} 'den 10^{-5} 'e kadar artmaktadır. Ancak, bu artış negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en yüksek canlılık oranının görüldüğü 10^{-5} grubunda bile yaklaşık %34'lük bir ölüm oranını görülmektedir. Tüm gruplar, kontrol grubundan $p < 0,001$ düzeyinde farklılık göstermektedir. Yani ultrasonik su ekstraktlarının nöroprotektif etkisi belirgin değildir.

Ultrasonik yöntemle elde edilen su ekstraktının verileri klasik yöntemle elde edilen su ekstraktının verileri ile kıyaslandığında; canlılık oranı ultrasonik yöntemde yaklaşık %20 daha fazla olarak saptanmıştır. Klasik su ekstraktında kontrol grubuna göre; en yüksek canlılık oranı %46 oranı ile 10^{-2} grubuna ait iken, ultrasonik su ekstraktının 10^{-2} grubu yaklaşık %61 canlılık oranı sergilemekte ve bu değer artarak 10^{-5} grubunda ise %66'yı bulmaktadır.

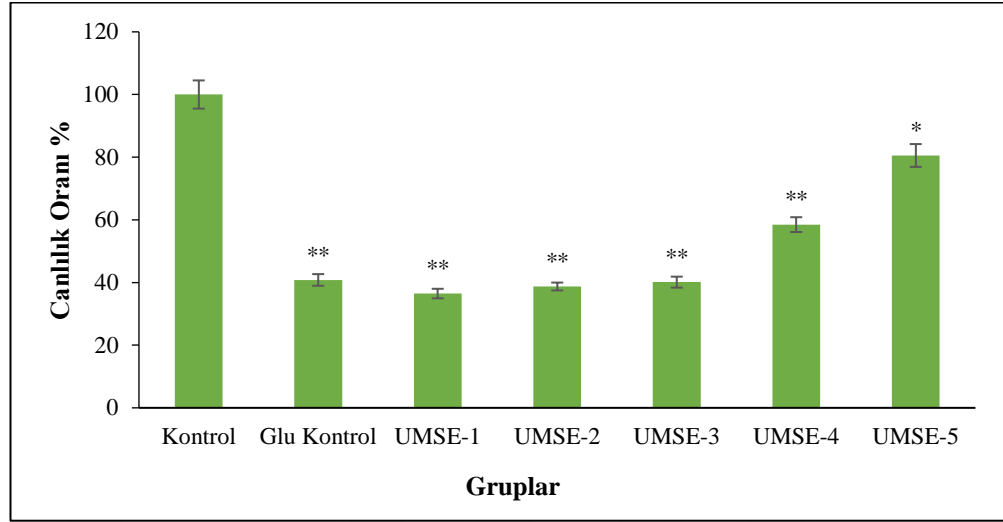


Şekil 4.45. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş etanol: su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri
* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Ultrasonik yöntemle elde edilen etanol: su ekstraktına ait nöron koruyucu etki verileri Şekil 4.45’de sunulmuştur. Elde edilen verilere göre, ultrasonik etanol: su ekstraktının konsantrasyonundaki düşüşle birlikte canlılık oranlarının 10^{-1} ’den 10^{-5} ’e kadar tüm gruplarda kademeli olarak arttığı görülmektedir. 10^{-1} , 10^{-2} ve 10^{-3} gruplarında canlılık oranları sırasıyla; %62,02, %77,25 ve %78,67 olarak bulunurken; 10^{-4} ve 10^{-5} gruplarında canlılık oranının en yüksek seviyede (sırasıyla; %81,98 ve %87,67) olduğu belirlenmiştir.

Verileri kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda; 10^{-1} ve 10^{-2} - 10^{-4} aralığında sırasıyla; $p < 0,001$ ve $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi belirlenirken, 10^{-5} grubunda negatif kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Yani, 10^{-5} grubu en yüksek nöron koruyucu etkiye sahip olduğundan negatif kontrol grubu ile benzer etkiyi göstermektedir.

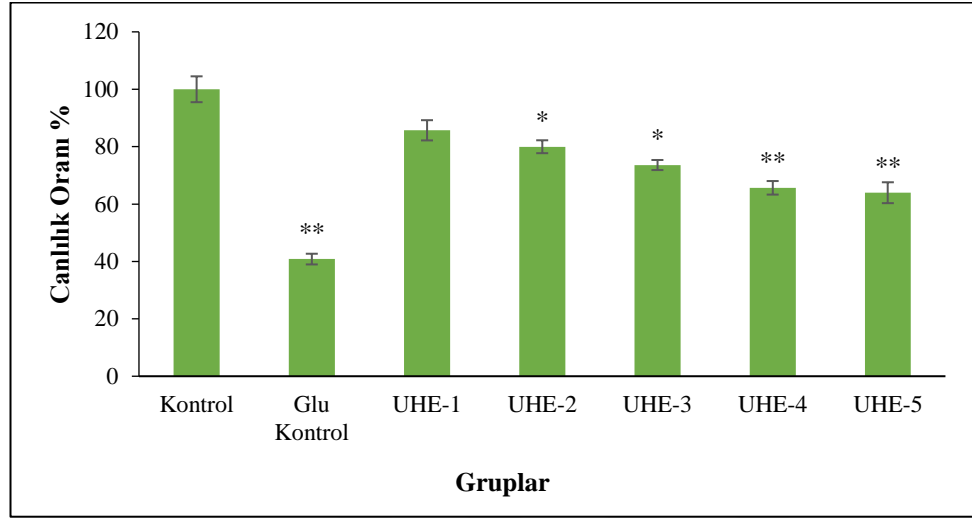
Ultrasonik etanol: su ekstraktı ile klasik etanol: su ekstraktı verileri kıyaslandığında; en yüksek canlılık oranı klasik yöntemde %77 iken; ultrasonik yöntemde %88 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, klasik etanol: su ekstraktı yüksek dozlarda canlılık oranını artırabilirken, ultrasonik etanol: su ekstraktının düşük konsantrasyonlarda bile yüksek oranda canlılık seviyesini artırdığı görülmektedir.



Şekil 4.46. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş metanol: su ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri
* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Şekil 4.46’da ultrasonik metanol: su ekstraktının canlılık oranlarının 10^{-1} - 10^{-3} konsantrasyon aralığında glutamat kontrol grubuna çok yakın olduğu görülmektedir. Ancak, 10^{-4} ve 10^{-5} gruplarında canlılık oranı hızlı bir şekilde artış göstererek %81’lere kadar artmıştır. Analiz sonucuna göre, en iyi nöron koruyucu etki 10^{-5} ’lik konsantrasyonda görülmekte ve $p < 0,05$ düzeyinde anlamlılık göstererek sadece %19’luk ölüm oranı ile sonuçlanmaktadır.

Klasik ve ultrasonik metanol: su ekstraktı MTT verileri kıyaslandığında; klasik ekstraksiyon gruplarında en büyük canlılık oranı 10^{-5} konsantrasyonunda %76,31 olarak bulunurken; ultrasonik yöntemde 10^{-5} ’lik konsantrasyonda yaklaşık %4 daha fazla canlılık oranı (%80,55) ile nöron koruyucu etki daha belirgin şekilde görülmektedir.

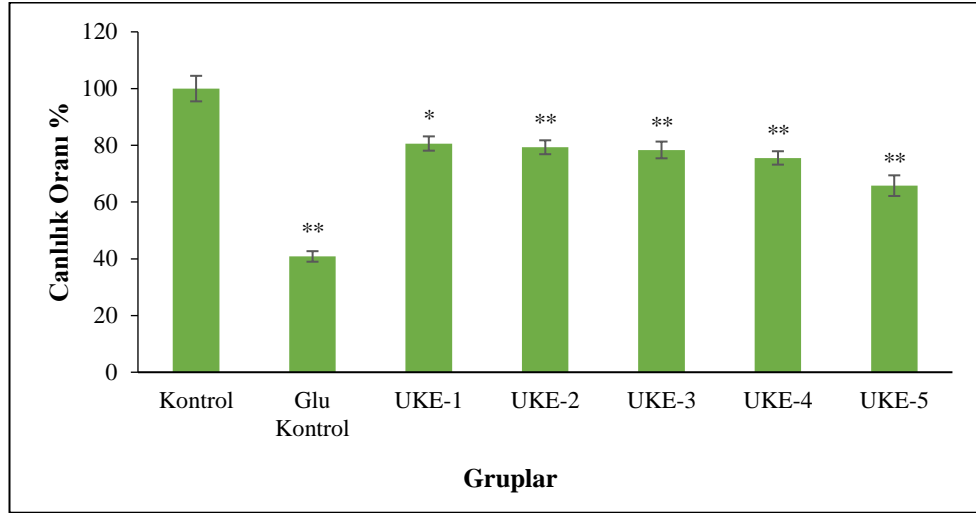


Şekil 4.47. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş n-hekzan ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri

* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Ultrasonik n-hekzan ekstraktına ait MTT analizi verilerinin değerlendirildiği Şekil 4.47'de; ekstrakt konsantrasyonunun yüksek olduğu gruplarda canlılık oranının daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. En düşük konsantrasyonda bile (10^{-5}) canlılık oranı %63,95 olarak tespit edilmiştir. Veriler analiz edildiğinde, 10^{-1} grubu ile negatif kontrol grubu arasında verisel olarak farklılık bulunamamıştır. Oysa, 10^{-2} - 10^{-3} ile 10^{-4} - 10^{-5} grupları arasında negatif kontrol grubuna göre sırasıyla $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ düzeyinde farklılık bulunduğundan 10^{-1} grubuna göre nöron koruyucu etki daha düşük olarak belirlenmiştir.

Klasik yöntemde olduğu gibi ultrasonik n-hekzan ekstraktlarında da en iyi nöron koruyucu etki yüksek konsantrasyonlarda elde edilmiştir. Dolayısıyla, yağda çözünen bileşiklerin yüksek konsantrasyonda kullanılmasının nöron hücreleri üzerine koruyucu etki gösterebileceği fikri daha da kuvvetlendirmektedir.



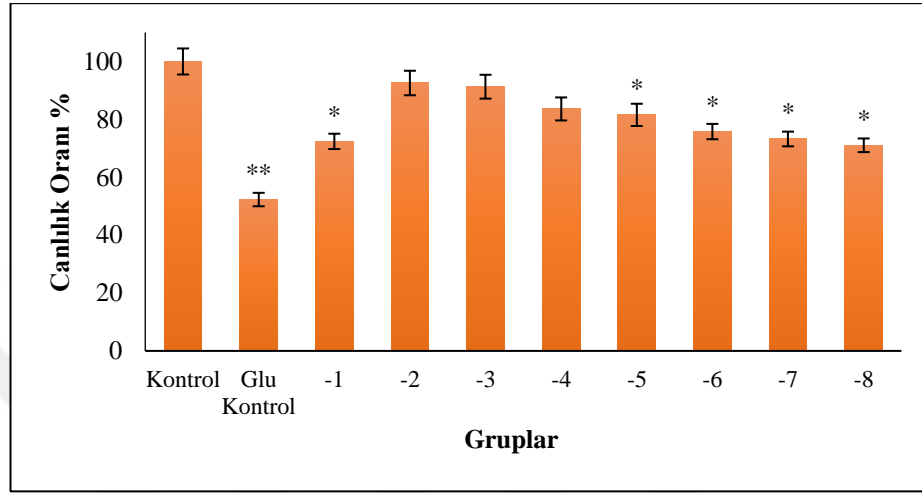
Şekil 4.48. Ultrasonik yöntemle elde edilmiş kloroform ekstraktının 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} konsantrasyonlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine etkileri
* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Ultrasonik yolla elde edilen kloroform ekstraktına ait nöroprotektif etki MTT sonuçları Şekil 4.48'de gösterilmiştir. Elde edilen bulgulara göre ölüm oranı, glutamat kontrol grubunda %40,82 iken; 10^{-1} konsantrasyonu en yüksek canlılık oranını göstermiştir (%80,63). Ayrıca, 10^{-1} 'den 10^{-5} 'e kadar canlılık oranları çok hafif bir şekilde düşmektedir. 10^{-1} grubu negatif kontrol grubuyla kıyaslandığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlılık gösterirken; 10^{-2} ile 10^{-5} grupları ise negatif kontrol grubuna göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlılık göstermektedirler. Ultrasonik ve klasik kloroform ekstraktları nöroprotektif etki açısından benzerlikler gösterse de, ultrasonik yolla elde edilen ekstraktların canlılık oranını yaklaşık %31 daha fazla artırdığı tespit edilmiştir.

Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen n-hekzan ekstraktında olduğu gibi kloroform ekstraktlarında da yüksek konsantrasyonlarda benzer bulgular elde edildiğinden; yağda çözünen maddelerin nöroprotektif aktivite üzerine etkin olduğu net bir şekilde belirlenmiş ve esansiyel yağ üzerinde de aynı analizlerin ve mekanizmaya yönelik daha detaylı analizlerin yapılması düşünülmüştür.

Glutamat toksisitesine karşı, esansiyel yağın nöronlarda canlılık oranları üzerine etkilerinin belirlenebilmesi için MTT testi uygulanmıştır. Bu amaçla, nöron kültürüne 10^{-

10^{-1} - 10^{-8} aralığındaki konsantrasyonlarda esansiyel yağ ilave edilerek 24 saat boyunca 37°C 'de inkübe edilmiş ve MTT solüsyonu eklenerek 570 nm dalga boyunda canlılık oranları tespit edilmiştir.



Şekil 4.49. Çaçır esansiyel yağının glutamat indüklü nörotoksisiteye karşı etkisi

* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

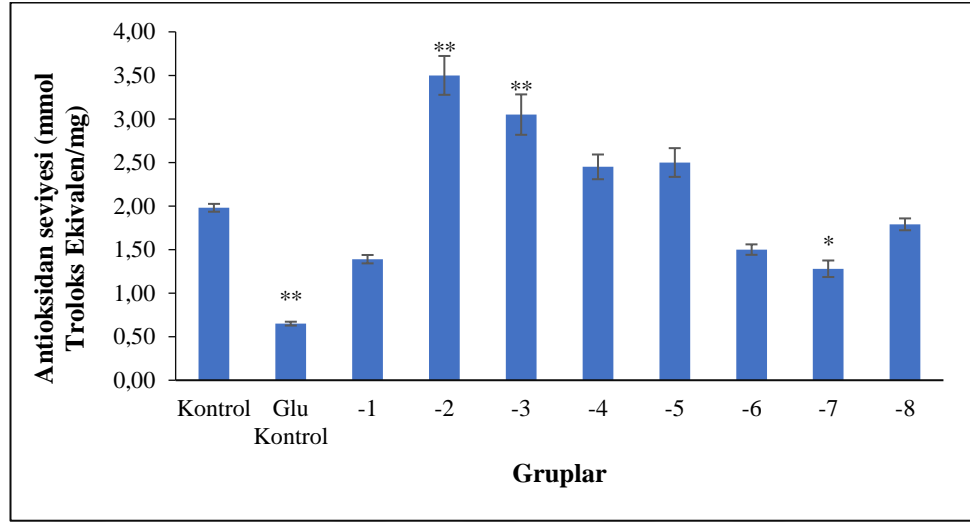
Esansiyel yağa ait MTT sitotoksisite bulguları Şekil 4.49'da görülmektedir. Canlılık oranının tüm konsantrasyonlarda yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Elde edilen verilere göre 10^{-1} 'den 10^{-8} 'e kadar tüm konsantrasyonlarda canlılık oranı en az %71,04 (10^{-8} grubu) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, hücre canlılık oranlarındaki artış 10^{-2} grubunda pik yaparken (%92,57), bu konsantrasyondan itibaren hafif bir düşüş göstermektedir. Sonuçlara göre, en yüksek canlılık oranının tespit edildiği konsantrasyon belirlediğimiz doz aralıkları içerisinde yer almaktadır. Yani, canlılık oranının yükselmesi ve düşüşün başlaması belirlediğimiz konsantrasyonlar dahilindedir.

Yapılan analizlere göre, 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} hariç diğer konsantrasyonlar kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak belirlenmiştir. 10^{-2} - 10^{-4} arası konsantrasyonlarda yapılan One Way ANOVA analizinde ise, hiçbir farklılık bulunamamıştır. Yani nöron koruyucu etki sayesinde 10^{-2} - 10^{-4} arası gruplarda nöronlar canlı tutularak negatif kontrol grubuna yakın değerler elde edilmiştir.

F. orientalis L. esansiyel yağının ekstraktlara kıyasla en yüksek nöroprotektif etkiyi göstermesi sebebiyle esansiyel yağa uygulanan MTT sitotoksosite analizinin yanı sıra; hücre ortamı sıvılarının Ca^{+2} düzeyleri, toplam antioksidan ve toplam oksidan seviyeleri ve apoptoz bulguları da değerlendirilmiştir.

4.10.2. Esansiyel yağ ile muamele edilmiş hücre sıvılarının toplam antioksidan kapasitesi (TAK), toplam oksidan sayısı (TOS) seviyeleri

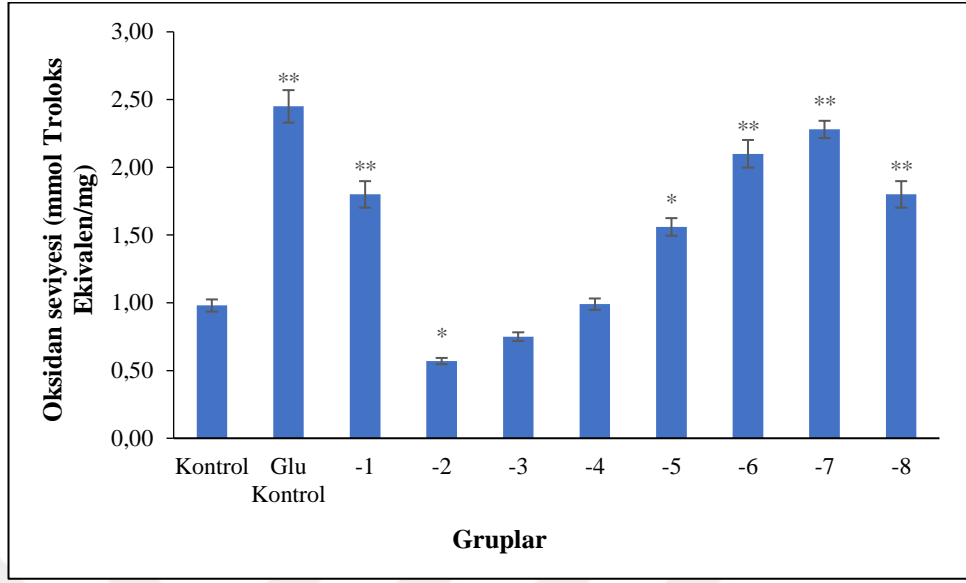
Toplam antioksidan seviyesi, hücrelerin tolere edebilecekleri toksisite oranını göstermektedir. Antioksidan seviyesinin yüksek oluşu hücrenin farklı stres faktörlerinden ve serbest radikallerden korunma gücünün yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Şekil 4.50'de esansiyel yağın farklı konsantrasyonları (10^{-1} - 10^{-8}) kullanılarak 24 saat inkübe edilen hücre ortamlarından uzaklaştırılan sıvıların toplam antioksidan seviyeleri görülmektedir. En yüksek antioksidan aktivite ve canlılık oranı 10^{-2} ve 10^{-3} 'lük konsantrasyonlarda 3,50 ve 3,05 olarak saptanmıştır. En düşük antioksidan kapasitesi ise, en yüksek ölüm oranına sahip olan glutamat kontrol grubunda tespit edilmiştir (0,65). 10^{-3} 'lük konsantrasyondan itibaren antioksidan seviyesinde düşüş gözlenmektedir. Deney gruplarından glutamat kontrol grubu ile 10^{-2} ve 10^{-3} 'lük konsantrasyonlar, hiçbir muamelenin yapılmadığı negatif kontrol grubuna göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlılık ifade ederken; 10^{-7} lik konsantrasyona sahip grup $p<0,05$ seviyesinde anlamlıdır. 10^{-1} , 10^{-4} , 10^{-5} 10^{-6} ve 10^{-8} 'lik gruplar ise kontrol grubu ile fark göstermemektedir.



Şekil 4.50. Hücre sıvılarının toplam antioksidan kapasiteleri (TAK)

* kontrol grubuna göre ($p < 0,05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0,001$) düzeyinde anlamlı

Esansiyel yağa ait MTT ve TAK sonuçları karşılaştırıldığında, canlılık oranı ile antioksidan kapasitesinin ilişkili olduğu görülmektedir. Hücrenin serbest radikal oluşumunu ve stres faktörlerini güçlü bir şekilde elemine etmesi glutamat toksisitesi karşısında nöron hücrelerinin canlı kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca, antioksidan kapasitesinin zayıf oluşu savunma mekanizmalarının yetersiz olması anlamına gelerek; glutamat toksisite grubunda görüldüğü gibi, canlılık oranının yaklaşık %50'ye kadar gerilemesine neden olmaktadır. Esansiyel yağ 10^{-2} ve 10^{-3} konsantrasyonlarda nöronların antioksidan kapasitesini artırarak glutamat artışına bağlı serbest radikallerin oluşumunu ve neticesinde geri dönüşümsüz hücresel hasarın önlenmesine katkıda bulunmuştur. Serbest radikallerin oluşumu, DNA hasarı ve mitokondriyel hasar yaparak hücreyi nekroz ve apoptoza sürüklemektedir.



Şekil 4.51. Hücre sıvılarının toplam oksidan seviyeleri (TOS)

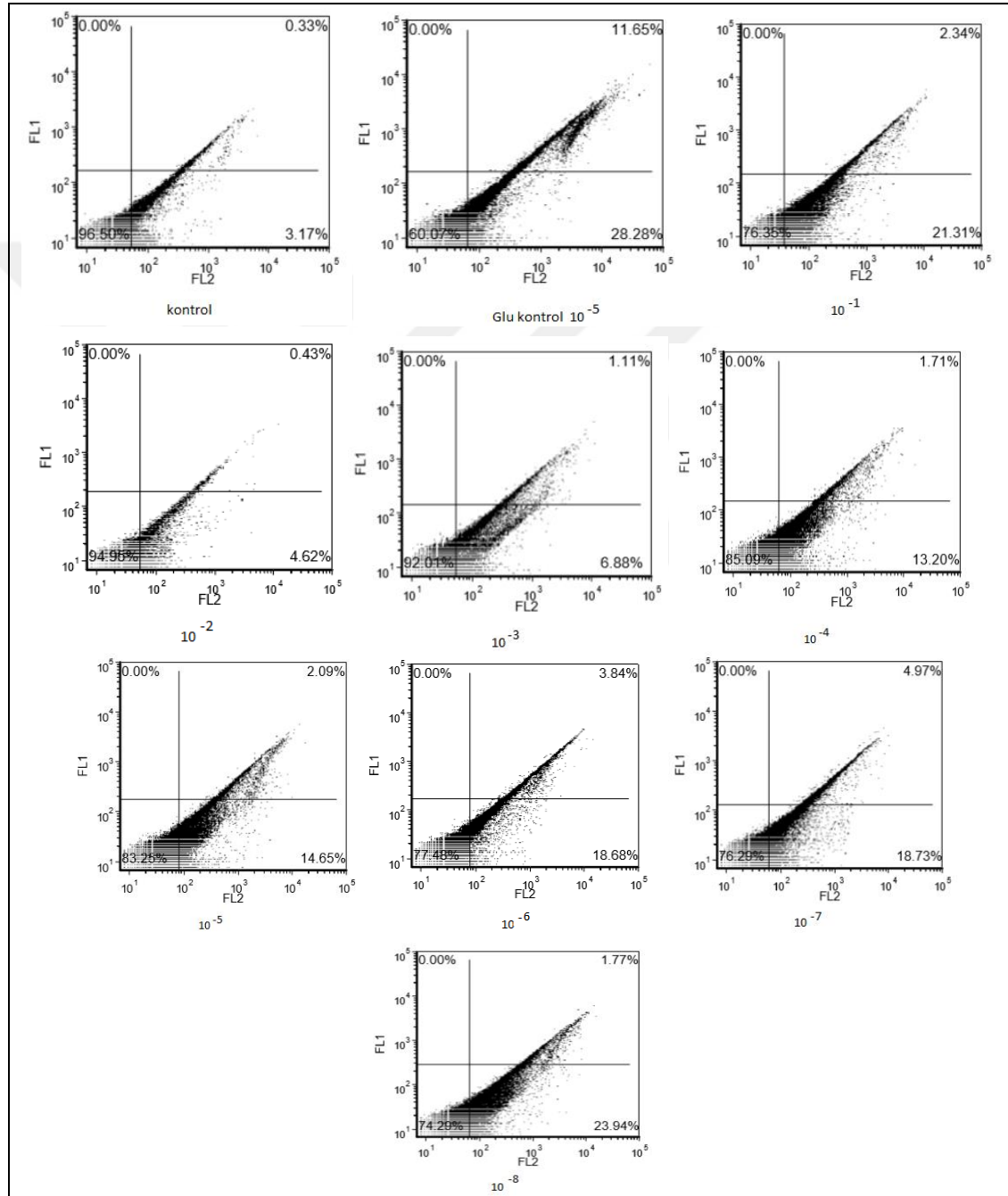
* kontrol grubuna göre ($p < 0.05$) düzeyinde anlamlı, ** kontrol grubuna göre ($p < 0.001$) düzeyinde anlamlı

Esansiyel yağ ile muamele görmüş hücre ortamı sıvılarının toplam oksidan seviyeleri Şekil 4.51’de gösterilmektedir. Oksidan kapasitesi hücrede oluşan serbest radikallerin seviyesini göstermektedir. Toksikite veya hücre hasar durumunda serbest radikal üretimi artış göstermektedir. Elde edilen verilere bakıldığında, TOS seviyelerinin glutamat kontrol, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-1} ve 10^{-8} gruplarında sırasıyla; 2,45, 2,28, 2,10, 1,80 ve 1,80 mmol Troloks Ekvalelen/mg olduğu görülmektedir. Ayrıca bu grupları negatif kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda $p < 0,001$ seviyesinde anlamlılık göstermektedir. Kontrol grubumuzun oksidan kapasitesi 1 iken esansiyel yağın 10^{-2} , 10^{-3} ve 10^{-4} gruplarının TOS seviyeleri (0,57, 0,75 ve 0,99 mmol Troloks Ekvalelen/mg) daha düşük olarak tespit edilmiştir.

4.10.3. Apoptoz bulguları

Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Yani hücrenin aldığı geri dönüşümsüz hasar neticesinde hücre kendi kendini imha etmesidir. Elde edilen MTT sonuçları, canlı ve ölü hücrenin ayırımı yaparken; apoptoz oranı canlı olan hücrelerin ölüme programlanmış olup olmama durumunu göstermektedir. Apoptoz sonucunu tespit etmek için esansiyel yağ ile muamele edilen canlı hücreler, deney tüpüne alınarak propidium iodait (nekrozu

belirlemek için) ve Annexin V (apoptozu belirlemek için) ile boyanmakta ve flow sitometri cihazında 2 farklı dalga boyunda okunarak apoptoz ile nekroz oranları saptanmaktadır.



Şekil 4.52. Kontrol ve deney grupları apoptoz bulguları

Şekil 4.52’de apoptoz deney sonuçları görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubunun canlılık oranı %96.5 iken, glutamat kontrol grubunun canlılık oranı %60,07 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak doz azaldıkça canlılık oranının düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Gruplar arası en düşük canlılık oranı, %74.29 olarak tespit edilmiştir (10^{-8} grubu). Nekroz oranlarına bakıldığında en yüksek nekroz oranı %28,28 ile glutamat kontrol grubuna ait iken; esansiyel yağ gruplarında en yüksek nekroz oranı 10^{-8} konsantrasyonda %23,94 olarak görülmektedir.

Apoptoz oranlarına bakıldığında en yüksek değer, glutamat kontrol grubunda %11,65 olarak görülürken; deney gruplarında en yüksek apoptoz oranı 10^{-7} grubunda (%4,97), en düşük apoptoz oranı ise 10^{-2} grubunda %0,43 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubuna bakıldığında nekroz oranı %3,17 iken, apoptoz oranının %0,33 olduğu görülmektedir. Esansiyel yağ konsantrasyonlarında nekroz oranları en az %4,62 (10^{-2}) en yüksek %23,94 (10^{-8}) olarak belirlenmiştir. Nekroz oranının apoptoz oranına göre yüksek oluşunun nedeni, glutamatla indüklenen toksisitenin hücrenin akut ölümüne neden olmasıdır. Esansiyel yağın 10^{-2} ’den itibaren konsantrasyonundaki düşüş nekroz oranının hızlı bir şekilde yükselmesine yol açmıştır.

Esansiyel yağ miktarının en yüksek olduğu 10^{-1} konsantrasyonunda; esansiyel yağ toksisiteye düşük miktarda katkıda bulunarak canlılığın %76,35’e gerilemesine olanak sağlamıştır. Bu konsantrasyonda nekroz oranı aşırı derecede yüksek olarak %21,31 olarak belirlenmiştir. 10^{-1} ’in bu durumu oluşturma nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak, yağ oranının fazlalığı hücre kültüründeki besin maddesi oranının az olmasına neden olarak hücrelerin aç kalmasına neden olmuş olabilir. Bu durumun, hücrelerin ekstra strese girmelerine neden olarak nekroz oranını artırmış olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.10.4. Hücre ortamı sıvılarının Ca^{+2} düzeyleri

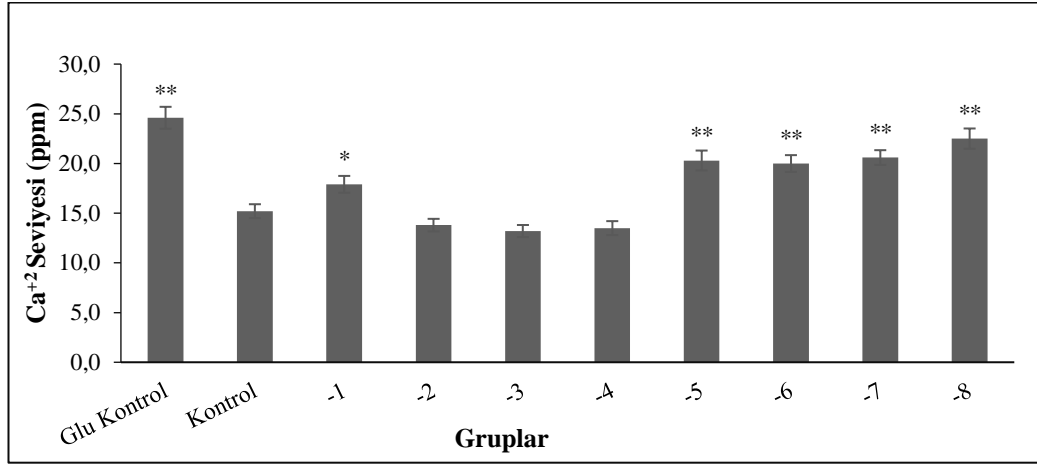
Daha önce de ifade edildiği gibi, esansiyel yağın apoptoz analizi verilerine bakıldığında nekroz oranının fazla olması akut bir ölüm gerçekleştiğini bildirmektedir. Bu durumu

hücrel mekanizma boyutunda kavrayabilmek için hücrenin önemli elementlerinden olan Ca^{+2} elementinin miktarı ICP-MS cihazı ile tayin edilmiştir.

Ca^{+2} iyonu, üremeden apoptoza kadar birçok hücrel fonksiyonun kontrolünden sorumlu ikincil haberci moleküldür (Bouschet and Henley 2005). Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu apoptozda çok önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, hücre ölümü ile ilişkili kalsiyum bağımlı moleküller hakkında yapısal bilginin sınırlı olması nedeniyle Ca^{+2} ve apoptoz arasındaki ilişki detaylı olarak bilinmemektedir (Wu *et al.* 2001). Hücre içi Ca^{+2} 'un geçici olarak yükselmesi kasılma, sekresyon (salgılama), proliferasyon (çoğalma), metabolizma, kalp atışı ve hafıza gibi birçok durumda sinyal rolü oynamaktadır. Ca^{+2} konsantrasyonunun uzun süreli yükselmesi ($10\mu M$ 'ın üzerine çıkması) apoptozu uyarmaktadır ve hücre için tehlikelidir (MacLennan 2000). Nekroz sırasında ise, mitokondriyal reaktif oksijen türleri üretimi artmakta, ATP üretimi azalmakta ve Ca^{+2} kanalları açılmaktadır (Nicotera *et al.* 2004; Golstein and Kroemer 2007).

Hücre ortamındaki Ca^{+2} değişimi; negatif kontrol, pozitif kontrol ve deney gruplarında belirlenerek ölüm ve canlılık oranının değişimi hakkında fikir vermektedir. Ca^{+2} iyonu seviyesinin nöron iletiminde önemli rolünün olduğu ve bu iyonun miktarındaki değişimin hücrelerin canlılık oranları üzerinde oldukça belirleyici olduğu bilinmektedir.

Şekil 4.53'de de görüldüğü gibi elde edilen verilere göre kontrol grubunda Ca^{+2} seviyesi 15,2 ppm olarak belirlenmiştir. Glutamat toksisitesi oluşturulan grupta ise Ca^{+2} seviyesi 24,6 ppm olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, 10^{-2} grubunda 13,8 ppm, 10^{-3} grubunda 13,2 ppm ve 10^{-4} grubunda ise 13,5 ppm olarak diğer gruplara kıyasla Ca^{+2} seviyeleri oldukça düşük olarak belirlenmiştir. 10^{-5} - 10^{-8} arası Ca^{+2} seviyesinin 20,0' den 22,5'a kadar yükseldiği görülmektedir. Hücre dışında bulunan Ca^{+2} miktarının önemi, Ca^{+2} 'un apoptoz hücrel ölüm mekanizmalarında rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Tespit edilen Ca^{+2} seviyeleri, elde edilen MTT sonuçları ile örtüşmektedir.



Şekil 4.53. ICP-MS analizi ile belirlenmiş hücre dışı ortamda bulunan Ca⁺² seviyeleri

Liu *et al.* (2015) yılında yaptıkları araştırmada glutamat toksisitesinin hücrenin mitokondrisinin geçirgenliğini artırarak hücreyi ölüme sürüklediğini göstermiştir. Mevcut çalışmada glutamata bağlı stres faktörlerinin artışının mitokondri hasarına bağlı olduğu görülmektedir. Ancak, esansiyel yağ ile muamele edilen gruplarda esansiyel yağın yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde nöroprotektif aktivite görülmekte ve mitokondriyel hasar oranı düşmektedir.

Web of Science, Science Direct, Google Scholar ve Pub Med veri tabanlarında yapılan literatür taramalarında *F. orientalis* L., ekstraktları ve/veya esansiyel yağının nöroprotektif aktiviteleri üzerine yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak, araştırma kapsamı genişletilerek diğer *Ferula* türlerine bakıldığında, başta *F. assafoetida* olmak üzere bazı türlerin sinir hücreleri üzerine oluşturulmuş modellerde sergiledikleri sitotoksik aktivite sonuçlarının rapor edildiği çalışmalar belirlenmiştir.

Rassouli *et al.* (2011) *Ferula* türlerinin kanser koruyucu aktivitelerinin olduğunu (Iranshahi *et al.* 2008; Iranshahi *et al.* 2010c) ve kanser hücrelerinin multi ilaçlara karşı gösterdiği direnci tersine çevirebildiklerini (Neshati *et al.* 2009; Rassouli *et al.* 2009; Mollazadeh *et al.* 2010; Rassouli *et al.* 2011) rapor etmiştir. Aynı araştırmacılar *F. ovina* köklerinden izole ettikleri bir monoterpen olan stylosinin sitotoksikite ve apoptoz indükleyici etkilerini 5637 ve HFF3 fetal fibroblast hücre hatlarında değerlendirmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, stylosinin 5637 hücre hattı üzerinde tespit edilen IC₅₀ değerinin vincristine ve vinblastine kanser ilaçlarından daha az ancak, cisplatinden daha fazla olduğu ifade edilmiştir.

Amalraj and Gopi (2017)'ye göre *F. assafoetida*'nın sinir sistemi üzerine özellikle nöroprotektif ve sinir uyarıcı etkileri bulunmaktadır. *F. assafoetida* toprak üstü kısımlarının %80'lik metanol ekstraktlarının sıçan nöron hücre kültüründe glutamat ile indüklenen hücre hasarı üzerine etkisi Tayeboon *et al.* (2013) tarafından incelenmiştir. Nöron hücreleri, 30mM glutamat uygulaması sırasında, önce ve sonrasında sırasıyla 100 µg/ml konsantrasyonda *F.assafoetida* ekstraktı ile muamele edilmiştir. *F.assafoetida* ekstraktlarının glutamat indüklü nörotoksisite üzerine nöroprotektif etkisi, glutamat tarafından indüklenmiş hücre sayısında azalma ve glutamata bağlı apoptik/nekrotik hücre ölümünde önemli düzeyde azalma (p<0,001) ile teyit edilmiştir. Araştırmacılar, ekstraktların G0G1 fazında hücre döngüsünü durdurması nedeniyle nöron hücrelerinde antiapoptik aktivite gösterdiklerini ifade etmiştir. Bu durum, *F. assafoetida* ekstraktlarının nörolojik bozuklukların tedavisinde faydalı olabileceği anlamına gelmektedir. Ghoran *et al.* (2016), *F. assafoetida*'dan izole ettiği bir seskiterpen kumarin olan Samarcandin'in insan gastrik kanser (AGS) ve fare cilt fibrosarkoma (WEHI-164) hücre hatları üzerine sitotoksik aktivitesini belirlemiştir. Moghadam *et al.* (2013), *F.assafoetida* oleo gum reçinesinesinin su ekstraktının çeşitli konsantrasyonlarında siyatik sinirlerin tepkisini belirlemek amacıyla in vitro bir çalışma gerçekleştirmiştir. 0,01 ve 1 µg/ml'lik ekstrakt konsantrasyonlarının nöron hücrelerinin canlılık oranlarını artırdığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, düşük dozdaki ekstraktın bile nöroprotektif aktivite gösterdiğini ve hücre canlılık oranlarını artırdığını ancak, 10 µg/ml'lik yüksek konsantrasyonun toksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Rassouli *et al.* (2009), *F. tunetana* kökünden elde edilen seskiterpen kumarinlerin (coladonin ve isosarmarcandin) HTC116 ve HT-29 hücre hatlarına karşı zayıf sitotoksik aktivite gösterdiklerini belirlemiştir. Ghorbani *et al.* (2016) *F. gummosa* kökünün %70'lik etanol ekstraktını insan stroma vasküler hücre hattı (GP-293) ve insan böbrek epitel hücreleri üzerine uygulamış ve 400 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda hücre

canlılığını düşürdüğünü ifade etmiştir. Dastan *et al.* (2014)'ın *F. pseudalliacea* kökünden elde edilen seskiterpen kumarinlerin insan kanser hücre hattı Hela üzerine sitotoksik aktivitesini incelediği çalışmada, bitkiden izole edilen diseskiterpen ve seskiterpen kumarinlerin kanserden koruyucu ajan olarak kullanılabileceklerini tespit etmiştir.

Nguir *et al.* (2016)'un, *F. communis* L. taze yaprak, çiçek, kök ve sap esansiyel yağlarının Hela hücre hattı ve insan akciğer epitelyal kanser hücre hattına karşı nöron koruyucu aktivitelerini incelediği araştırmalarında; sitotoksik aktivitenin konsantrasyon arttıkça her iki hücre hattında da arttığı ve en yüksek sitotoksik aktivitenin yaprak esansiyel yağının 500 µg/ml konsantrasyonunda inhibisyon değeri olarak %79,05 olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca, uygulanan tüm esansiyel yağların Hela hücrelerine karşı göstermiş olduğu yüksek sitotoksik aktivite, hücre türüne karşı bir seçicilik olduğunu düşündürmektedir. Hela hücrelerinde en yüksek %inhibisyon değerleri sap esansiyel yağında %79,05 ve %77,52 oranlarında sırasıyla 500 µg/ml ve 250 µg/ml konsantrasyonlarda belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada *F.orientalis* esansiyel yağının majör uçucu bileşeni α -pinen olarak belirlenmiştir. Doğada yaygın olarak bulunan bu terpenoidin; antioksidan, antimikrobial, antifungal, anti kanser ve anti inflamasyon etkileri farklı çalışmalarca ispatlanmıştır (Chen *et al.* 2015; Li *et al.* 2016; Bouzenna *et al.* 2017).

Nöron hücreleri, reaktif oksijen türleri ve serbest radikallere karşı çok hassastır. Dolayısıyla, serbest radikallerin oluşumunu engellemek nöronal aktivitenin ve nöron fonksiyonlarının normal düzeyde devam etmesi anlamına gelmektedir (Porres-Martínez *et al.* 2016). α -pinen, sahip olduğu antioksidan aktivite sayesinde oksidatif strese bağlı hücre ölümünü engellemektedir. Li *et al.* (2016) α -pinenin COX2 yolağına bağlı inflamatuvar madde oluşumunu engellediğini ve buna bağlı canlılığın artışı tespit ettiklerini rapor etmişlerdir. Porres-Martínez *et al.* (2016), α -pinenin H₂O₂ oluşumunu inhibe ettiğini ispatlamışlardır. Turkez *et al.* (2016) α -pinenin kromozom hasarı ve sitotoksiteyi önlediğini rapor etmektedir. Literatür ile uyumlu olarak bu çalışmada elde edilen bulgular da, α -pinen yüksek konsantrasyonda olduğunda canlılık oranının artış

gösterdiği yönündedir. Ayrıca, yüksek konsantrasyon olan gruplarda hücre ortamında Ca^{+2} eflaksı görülmemektedir (Ca eflaksı: Ca iyonunun hücre ölümüne bağlı olarak dışarı sızmasıdır). Apoptoz sonuçlarına bakıldığında da, yüksek konsantrasyon bulguları apoptoz oranının düşük olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, *F.orientalis* esansiyel yağının göstermiş olduğu nöroprotektif etki tek bir bilşene bağlanamasa da, α -pinenin glutamat ile indüklenen sitotoksitenin önlenmesindeki payının büyük olduğu düşünülmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmanın başlangıcında amaç, Doğu Anadolu Bölgesinde halkın faydalı olduğuna inanarak kış aylarında salamura şeklinde sıklıkla tükettikleri *Ferula orientalis* L. (çaşır)'in klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen liyofilize su ekstraktları ve esansiyel yağının antioksidan, antimikrobiyal ve in vitro nöroprotektif aktivite analizleri ile LC-MS/MS ile fenolik bileşen kompozisyonu ve ICP-MS ile mineral madde kompozisyonunun belirlenmesi idi. Fakat yapılan analizler sonucunda genel olarak su ekstraktlarının analiz sonuçlarının oldukça düşük, esansiyel yağa ait sonuçların ise yüksek olması; bize klasik ve ultrasonik etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktlarının eldesi fikrini vermiş ve analizler tüm ekstraktlar ve esansiyel yağda tekrarlanmıştır. Ayrıca, esansiyel yağın GC-MS ile uçucu bileşen kompozisyonu ile tüm ekstraktlar ve esansiyel yağın renk parametreleri de hesaplanmıştır. Bu bölümde tüm ekstraktlar ve esansiyel yağa uygulanan tüm analizlerden elde edilen sonuçlar özetlenmiştir:

1. Uygulanan ekstraksiyon yöntemi açısından örnekler değerlendirildiğinde, çözücü türlerinin ve uygulanan ekstraksiyon yönteminin % ekstraksiyon verimi üzerine etkilerinin yüksek olduğu belirgin şekilde görülmektedir. Ekstraktların ekstraksiyon verimleri %3,30 ile %26,00 aralığında değişmektedir. En yüksek verim, ultrasonik (1:1) metanol: su ekstraktına ait iken; en düşük verim ise klasik n-hekzan ekstraktına aittir. Hidrodistilasyon yöntemi ile Clevenger düzeneği kullanılarak elde edilmiş çaşır esansiyel yağının ekstraksiyon verimi %0,4 değeri ile ekstraktlara kıyasla oldukça düşük düzeyde tespit edilmiştir.

2. Liyofilize klasik ve ultrasonik ekstraktların renk parametreleri üzerine çözücü türünün etkisi istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olarak tespit edilmiştir. Diğer ekstraktlara nazaran kloroform ekstraktlarının daha koyu renkli olmasının kloroformun çözdüğü bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Örneklerin a^* değerleri -4,867 ile -0,533 aralığında değişim göstermektedir. En koyu sarı, yani b^* değerinin en yüksek olduğu örnek, ultrasonik n-hekzan ekstraktı iken; rengi maviye en yakın örnek klasik

kloroform ekstraktıdır. Toplam renk farkının bir ifadesi olan ΔE değerinin en düşük olduğu örnek esansiyel yağdır. C* değerleri üzerine işlem değişkeninin etkisi $p < 0,05$ seviyesinde tespit edilmiştir. C* değeri en yüksek olan (44,184) ultrasonik n-hekzan ekstraktının diğer örneklerden daha yoğun bir renge sahip olduğu belirlenmiştir. Salamura çadır, liyofilize toz çadır, esansiyel yağ ve ekstraktlarda renk genel olarak açık sarı civarında değerlendirilebilmekle birlikte; H° değerlerinin yükseldiği kloroform ekstraktlarında ise renk yeşile kaymaktadır.

3. Esansiyel yağ ve ekstraktların tamamında Cr, Co, Fe, Si, Ni ve Hg elementlerinin miktarları ölçüm limitlerinin altında kaldığından dolayı saptanamamıştır. Çözücü türü değişkeninin Na değerleri üzerine etkisi $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olarak bulunmuştur. Ekstraktlar arasında en yüksek Na değeri çadırın ultrasonik su ekstraktında (USE) görülmekte iken; en düşük değer esansiyel yağa aittir. Mg minerali üzerine çözücü türü ve işlem değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksyonunun etkisi istatistiksel olarak $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olarak belirlenmiştir. Esansiyel yağ ve ekstraktlara ait Ca minerali ortalamaları değerlendirildiğinde değerlerin 233,428 ppm ile 751,755 ppm aralığında değiştiği belirlenmiş ve esansiyel yağda kalsiyum tespit edilememiştir. İnsan vücudunun ikinci majör elementi fosfor açısından *Ferula orientalis*'e ait ekstraktlar değerlendirildiğinde, en düşük fosfor değeri klasik etanol: su ekstraktına ait olup; en yüksek değer ultrasonik kloroform ekstraktında belirlenmiştir. Esansiyel yağın ise fosfor içermediği tespit edilmiştir. Esansiyel yağın ise hiç fosfor içermediği tespit edilmiştir. Ulusal Tıp Enstitüsü günlük 4,7 g potasyum alımının yeterli olacağını bildirmiştir. Su ekstraktının günlük yaklaşık 115 g tüketiminin günlük potasyum ihtiyacını karşılayabileceği düşünülmektedir. Kadmiyum, nikel, kurşun ve alüminyum açısından ekstraktlar ve esansiyel yağ değerlendirildiğinde ise, çadırın Cd, Ni, Pb ve Al içeriğinin günlük alım sınırının çok altında olduğu görülmektedir.

4. GC-MS ile *Ferula orientalis* esansiyel yağının %96,29'unu oluşturan 35 bileşen tespit edilmiştir. Konsantrasyonu en düşük bileşen β -Selinen iken, esansiyel yağın majör bileşeni α -pinendir. α -pineni takiben ilk on bileşen; osimen > terpinolen > D-limonen >

β -karyofilen > bornil asetat > α -kubeben > α -fellandren > β - mirisin > karen şeklinde sıralanmaktadır.

5. Su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında majör bileşen olarak belirlenen klorojenik asit, 13,042- 32,843 mg/g ekstrakt aralığında tayin edilmiştir. Klorojenik asite ait varyans analizi sonuçları değerlendirildiğinde, işlem ve çözücü değişkeni ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun klorojenik asit üzerine etkisi $p < 0,01$ düzeyinde çok önemli olarak belirlenmiştir. Ayrıca, tüm ekstraktlarda ultrason uygulamasının klorojenik asit düzeyini belirgin şekilde artırdığı da dikkat çekmektedir. *Ferula orientalis*'in su, etanol: su ve metanol: su ekstraktlarında bulunan en baskın flavonoid diosmin miktarlarının 2,580-23,652 mg/g aralığında değişim gösterdiği görülmektedir. En yüksek diosmin içeriğine sahip ekstrakt 23,652 mg/g ile ultrasonik metanol: su ekstraktı iken, 2, 580 mg/g değeri ile en düşük diosmin içeriği klasik su ekstraktına aittir.

6. Ekstraktlar ve esansiyel yağın *Streptococcus mutans*'a karşı sergiledikleri antimikrobiyal aktivitenin, diğer test edilen mikroorganizmalardan çok farklı olduğu dikkat çekmektedir. Su ve etanolün çözücü olarak kullanıldığı ekstraktlar kullanılan diğer 7 mikroorganizmadan hiç birine karşı etkili olmazken, *S.mutans*'ı önemli düzeyde etkilemişlerdir. Diğer taraftan, dikkati çeken en önemli nokta esansiyel yağın *A.niger*'e karşı Amphetericin B ile aynı düzeyde antimikrobiyal aktivite göstermesidir (inhibisyon zonu:21,3 mm, MİK: 62,5 µg/ml).

7. Ultrasonik yöntemle elde edilen ekstrakt verileri klasik yöntemle elde edilen ekstraktlara ait verilerle kıyaslandığında; MTT testi ile tespit edilen canlılık oranlarının ultrasonik yöntemle elde edilen ekstraktlarda yaklaşık %20 daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca, yağda çözünen maddelerin nöroprotektif aktivite üzerine etkin olduğu n-hekzan ve kloroform ekstraktlarının gösterdiği yüksek canlılık oranları ile net bir şekilde belirlenmiştir. Esansiyel yağın 10^{-2} ve 10^{-3} konsantrasyonlarda nöronların antioksidan kapasitesini artırarak glutamat artışına bağlı serbest radikallerin oluşumunu ve neticesinde geri dönüşümsüz hücresel hasarın önlenmesine katkıda bulunduğu

saptanmıştır. Apoptoz sonuçlarına bakıldığında da, esansiyel yağın yüksek konsantrasyon bulguları apoptoz oranının düşük olduğunu göstermektedir

8. Tespit edilen en düşük toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları klasik n-hekzan ekstraktına ait iken, en yüksek değerler ultrasonik metanol: su ekstraktına aittir. LC-MS/MS ile belirlenen fenolik bileşen profilinde kullanılan standart fenolik bileşenleri toplamda en yüksek konsantrasyonda içeren örneğin de ultrasonik metanol: su ekstraktı olması belirlemiş olduğumuz sonucu desteklemektedir. DPPH• radikali giderme aktivitesine göre belirlenen IC₅₀ değerleri üzerine işlem ve çözücü türü değişkenleri ile işlem x çözücü türü interaksiyonunun etkisi (p<0,01) istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Standart antioksidanlar, ekstraktlar ve esansiyel yağın DPPH• serbest radikal giderme aktivitesi analizi ile tespit edilmiş antioksidan aktiviteleri; Troloks>α-Tokoferol> BHA>BHT>EY>UMSE> UKE>UESE>USE>KMSE>KESE> KHE=UHE>KKE>KSE şeklindedir. Tespit edilen en yüksek ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi BHT antioksidanına ait iken, klasik su ekstraktının en düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Klasik ve ultrasonik yöntemlerle elde edilen su, etanol: su, metanol: su, kloroform ve n-hekzan ekstraktları ile esansiyel yağın kuprik iyonlarını indirgeme kapasitelerinin konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, salamura çası (*F. orientalis*)'in ekstraksiyonunda kullanılan ultrasonik ekstraksiyon yönteminin hücre duvarını parçalayarak biyoaktif bileşenler ile diğer hücre içeriğinin çözücüye geçişini artırdığından dolayı klasik yöntemle göre, hemen hemen tüm analizlerde aktiviteyi artırdığı tespit edilmiştir. Ancak, tüm ekstraktlar esansiyel yağ ile kıyaslandığında, özellikle uygulanan antioksidan aktivite yöntemleri olan ABTS^{•+} ve DPPH• radikallerini giderme analizleri ile kuprik iyonu indirgeme kapasitesi, antimikrobiyal aktivite ve in vitro nöroprotektif aktivite analizlerinde esansiyel yağın çok daha etkili olduğu dikkat çekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A., Dobson, A.D.W., 2011. Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti*. In: Fuquay, J.W. (ed.), Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press, San Diego. 772-775.
- Abdelaaty, A.S., Abeer, I., Mansour, S. E., 2014. Polyphenolic content and antioxidant activity of some wild Saudi Arabian *Asteraceae* plants. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7(7),545–551.
- Abdel-Wahab, M.H., El-Mahdy, M.A., Abd-Ellah, M.F., Helal, G.K., Khalifa F., Hamada, F.M.A., 2003. Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. Pharmacological Research, 48,461-465.
- Abdulmanea, K., Prokudina, E. A, Lanková P, Vaní Cková, Y., Koblavská, R., Zelený, V., Lapčík, O., 2012. Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the *Apiaceae* family. Biochemical Systematics and Ecology, 45,237–243.
- Abedi, D., Jalali, M., Asghari, G., Sadeghi, N., 2008. Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of *Ferula Gumosa* Bioss. Essential Oil Using Alamar Blue. Research in Pharmaceutical Sciences, 3,41–45.
- Abughadyra, I.R.A., 2017. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerden Elde Edilen Esansiyel Yağların İnsan Patojenleri Üzerine Antimikrobiyal Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı. Kastamonu.
- Abushouk, A.I., Negida,A., Ahmed,H., Abdel-Daim, MM., 2017. Neuroprotective mechanisms of plant extracts against MPTP induced neurotoxicity: future applications in Parkinson's disease. Biomedicine & Pharmacotherapy, 85,635-645.
- Achouri, A., Derbre, S., Medjroubi, K., 2017. Two new triterpenoid saponins from the leaves of *Bupleurum lancifolium* (*Apiaceae*). Natural Product Research, 31(19), 2286-2293.
- Adetunji, L. R., Adekunle, A., Orsat, V., Raghavan, V., 2017. Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review. Food Hydrocolloids, 62,239-250.
- Agarwal, S., Rao, A.V., 2000. Carotenoids and chronic diseases. Drug Metabolism and Drug Interactions, 17, 189–210.
- Agarwal, S., Mccoy, D., Graves, W., Gerard, P.D., Clark, S., 2011. Sodium content in retail cheddar, mozzarella, and process cheese varies considerably in the United States. Journal of Dairy Science, 94,1605–1615.
- Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Ateeque Ahma, Santha Kumar, T. R., Gupta, V. K., Sushil Kumar., 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. Flavour and Fragrance Journal, 17,59-63.
- Agnieszka A., Iwona R., Marek W., 2010. Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. Food Chemistry, 120, 52–58.
- Ahuja, J.K.C., Pehrsson, P.R., Haytowitz, D.B., Wasswa-Kintu, S., Nickle, M., Showell, B., 2015. Sodium monitoring in commercially processed and restaurant foods. The American Journal of Clinical Nutrition, 101, 622–631.

- Aizawa, K., Inakuma, T., 2007. Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan. *Food Science and Technology Research*, 13, 247–252.
- Ak, T., 2006. Curcumin'in Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interaction*, 174, 27-37.
- Akbarian, A., Rahimmalek, M., Sabzalian, M. R., 2017. variation in fruit morphological traits and bioactive compounds in different populations of *Ferulaassa-foetida*, *F-gummosa*, and *F-ovina* collected from Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19(2), 425-438.
- Akhtar M.S, Hossain M.A, Said S.A., 2017. Isolation and characterization of antimicrobial compound from the stem-bark of the traditionally used medicinal plant *Adenium obesum*. *Journal of Traditional Complement Medicine*, 17(3),296-300.
- Akkol, E.K., Goger, F., Kosar, F., Baser, K.H.C., 2008. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Food Chemistry*, 108(3),942-949.
- Akşit, H., 2008. Boğa Dikeni (*Eryngium campestre*) Bitki Ekstrelerinin Biyolojik Aktivitesinin Araştırılması ve Bitkinin Kimyasal Bileşenlerinin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. Tokat.
- Alavi, B., Yassab, N., Hajiaghaeec, R., Yekta, M.M. , Ashtiania, N.R. , Ajanic, Y., Hadjiakhondi, A., 2009. Phenolic compounds from *Peucedanum ruthenicum* M. Iranian *Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (1), 71-75.
- Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A., 2010. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4),401-409.
- Alexei, V., Butt, A., 2007. *Glial Neurobiology*. England, Jhon Willy and Sons Ltd., 215p.
- Al-Gubory, K. H, Fowler P.A, Garrel, C., 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(10),1634-1650.
- Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, 41(1), 1–15.
- Alipour, Z., Taheri, P., Samadi, N., 2015. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils from flower, leaf and stem of *Ferula cupularis* growing wild in Iran. *Pharmaceutical Biology*, 53(4), 483-487.
- Al-Ja'fari, A. H., Vila, R., Freixa, B., 2013. Antifungal compounds from the Rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytotherapy Research*, 27(6), 911-915.
- Allen, N.J., Barres, B.A., 2009. Neuroscience: glia - more than just Brain Glue. *Nature*, 457, 675-7.
- Al-Muniri, R.M.S., Hossain, M.A., 2017. Evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of different extracts of folk medicinal plant *Hapllrophyllum tuberculatum*. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4,101–106.
- Alejandro, G., Nuria, D., 2009. Oxidative stress in alzheimer disease. *Cell Adhesion and Migration*, 3(1), 88–93.
- Alexandre, E.M.C., Castro, L.M.G., Moreira, S. A., Pintado, M., Saraiva, J. A., 2017.

- Comparison of emerging technologies to extract high-added value compounds from fruit residues: pressure and electro-based technologies. *Food Engineering Reviews*, 9, 190–212.
- Allan, S.S.M., Mohamed, H. M. A., 2002. Thermal stability of some commercial natural and synthetic antioxidants and their mixtures. *Journal of Food Lipids*, 9, 277–293.
- Alonso-Carrilloa, N., Aguilar-Santamaría, M.A., Vernon-Carter, E.J., Jiménez-Alvaradod, R., Cruz-Sosaa, F., Román-Guerrero, A., 2017. Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops and Products*, 103, 213–221.
- Altundağ, Ş., 2007. *Labiatae* Familyasına Ait Bazı Endemik Türlerin Önemli Bitki Patojeni Bakteriler Üzerine Anti Mikrobiyal Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E., 2008. “Programlanmış hücre ölümü: apoptoz nedir?” *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6 (2), 93 -104.
- Alvarado, A., Arey, J., Atkinson, R., 1998. Kinetics of the gas-phase reactions of OH and NO₃ radicals and O₃ with the monoterpene reaction products pinonaldehyde, caronaldehyde, and sabinaketone. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 31, 281-297.
- Altay, 2015. Antioxidant And Cytotoxic Properties Of *Salvia fruticosa* M. And Its Effects On Gene Expressions Of Some Cyp450 And Antioxidant Enzymes In Ht-29 Cell Line. A Thesis Submitted To The Graduate School Of Natural And Applied Sciences of Middle East Technical University The Degree of Doctor of Philosophy In Biochemistry. Istanbul.
- Amalraj, A., Gopi, S., 2017. Biological activities and medicinal properties of *Asafoetida*: a review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 347-359.
- Ameisen, J. C., 1996. “The origin of programmed cell death”, *Science*, 272 (5266), 1278-1279.
- Amiri, H., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil and methanolic extracts of *Ferula microcolea* (Boiss.) Boiss (*Apiaceae*). *International Journal of Food Properties*, 17(4), 722-730.
- Amini, A.M., Muzs, K., Jeremy, P.E., Spencer, P.Y., 2017. Pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites have modest anti-inflammatory effects in human whole blood cultures. *Nutrition Research*, In Press.
- An, F., Cao, X., Qu, H., Wang, S., 2015. Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin. *Pharmazie*, 70 (11), 724-32.
- Anaya-Castro, M.A., Ayala-Zavala, J.F., Muñoz-Castellanos, L., 2017. β -cyclodextrin inclusion complexes containing clove (*Eugenia caryophyllata*) and Mexican oregano (*Lippia berlandieri*) essential oils: Preparation, physicochemical and antimicrobial characterization. *Food Packaging Shelf Life*, 14, 96–101.
- Andersen, L., Ramussen, L.B., Larsen, E.H., Jakobsen, J., 2009. Intake of household salt in a Danish population. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 598–604.
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P., 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15, 961-973.
- Ann, H.B., Nicole F.F., Tracey J.S., 2017. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols/tannins— a review of efficacy and

- mechanisms. *Lwt - Food Science and Technology*, In Press.
- Anonymous. 2007. Trace elements As, Cd, Hg, Pb and other elements. Determination by ICP-MS after pressure digestion. *Nordic Committee On Food Analysis No:186*, 14.
- Andreeva, O.A., Ivashev M.N., Ozimina, I.I., 1998. Diosmetin glycosides from *Caucasian Vetch*: Isolation and study of biological activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 32, 595–597.
- Aoki, T., Akashi, T., Ayabe, S. 2000. Flavonoids of Leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *Journal of Plant Research*, 113, 475–488.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: cuprac method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.
- Appendino, G., Tagliapietra, S., Nano, G. M., Jakupovic, J., 1993. Sesquiterpene coumarin ethers from *Asafetida*. *Phytochemistry*, 35, 183–186.
- Appendino, G., Mercalli, E., Fuzzati, N., Arnoldi, L., Stavri, M., Gibbons, S., Ballero, M., Maxia, A., 2004. Antimycobacterial coumarins from the Sardinian Giant Fennel (*Ferula communis*). *Journal of Natural Products*, 67(12), 2108–2110.
- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of Mulberry (*Morus indica* L.) Leaves. *Food Chemistry*, 102, 1233–1240.
- Araújo, J.R., Gonçalves, P., Martel, F., 2011. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 31, 77–87.
- Arghiani, N., Matin, M.M., Bahrami, A.R., 2014. Investigating anticancer properties of the sesquiterpene ferutinol on colon carcinoma cells, in vitro and in vivo. *Life Sciences*, 109(2), 87–94.
- Armstrong, G.A., Hearst, J.E., 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 10: 228–237.
- Artık, N., Anlı, E., Konar, N., Vural, N., 2016. Gıdalarda Bulunan Fenolik Bileşikler. *Sidas Medya*, 144s.
- Arts, I.C., Van De, P.B., Hollman, P.C., 2000. Catechin content of foods commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1752–1757.
- Asensi, M., Ortega, A., Mena, S., Feddi, F., Estrela, J.M., 2011. Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 48, 197–216.
- Ashidate, K., Kawamura, M., Mimura, D., Tohda, H., Miyazaki, S., Teramoto, T., Yamamoto, Y., Hirata, Y. 2005. Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. *European Journal of Pharmacology*, 513, 173–179.
- Ashokkumar, M., 2011. The characterization of acoustic cavitation bubbles – an overview, *Ultrasonic Sonochemistry*, 18, 864–872.
- Barros, A.I.R.N.A., Nunes, F.M., Gonç, Alves, B., Bennett, R.N., Silva, A.P., 2011. Effect of cooking on total vitamin c contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*, 128, 165–172.
- Astrog, P., 1997. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Science and Technology*, 8, 406–413.

- Atanassova, M., Bagdassarian, V., 2009. Rutin content in plant products. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 44, 201–203.
- Ayaz, M., Sadiq, A., Junaid, M., Ullah, F., Subhan, F., Ahmed, J., 2017. Neuroprotective and anti-aging potentials of essential oils from aromatic and medicinal plants. *Front Aging Neuroscience*, 9, 168.
- Azevedo, F.A, Carvalho, L.R., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E., Leite, R.E., Jacob Filho, W., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513, 532-41.
- Azizoğlu, A., 2004. Gerilimli Bisiklik Allenler: α -Pinen ve Benzobornadienin Bir Allen Birimine Katılması. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Ankara.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426–436.
- Baba, A.B., Nivetha, R., Chattopadhyay, I., Nagini, S., 2017. Blueberry and malvidin inhibit cell cycle progression and induce mitochondrial-mediated apoptosis by abrogating the JAK/STAT-3 signalling pathway. *Food And Chemical Toxicology*, 109(1), 534-543.
- Bajer, T., David A.Ī., Karel A., Petra V., 2017. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *epilobium parviflorum schreb.* *Industrial Crops And Products*, 100, 95-105.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chemistry and Toxicology*, 46, 446–475.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191-203.
- Balaydin, H.T, Gülçin, I., Menzek, A., Göksu, S., Sahin, E., 2010. Synthesis and antioxidant properties of diphenylmethane derivative bromophenols including a natural product. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25, 685–695.
- Balkancı, A., 2010. α -pinen'in Yüksek Sıcaklık Fotobrominasyonu ve Bazı α -pinenlerin Sentezi Yüksek Lisans Tezi. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. Sakarya.
- Bandyopadhyay, D., Basak, B., Chatterjee, A., Lai, T.K., Banerji, A., Banerji, J., Neuman, A., Prange, T., 2006. Saradaferin, a new sesquiterpenoid coumarin from *Ferula assafoetida*. *Natural Product Research*, 20, 961–965.
- Bañuelos, G.S., Arroyo, I., Pickering, I.J., Yang, S.I., Freeman, J.I., 2015. Selenium biofortification of broccoli and carrots grown in soil amended with Se-enriched Hyperaccumulator *Stanleya Pinnata*. *Food Chemistry*, 166, 603-608.
- Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'ana, A.S., Orlie, V., 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109.
- Barbero, G.F., Liqid, A., Palma, M., Barroso, C.G., 2008. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75, 1332–1337.

- Barnett, J., Payne, R., Yarrow, D., 1990. Yeast characteristics and identification. 2nd Edition, Cambridge University Press, p 1150.
- Basli, A., Soulet, S., Chafer, N., Mérillon, J.M., Chibane, M., Monti, J.P., Richard, T., 2012. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 8, 57-62.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H., 2001. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. Weinheim: Wiley-Vch.
- Bayar, N., Bouallegue, T., Achour, M., Kriaa, M., Bougatef, A., Kammoun, R., 2017. Ultrasonic extraction of pectin from opuntia ficus indica cladodes after mucilage removal: optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties. *Food Chemistry*, 235, 275–282.
- Bayraktaroğlu, G., Obuz, E., 2006. Ultrasound yönteminin ilkeleri ve gıda endüstrisinde kullanımı. Türkiye 9. Gıda Kongresi, Bolu.
- Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1), 209-228.
- Behl, C., Moosmann, B., 2002. Oxidative nevre cell death in alzheimers disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biological Chemistry*, 383 (3-4), 521- 536.
- Benedec, D., Hanganu, D., Filip, L., 2017. chemical, antioxidant and antibacterial studies of Romanian Heracleum Sphondylium, 65(2), 252-256.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., Mcallister, T.A., Benmeddour, Z., Mehinagic, E., Meurlay, D. L., Louaileche, H., 2013. Phenolic composition and antioxidant capacities of ten Algerian date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars: a comparative study. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 346–354.
- Bensalem, J., Dal-Pan, A., Gillard, E., Calon, F., Pallet, V., 2016. Protective effects of berry polyphenols against age-related cognitive impairment, *Nutrition and Aging*, 3, 89–106.
- Bermúdez-Aguirre, D., Mobbs, T., Barbosa-Cánovas, G., 2011. Ultrasound applications in food processing, In: H. Feng, G. Barbosa-Canovas, J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, Springer, New York, Usa, 65–105.
- Bhat, S. H., Azmi, A.S., Hadi S. M., 2007. Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 218(3), 249–255.
- Bhatia, P., Aureli, F., D’amato, M., Prakash, R., Cameotra, S.S., Nagaraja, T.P., Cubadda, F., 2013. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified pleurotus mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food Chemistry*, 140(1–2), 225-230.
- Bhogaonkar, P.Y., Vishal, R.M., Prachi, P.K., 2010. Documentation of wild edible plants of Melghat Forest, District. Amravati, Maharashtra State, India. *Ethnobot Leaflet*, 14, 751-8.
- Biesaga, M., 2011. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505-12.
- Bilgehan, H., 2000. Klinik Mikrobiyoloji (Özet Bakteriyoloji), Barış Yayınları, 25 s, İzmir.
- Bilia, A.R., Fumarola, M., Gallori, S., Mazzi, G., Vincieri, F.F., 2000. Identification By

- HPLC-DAD and HPLC-MS analyses and quantification of constituents of fennel teas and decoctions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 4734-4738.
- Blackburn, C. W., 2006. *Food spoilage microorganisms*, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
- Boari, F., Cefola, M., Di Gioia, F., Pace, B., Serio, F., Cantore, V., 2013. Effect of cooking methods on antioxidant activity and nitrate content of selected wild mediterranean plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(7), 870-876.
- Bodini, S.F., Manfredini, S., Epp, M., Valentini, S., Santori, F., 2009. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid lett. *Applied Microbiology*, 49, 551-555.
- Bolzon, L.B., Dos Santos, J. S., Silva, D. B., 2017. pigenin-7-o-glucoside oxidation catalyzed by p450-bioinspired systems. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 170, 117-124.
- Bonita, J.S., Mandarano, M., Shuta, D., Vinson, J., 2007. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmaceutical Research*, 55, 187-198.
- Bouratoua, A., Khalfallah, A., Bensouici, C, Kabouche, Z., Alabdul Magid, A., Harakat, D., Voutquenne-Nazabadioko, L., Kabouche, A., 2017. Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula Longipes* Coss. *Ex Bonnier and Maury. Natural Product Research*, 16, 1-8.
- Bouschet, T., Henley, J.M., 2005. Calcium as an extracellular signalling molecule: perspectives on the calcium sensing receptor in the brain. *Comptes Rendus Biologies*, 328 (8), 691-700.
- Bouzenna H., Hfaiedh, N., Giroux-Metges M., Elfeki A., Talarmin, H., 2017. Potential protective effects of alpha-pinene against cytotoxicity caused by aspirin in the iec-6 cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 961-968.
- Brahmachari, G., 2013. *Chemistry and pharmacology of naturally occurring bioactive compounds*. Crc Press.
- Brandão, G.H.A., Rigo, G., Roque, A.A., Souza, A.C.D., Scopel, M., Nascimento, C.A.O., Tasca, T., Pereira, C.G., Giordani, R.B., 2017. Extraction of bioactive alkaloids from melocactus zehntneri using supercritical fluid. *The Journal of Supercritical Fluids*, 129, 28-35.
- Britton, G., 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9, 1551-1558.
- Brown, J., O'prey, J., Harrison, P.R., 2003. Enhanced sensitivity of human oral tumours to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the akt and stress kinase pathways. *Carcinogenesis*, 24(2), 171-177.
- Budavari, S., 1996. *The Merck Index: An Encyclopedia Of Chemicals, Drugs And Biologicals*. 12th Edn. Merck and Co Inc., New Jersey, Pp 308.
- Buddrus, J., Bauer, H., Abu-Mustafa, E., Khattab, A., Mishaal, S., El-Khrisy, E., Linscheid, M., 1985. Foetidin, a sesquiterpenoid coumarin from *Ferula Assafoetida*. *Phytochemistry*, 24, 869-870.
- Burak, M., Imen, Y., 1999. Flavonoids and their antioxidant properties. *Turkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304.
- Burt, S., 2004. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223-253.

- Burt, S.A., 2007. Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. Netherlands: Utrecht University.
- Butterfield, D.A., 2003. Amyloid Beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 2651-2659.
- Buyukokuroglu, M.E., Gepdiremen, A., Hacimuftuoglu, A., Oktay, M., 2003. The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 91-94.
- Büyüktuncel, E., 2012. İleri ekstraksiyon teknikleri-I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2), 209-242.
- Cadenas, E., Packer, L., 2002. Handbook of antioxidants, Marcel Dekker, Inc., 2nd Edition, New York, 279-337.
- Cadogan, J. I. G., 1973. Principles of free radicals chemistry. The Chemical Society, London.
- Cai, H., Al-Fayez, M., Tunstall, R.G., 2005. The rice bran constituent triclinic potentially inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in apcmin mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4, 1287-1292.
- Caldeira, I., Pereira, R., Clímaco, M.C., Belchior, A., Bruno De Sousa, R., 2004. Improved method for extraction of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound. *Analytica Chimica Acta*, 513, 125-134.
- Calderon-Montaña, J.M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 298-344.
- Caleja, C., Barros, L., Prieto, M. A., Barreiro, M.F., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R., 2017. extraction of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* L. by heat-, microwave- and ultrasound-assisted extraction techniques: A comparative study through response surface analysis. *Separation and Purification Technology*, 186, 297-308.
- Cameo, 2018. <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/4588>. Erişim Tarihi: 23.08.2018
- Canales, R., Guiñez, M., Bazán, C., Reta, M., Cerutti, S., 2017. determining heterocyclic aromatic amines in aqueous samples: a novel dispersive liquid-liquid micro-extraction method based on solidification of floating organic drop and ultrasound assisted back extraction followed by UPLC-MS/MS. *Talanta*, 174, 548-555.
- Candwell, E., 2013. The compound in the mediterranean diet that makes cancer cell mortal. *Medical Express*.
- Cantor, M.D., Van Den Tempel, T., Hansen, T.K., Ardo, Y., 2004. Blue Cheese. In: Fox, P.F., Mcsweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Elsevier Academic Press, London, Pp. 175-198.
- Cappellari, L.R., Chiappero, J., Santoro, M.V., Giordano, W., Banchio E., 2017. Inducing phenolic production and volatile organic compounds emission by inoculating *Mentha Piperita* with plant growth-promoting rhizobacteria. *Scientia Horticulturae*, 220 (16), 193-198.
- Cassidy, A., 2017. Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular*

Aspects of Medicine.

- Castro, L., Freeman, B.A., 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 17, 163–165.
- Castro Grijalba, A., Martinis, E.M., Wuilloud, R.G., 2017. Inorganic selenium speciation analysis in allium and brassica vegetables by ionic liquid assisted liquid-liquid microextraction with multivariate optimization. *Food Chemistry*, 219, 102-108.
- Cemeroğlu B., Karadeniz F., Özkan M., 2001. Meyve Ve Sebze İşleme Teknolojisi, Ankara, Turkey: Gıda Teknolojisi Derneği. Pp 211-232.
- Cemeroğlu B., 2009. Fenolik Bileşikler. Meyve Sebze İşleme Teknolojisi 1, Ed: Cemeroğlu, B., Ankara. 76-80.
- Cengiz, E., 2011. Kayısı (*Prunus Armeniaca* L.) ve Kayısı Çekirdeğinde Kuersetinin HPLC-MS İle Tayini. Fırat Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Bilim Dalı. Elazığ.
- Centeno, V., De Barboza, G.D., Marchionatti, A., Rodriguez, V., De Talamoni, N.T., 2009. Molecular mechanisms triggered by low calcium diets. *Nutrition Research Reviews*, 22, 163–174.
- Cerezoa, A.B., Tesfayea, W., Soria-Díaz, M.E., 2010. Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. *Journal of Food Comp Analysis*, 23, 175–184.
- Cha, K.H., Lee, H.J., Koo, S.Y., Song, D.G., Lee, D.U., Pan, C.H., 2010. Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58,793–797.
- Chang, S., Tan, C., Frankel, E., 2000. Low-density lipoprotein antioxidant activity of phenolic compounds and polyphenol oxidase activity in selected clingstone peach cultivars. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 147–151.
- Chaudhary, D.P., Sharma, R., Bansal, D., 2009. Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: A review. *Biological Trace Element Research*, 18, 78-82.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British Medicinal Bulletin*, 49 (3), 481-93.
- Chemat, F., Zill-E-Huma, Khan, M. K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34,540–560.
- Chen, J.H., Ho, C.T., 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45, 2374-2378.
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z., 2007. Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonic Sonochemistry*, 14, 767–778.
- Chen, J., Chua, K.W., Chua, C.C., Yu, H., Pei, A., Chua, B.H., Hamdy, R.C., Xu, X., Liu, C.F., 2011. Antioxidant activity of 7, 8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neuroscience Letters*, 499, 181-185.

- Chen, W., Liu, Y., Li, M., Mao, J., Zhang, L., Huang, R., Jin, X., Ye, L., 2015. Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of Pharmacology Science*, 127(3), 332-8.
- Chen, S., Zeng, Z., Hu, N., Bai, B., Wang, H., Suo, Y., 2018. simultaneous optimization of the ultrasound-assisted extraction for phenolic compounds content and antioxidant activity *Oflycium ruthenicum* Murr. Fruit Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 242, 1-8.
- Cheng, J.C., Dai, F., Zhou, B., Yang, L., Liu, Z.L., 2007. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivates in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 104 (1), 132–139.
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., Sulaiman, R., 2014. Extraction and quantification of saponins: a review. *Food Reserarch International*, 59, 16–40.
- Cho, J. A., Chang, H. J., Lee, S. K., Kim, H. J., Hwang, J. K., Chun, H. S., 2007. Amelioration of dextran sulphate sodium-induced colitis in mice by oral administration of b-caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Science*, 80, 932–939.
- Chopra, M., Fitzsimons, P.E.E., Strain, J.J., Thurnham, D.I., Howard, A. N. 2000. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit ldl oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clinical Chemistry*, 46(8), 1162–1170.
- Chukwumah, Y.C., Walker, L.T., Verghese, M., Ogutu, S., 2009. Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). *Ultrasonic Sonochemistry*, 16, 293-299.
- Chung, I.M., Lim, J.J., Ahn, M.S., Jeong, H.N., An, T.J., Kim, S.H., 2015. Comparative phenolic compound profiles and antioxidative activity of the fruit leaves, and roots of korean ginseng (*Panax Ginseng Meyer*) according to cultivation years. *Journal of Ginseng Research*, 40, 68–75.
- Cihaner, S.S., 2009. İndol-Amino Asit Türevi Yeni İlaç Etken Maddelerinin Sentezleri ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. Ankara.
- Coran, S.A., Giannellini, V., Bambagiotti-Alberti, M., 1996. A novel monitoring approach for mammalian lignan precursors in flaxseed. *Pharmaceutical Science*, 2, 529-532.
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E.A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., Renouard, S., Blondeau, J.P., Ferroud, C., Doussot, J., Laine, E., Hano, C., 2015. Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum Usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonic Sonochemistry*, 26, 176- 185.
- Cornara, L., D'arrigo, C., Pioli, F., Borghesi, B., Bottino, C., Patrone, E., Mariotti, M.G., 2009. micromorphological investigation on the leaves of the rock samphire (*Crithmum maritimum* l.): occurrence of hesperidin and diosmin crystals. *Plant Biosystems*, 143(2), 283-292.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4), 564–582.
- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K., 1993. Genistein, daidzein, and their B-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 1961–1967.

- Cravottoa, G., Boffaa, L., Mantegnaa, S., Peregob, P., Avogadro, M., Cintasc, P., 2008. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (5), 898–902.
- Crosthwaite, D., 1998. Uk trade within the flavour and fragrance industry. International federation of essential oils and aroma trades. 21st International Conference On Essential Oils And Aroma's. London: IFEAT.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2006. Plant secondary metabolites, occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing. Chapter 1: Phenols, polyphenols and tannins: An overview. 3-15.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K., Ven Murthy, M.R., 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28, 771–799.
- Çakır, Y., Güngan, S., Attar, N., 2010. Çürük Mikrobiyolojisi / Microbiology of Dental Caries. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 34(3-4), 78-91.
- Çelen, S., 2011. Anadolu Çaprazına Özgü Dört *Thymus L. (Lamiaceae)* Türü Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimleri, Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivite Özellikleri. Doktora Tezi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Balıkesir.
- Çelik, S.E., Özyürek, M., Altun, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Berker, K.I., Özgökçe, F., Apak, R., 2008. Antioxidant capacities of herbal plants used in the manufacture of Van herby cheese: 'Otlı Peynır'. *International Journal of Food Properties*, 11, 747–761.
- Çelik, İ., 2014. *Lactobacillus Rhamnosus*'un *Porphyromonas Gingivalis* ile *Streptococcus Mutans*'ın Gingival Fibroblast Hücrelerine Adezyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Ankara.
- Çetin, B., Özer, H., Cakir, A., Polat, T., Dursun, A., Mete, E., Öztürk, E., Ekinci, M., 2010. Antimicrobial activities of essential oil and hexane extract of Florence fennel [*Foeniculum vulgare* var. *Azoricum* (Mill.) Thell.] against foodborne microorganisms. *Journal of Medicinal Food*, 13 (1), 196–204.
- Çetin, D., 2013. Paklitaksel ve Sisplatin Nörotoksitesinin Sıçan Nöron Kültüründe Antioksidan Parametrelerle İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. Erzurum.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- D'alessandro, L.G., Dimitrov, K., 2014. Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10), 1818-1826.
- Dastan, D., Salehi P., Ghanati, F., Gohari A.R., Maroofi, H., Alnajjar N., 2014. Phytotoxicity and cytotoxicity of disesquiterpene and sesquiterpenecoumarins from *Ferula pseudalliacea*. *Industrial Crops and Products*, 55, 43–48.
- Dastan, D., Salehi, P., Alahmadi, A., 2016. New coumarin derivatives from *Ferula pseudalliacea* with antibacterial activity. *Natural Product Research*, 30(24), 2747-2753.
- De Azeredo, G.A., Stamford, T. L.M., Nunes, P.C., Gomes Neto, N.J., De Oliveira, M.E.G., De Souza, E.L., 2011. Combined application of essential oils from

- Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44, 1541-1548.
- De Castro, M.D.L., Priego-Capote, F., 2010. Soxhlet extraction: past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383.
- De Souza, R.F.V., De Giovanni, W.F., 2004. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*, 9(2), 97–104.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzade, M. A., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M. 2009. Antioxidant activity of the Methanol extracto *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas Y Aceites*, 60(4), 405-412.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74,101-109.
- Delnavazi, M.R., Hadjiakhoondi, A., Delazar, A., 2015. Azerosides A And B: Two new phloroacetophenone glycosides from the roots of *Dorema glabrum* Fisch & Ca Mey. *Medicinal Chemistry Research*, 24(2), 787-796.
- Demir, E., Serdar, G., Sökmen, M., 2015. Comparison of some extraction methods for isolation of catechins and caffeine from Turkish green tea. *International Journal of Secondary Metabolite*, 2(2), 16-25.
- Díaz-De-Cerio, E., Tylewicz, U., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero, A., Romani, S., 2017. Design of sonotrode ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Psidium guajava* L. Leaves. *Food Analytical Methods*, 10, 2781–2791.
- Divya, K., Ramalakshmi, K., Murthy, P.S., 2014. Volatile oils from *Ferula assafoetida* varieties and their antimicrobial activity. *LWT-Food Science And Technology*, 59(2), 774-779.
- Dixon, R., Ferreira, D., 2002. Molecules of interest: genistein. *Phytochemistry*, 60, 205–211.
- Doğan, F., 2011. Deneysel Sıçan Varikosel Modelinde Varikoselin Oluşturduğu Testiküler Hasar Üzerine Diosminhesperidin Etkileri. *Tıpta Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı. Isparta.*
- Doğan, N., Yazıcı, Z., Şişman, T., 2011. Lepistes balığının karaciğeri üzerine fenpiroksimat akarisitinin biyokimyasal etkileri. *Baü Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1), 1-8.
- Dorea, J., Costa, D.H., 2005. Is coffee a functional food? *Journal of British Nutrition*, 93, 773-782.
- Downie, S.R., Watson, M.F., Spalik, K., Katz-Downie, D.S., 2000. Molecular systematics of old world Apioideae (Apiaceae): relationships among some members of *Tribe peucedaneae* Sensu Lato, the placement of several island-endemic species, and resolution within the Apioideae Superclade. *Canadian Journal of Botany*, 78, 506-52.
- Drude, O. 1898. In 'Die Natürlichen Pflanzenfamilien 3(8)', Ed. A. Engler, Wilhelm Engelmann, Leipzig, Pp. 228–232.
- Duthie, S.J., Ma, A., Ross, M. A., Collin, A. R., 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Research*, 56, 1291-1295.
- Dwyer, J.H., Allayee, H., Dwyer, K.M., Fan, J., Wu, H., Mar, R., 2004. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis.

- The New England Journal of Medicine, 350, 29–37.
- Ebadi, M., 2001. Antioxidants and free radicals in health and disease: an introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases. Arizona: Prominent Press.
- Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21, 308–323.
- Eftekhar, F., Yousefzadi, M., Azizian, D., Sonboli, A., Salehi, P., 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Diplotaenia Damavandica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 60(11-12),821-5.
- Eigner, D., Scholz, D., 1999. *Ferula assafoetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(1), 1–6.
- Eissa, H., Mehriz, A., Abbas, H. M., Bayoumi, H. M., 2010. Water activity, color characteristics and sensory properties of egyptian gouda cheese during ripening. *Food Technology*, 6(10), 447–453.
- Ekor, M., 2014. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacology*, 10,4:177.
- Elghwaji, W., El-Sayed, A.M., El-Deeb, K.S., Elsayed, A.M., 2017. Chemical composition, antimicrobial and antitumor potentiality of essential oil of *Ferula tingitana* L. *Apiaceae* Grow in Libya. *Pharmacognosy Magazine*, 13(3), 446–451.
- El-Sayed, H.S., Chizzola, R., Ramadan, A.A., Edris, A.E., 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry*, 221, 196-204.
- El-Razek, M.H.A., 2007. A new ester isolated from *Ferula assa-foetida* L. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71 (9), 2300–2303.
- Emir Çoban, Ö., Patir, B., 2010. Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(2), 7-19.
- Emir Çoban, O., Patir, B., Ozpolat, E., Kuzgun, N.K., 2016. Improving the quality of fresh rainbow trout by sage essential oil and packaging treatments. *Journal of Food Safety*, 36(3), 299-307.
- EPA, 2017. http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html. Erişim: Aralık 2017.
- Er, M., 2014. Ultrasonik Yöntemlerle Ekstrakte Edilen Yaban Mersininin Biyoaktif Özellikleri Ve Kefir Üretiminde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Samsun.
- Ercisli, S., Gozlekci, S., Sengul, M., Hegedus, A., Tepe, S., 2012. Some physicochemical characteristics, bioactive content and antioxidant capacity of loquat (*Eriobotrya Japonica* (Thunb.) Lindl.) fruits from Turkey. *Scientia Horticulturae*, 148(4), 185-189.
- Erdem, B., 1999. Pseudomonaslar. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, 551-559, Ankara.
- Esclapez, M.D., García-Pérez, J.V., Mulet, A., Cárcel, J.A., 2011. Ultrasound-assisted extraction of natural products, *Food Engineering Reviews*, 3, 108–120.
- European Commission, 2006. Commission regulation (Ce) No 1881/2006 Of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Available From: <Http://Eur-Lex.Europa.Eu/Lexuriserv/Lexuriserv.Do?Uri=Oj:L:2006:364:0005:0024:En:Pd>

- f, Access Date 11.09.14.
- European Food Safety Authority, 2006. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Available From: <[Http://Www.Efsa.Europa.Eu/It/Ndatopics/Docs/Ndatolerableuil.Pdf](http://www.efsa.europa.eu/it/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf)> Access Date 30.07.14.
- Exner, M., Hermann, M., Hofbauer, R., Kapiotis, S., Speiser, W., Held, I., Seelos, C., Gmeiner, B., 2000. The salicylate metabolite gentisic acid, but not the parent drug, inhibits glucose autoxidation-mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. *Febs Letters*, 470, 47–50.
- Fatehi, M., Farifteh, F., Fatehi-Hassanabad, Z., 2004. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula assafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 91 (2–3), 321–324.
- Fatima, S.S., Jamil, Z., Abidi, S.H., Nadeem, D., Bashir, Z., Ansar, A., 2017. Interleukin-18 polymorphism as an inflammatory index in metabolic syndrome: a preliminary study. *World Journal of Diabetes*, 8(6), 304–310.
- Faour Klingbeil, D., Kuri, V., Fadlallah, S.M., Matar, G.M., 2016. Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from raw vegetables in Lebanon. *The Journal of Infection In Developing Countries*, 10(4), 354–362.
- Fang, S.H., Hou, Y.C., Chang, W.C., Hsiu, S.L., Chao, P.D. And Chiang, B.L., 2003. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. *Life Sciences*, 74, 743–756.
- Fani, M.M., Bazargani, A., Farboodniay, J., Mohammad, A., Hasanpour, Z., Zamani K., Yousefi, M.E., 2015. An in vitro study on the antibacterial effect of *Ferula assa-foetida* L. and *quercus infectoria olivier* extracts on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Avicenna Journal of Dental Research*, 7(1), 1–5.
- Farnad, N., Heidari, R., Aslanipour, B., 2014. Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of peppermint (*Mentha piperita*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8, 113–121.
- Fayez, K.A., Bazaid, S.A., 2014. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13:45–55.
- Fazly-Bazzaz, B.S., Ali-Rezaei, D., Iranshahi, M., Naderinasab, M., Karamodin, M.K., 2009. Evaluating the potentiating effect of galbanic acid from *Ferula szowitsiana* on three common antibiotics against resistant hospital isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 217–221.
- Felgines, C., Texier, O., Morand, C., 2000. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 279, 1148–1154.
- Ferguson, L.R., Zhu, S.T., Harris, P.J., 2005. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, 585–693.
- Ferrari, B., Tomi, F., Casanova, J., 2005. Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 180–185.
- Flint, E.B., Suslick, K.S., 1991. The temperature of cavitation, *Science*, 253, 1397–1399.
- Food And Nutritional Board, 2005. Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate. Washington, Dc: The National Academies Press.

- Frankel, E.N., 1980. Lipids oxidation. *Progress in Lipid Research*, 13,1-22.
- Frei, B. 1994. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, 97(3A),5-13.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium subgenus Penicillium*. *Study in Mycology*, 49, 201-241.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (8), 3597–3604.
- Funes-Collado, V., Rubio,R., López-Sánchez, J.F., 2015. Does boiling affect the bioaccessibility of selenium from cabbage?. *Food Chemistry*, 181,304-309.
- Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M.L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, S.A., Lugli, E., Madeo, F., Malomi, W., Marine, J.C., Martin, S.J., Medema, J.P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U.M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D.W., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H.U., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Vousden, K.H., Youle, R.J., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Kroemer, G., 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16, 1093-1107.
- Gálvez, M.C., Barroso, C.G., Pérez-Bustamante, J.A., 1994. Analysis of polyphenolic compounds of different vinegar samples. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 199, 29–31.
- Garazd, M., Garazd, Y., Khilya, V., 2003. Neoflavones. 1. Natural Distribution And Spectral And Biological Properties. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 54–121.
- Garcia-Castello, E.M., Rodriguez-Lopez, A.D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., Cassano, A., 2015. Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT-Food Science and Technology*, 64, 1114–1122.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Herberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., Siess, M.H., 2002. Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bulletin du Cancer*, 89, 293–312.
- Germ, M., Stibilj, V., Kreft, S., Gaberščik, A., Pajk, A., Kreft, I., 2009. Selenium concentration in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) herb after foliar spraying of young plants under different Uv-B radiation levels. *Food Chemistry*, 117(2), 204-206
- Ghannadi, A., Amree, S., 2002. Volatile oil constituents of *Ferula gummosa* Boiss. from Kashan. *Iranian Journal of Essential Oil Research*, 14, 420–421.

- Ghasemi, Y., Faridi, P., Mehregan, I., Mohagheghzadeh, A., 2005. *Ferula gummosa* fruits: an aromatic antimicrobial agent. *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 311–314.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare, M.L., Mazzanti, G., Bartolini, A., 2001. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Farmaco*, 56, 387–389.
- Gholamreza, B., Reza, S., Seyed-Ebrahim, S., Mohammad-Reza, K., Reza, N., Nastaran, G., Yalda, S., 2012. Essential oil composition of *Ferula assa-foetida* L. fruit from western Iran. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 7-18.
- Ghoran, S.H., Atabaki, V., Babaei, E., Olfatkah, S.R., Dusek, M., Eigner, V., Soltani, A., Khalaji, A.D., 2016. Isolation, spectroscopic characterization, x-ray, theoretical studies as well as in vitro cytotoxicity of samarcandin. *Bioorganic Chemistry*, 66, 27–32.
- Ghorbani, A., Mohebbati, R., Jafarian, A.H., Vahedi, M.M., Hosseini, S.M., Soukhtanloo, M., Sadeghnia, H.R., Azar, H., 2016. Toxicity evaluation of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* root. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 77, 35-41.
- Gilbert, D.F., Boutros, M., 2016. A protocol for a highthroughput multiplex cell viability assay. *Methods of Molecular Biology*, 1470, 75-84.
- Giridhar, P., Reddy, S.M., 2001. Phenolic antioxidants for the control of some mycotoxigenic fungi. *Journal of Food Science and Technology*, 38, 397–399.
- Giusti, M., Wrolstad, R., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217–225.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D. A., 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1(22), 1–6.
- Golfakhrabadi, F., Khanavi, M., Ostad, S.N., Saeidnia, S., Vatandoost, H., Abai, M.R., Hafizi, M., Yousefbeyk, F., Rad, Y.R., Baghenegadian, A., Ardekani, M.R., 2014. Biological activities and composition of *Ferulago carduchorum* essential oil. *Journal of Arthropod Borne Disease*, 9(1), 104-15.
- Golstein, P., Kroemer, G., 2007. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Science*, 32, 37-43.
- Gomberg, M. 1900. An incidence of trivalent carbon trimethylphenyl, *Journal of American Chemical Society*, 22, 757-771.
- González-Burgos, E., Carretero, M., And Gómez-Serranillos, M., 2011. *Sideritis* Spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities-a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 135, 209–225.
- González-Vallinas, M., González-Castejón, M., Rodríguez-Casado, A., Ramírez De Molina, A., 2013. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy, a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews*, 71, 585–599.
- González-Centeno, M.R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., 2014. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrasonic Sonochemistry*, 21, 2176–2184.
- Goss, C.H., Muhlebach, M.S., 2011. *Staphylococcus aureus* and mrsa in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 10(5), 298-306.
- Granado-Serrano, A.B., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2010. Quercetin

- modulates NF-kappa B and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells. *Nutrition and Cancer*, 62(3), 390–401.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Spitzenberger, R., Elstner, E.F., 2005. The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. In concert with alpha-tocopherol and beta-carotene effectively prevents oxidation of ldl. *Phytomedicine*, 12(6-7), 416-23.
- Grayer, R.J., Veitch, N.C., 2006. Flavanones And Dihydroflavonols. In *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*, Pp. 918–1002 [Om Anderson And Kr Markham, Eds]. Boca Raton, Fl: Crc Press/Taylor & Francis Group.
- Gudrais E. 2012. Curbing Clots. *Harvard Magazine*. [Http://Harvardmagazine.Com](http://Harvardmagazine.Com) (Accessed June 2016).
- Guenther, E., 1948. *The essential oils*. New York: Van Nostrand Co.
- Gullon, B., Lu-Chau, T.A., Moreira, M.T., 2017. Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends In Food Science and Technology*, 67, 220-235.
- Guo, X., Shang, X., Zhou X., Zhao, B., Zhang, J., 2017. ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Rhododendron aganniphum*: Antioxidant activity and rheological properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 246-255.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345-391.
- Günaldı, M., 2009. Kan Selenyum Düzeyi ve Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Akut Miyokart Enfarktüsü Gelişimi Üzerine Etkisi. *Uzmanlık Tezi*. İstanbul Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim Ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği. İstanbul.
- Habibi, Z., Eshaghi, R., Mohammadi, M., Yousefi, M., 2010. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Heracleum rechingeri* Manden from Iran, 24(11), 1013-7.
- Hadidi, K.A., Aburjai, T., Battah, A.K., 2003. A comparative study of *Ferula hermonis* root extracts and sildenafil on copulatory behaviour of male rats. *Fitoterapia*, 74(3), 242-246.
- Halifeoğlu, İ., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H., Telo, S., 2005. Tip II diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidant ve antioksidant. *I. Fırat Tıp Dergisi*, 10 (3), 117-122.
- Halliwell, B., 1995. Antioxidant characterization. methodology and mechanism. *biochemical pharmacology*, 49, 1341-1348.
- Hakkinen, H., Törrönen, S.A.R., 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and vaccinium species: Influence of cultivar, cultivation site and technique, *Food Research International*, 3(6), 517-524.
- Hammi, K.M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., Ksouri, R., 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* Fruits using response surface methodology. *Food Chemistry*, 184, 80-89.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S. And Fukui, S., 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D., 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. united nations industrial development organization and the international centre for science and high technology. Icsunido Is

- Supported by the Italian Ministry of Foreign Affairs, 35-51.
- Hannover, J.W., 1992. Applications of terpene analysis in forest genetics. *New Forest*, 6, 159–178.
- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., 1988. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *Journal of Natural Products*, 51, 345–348.
- He, F.J., Macgregor, G.A., 2009. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *Journal of Human Hypertension*, 23, 363–384.
- Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., Oostveen, R.M., Stalpers, E.M., Bast, A., 2002. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radical Research*, 36(5), 575–581.
- Heinrich, M., Leonti, M., Nebel, S., 2005. Understanding local mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, 52(4), 353-366.
- Henderson, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R., 2000. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*, 30(3), 235–251.
- Hendric, A.B., 2006. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27, 27–40.
- Herrera, M.C., Luque De Castro, M.D., 2004. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (7–8), 1106–1112.
- Herrup, K., Yang, Y., 2007. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 368-78.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C., Van De, P.B., 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41, 1242–1246.
- Hirota, R., Roger, N.N., Nakamura, H., Song, H.S., Sawamura, M., Suganuma, N., 2010. Anti-inflammatory effects of limonene from yuzu (*Citrus junos tanaka*) essential oil on eosinophils. *Journal of Food Science*, 75(3), 87-92.
- Hitzenberger, G., 1997. Therapeutic effectiveness of flavonoids illustrated by daflon 500 mg. *Wien Med Wochenschr*, 147, 409–412.
- HMDB, 2017. [Http://Www.Hmdb.Ca/Metabolites/Hmdb0036994](http://Www.Hmdb.Ca/Metabolites/Hmdb0036994). Erişim: Aralık 2017.
- Hollman, P., Katan, M., 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 51(8), 305–310.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*, 9th Ed. Lippincott Williams And Wilkins, Baltimore.
- Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'donnell, C.P., Martindiana, A.B., Barry-Ryan, C., 2012. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from Marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonic Sonochemistry*, 19 (3), 582–590.
- Hosseini, A., Bakhtiari, E., Rad, A., 2017. The evaluation and comparing of cytotoxic effects of *Ferula gummosa* Gum, *Scutellaria lindbergii*, *Kelussia odoratissima* and *Artemisia kopetdaghensis* extracts on achn cell line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16 (3), 1104-1112.

- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewiski, A., Zhang, L.L., Scherer, B. And Sinclair, D.A., 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 191-196.
- Huang, Q., Chen, L., Teng, H., Song, H., Wu, X., Xu, M., 2015. Phenolic compounds ameliorate the glucose uptake in HEPG2 Cells' insulin resistance via activating ampk. *Journal of Functional Foods*, 19, 487-494.
- Hussain, H.H., Babic, G., Durst, T., Wright, J. S., Fluerau, M., Chichirau, A., Chepelev, L.L., 2003. Development of novel antioxidants: design, synthesis, and reactivity. *Journal of Organic Chemistry*, 68, 7023-7032.
- Hvattum, E., 2002. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 16, 655-662.
- Ibraheim, Z.Z., Abdel-Mageed, W.M., Dai, H., Guo, H., Zhang, L., Jaspars, M., 2012. Antimicrobial, antioxidant daucane sesquiterpenes from *F. hermonis* Boiss. *Phytotherapy Research*, 26, 579-586.
- Iglesias, M.T., Lozano, J.E. 2004., Extraction and characterization of sunflower pectin. *Journal of Food Engineering*, 62(3), 215-223.
- İlbağ, Z., 2016. Turunçgil Meyve ve Yapraklarının Farklı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Ekstraksiyonu ve Matematik Modellemesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. İstanbul.
- İranshahi, M., Shahverdi, A.R., Mirjani, R., Amin, G.R., Shafiee, A., 2004b. Umbelliprenin from *Ferula persica* roots inhibits the red pigment production in *Serratia marcescens*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59, 506-508.
- İranshahi, M., Kalategi, F., Rezaee, R., Shahverdi, A.R., Ito, C., Furukawa, H., 2008. Cancer chemopreventive activity of terpenoid coumarins from *Ferula* species. *Planta Medicinal*, 74, 147-50.
- İranshahi, M., Sahebkar, A., Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., 2009. Cancer chemopreventive activity of the prenylated coumarin, *Umbelliprenin*, in vivo. *European Journal of Cancer Prevention*, 18, 412-415.
- İranshahi, M., Kalategi, F., Sahebkar, A., Sardashti, A., Schneider, B., 2010a. New sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula flabelliloba*. *Pharmaceutical Biology*, 48, 217-220.
- İranshahi, M., Masullo, M., Asili, A., 2010b. Sesquiterpene coumarins from *Ferula gummosa*. *Journal of Natural Products*, 73(11), 1958-1962.
- İranshahi, M., Sahebkar, A., Hosseini, S.T., Takasaki, M., Konoshima, T., 2010c. Cancer chemopreventive activity of diversin from *Ferula diversivittata* in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, 17, 269-73.
- İranshahi, M., İranshahi, M., 2011. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Asafoetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin)— a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 1-10.
- İslam, R., Khanma., I.S., 2017. Plant derivatives as promising materials for processing and packaging of meat-based products – focus on antioxidant and antimicrobial effects. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1745-4549.
- İstanbuluoğlu, H. 2011. Piyasada Satılan Süt ve Süt Ürünlerinde Ağır Metal Kirliliği. Tıpta Uzmanlık Tezi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi. Ankara.

- Iwashina, T. 2013. Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order caryophyllales (review). *Bulletin of the National Museum of Nature and Science*, 39, 25–51.
- İşbilir, Ş.S., 2008. Yaprakları Salata-Baharat Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Kimya Anabilim Dalı.
- Jadhav, D., Rekha, B.N., Parag, R.G., Virendra, K.R., 2009. Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Food Engineering*, 93, 421–426.
- Jalali, H.T., Petronilho, S., Villaverde, J.J., Coimbra, M.A., Rosário, M., Domingues, M., Ebrahimian, Z.J., Silvestre, A.J.D., Rocha, S.M., 2013. assessment of the sesquiterpenic profile of *Ferula gummosa* oleo-gum-resin (galbanum) from Iran. Contributes to its valuation as a potential source of sesquiterpenic compounds. *Industrial Crops and Products*, 44, 185-191.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.V., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Jang, H., Ahn, H.R., Jo, H., Kim, K.A., Lee, E.H., Lee, K.W., Jung, S.H., Lee, C.Y., 2014. Chlorogenic acid and coffee prevent hypoxia-induced retinal degeneration. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62, 182–191.
- Jerkovic, I., Mastelic, J., Milos, M., 2001. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. Ssp. *Hirtum* grown wild in Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*, 36 (6), 649-654.
- Jewell, C., O'brien, N.M., 1999. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. *British Journal of Nutrition*, 81, 235–242.
- Jing, L., Zhang, Y., Fan, S., Gu, M., Guan, Y., Lu, X., Huang, C., Zhou, Z., 2013. Preventive and ameliorating effects of citrus D-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. *European Journal of Pharmacology*, 715(1-3), 46-55.
- Joaquín-Cruz, E., Dueñas, M., García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C., García-Salinas, C., 2015. Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of Chagalapoli (*Ardisia compressa*.) Fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151-157.
- Johnson, E.J., 2002. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in Clinical Care*, 5, 56–65.
- Jones, Q. R., Warford, J., Rupasinghe, H. P., Robertson, G.S., 2012. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(11), 602–610.
- Justesen, U., Knuthsen, P., 2001. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, 245–250.
- Juurlink, B.H.J., Azouz, H.J., Aldalati, A.M.Z., Altinawi, B.M.H., Ganguly, P., 2014. Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutrition Journal*, 13, 63.

- Kampa, M., Nifli, A. P., Notas, G., Castanas, E., 2007. Polyphenols and cancer cell growth. *Reviews in Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 159, 79–113.
- Karakaş, D., Arı, F., Ulukaya, E., 2017. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 41, 919-925.
- Karakas, F.P., Turker, A.U., Karakas, A., Mshvildadze, V., Pichette, A., Legault, J., 2017. In vitro cytotoxic, antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activities and phenolic content in wild-grown flowers of common daisy-A medicinal plant. *Journal of Herbal Medicine*, 8, 31-39.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100 (2), 584–589.
- Katiki, L.M., Ferreira, J.F.S., Gonzalez, J.M., Zajac, A.M., Lindsay, D.D., Chagas, A.C.S., Amarante, A.F.T., 2013. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans* and their antioxidant capacity, *Veterinary Parasitology*, 192 (1-3), 218-227.
- Kaufman, P.B., Duke, J.A., Briemann, H., 1997. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health. *Journal of Altern Complement Medicine*, 3, 7–12.
- Kavoosi, G., Rowshan, V., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* Oleo-Gum-Resin: effect of collection time. *Food Chemistry*, 138(4), 2180-2187.
- Kavoosi, G., Purfard, A.M., Aram, F., 2012. radical scavenging properties of essential oils from *Zataria multiflora* and *Ferula assafoetida*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 1351-1356.
- Kayoko. S., Hisae, O., Michiyo, F., 1998. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-B-glucoside in rats and humans. *FEBS Letters*, 438, 220–224.
- Kawabata, K., Tanaka, T., Honjo, S., Kakumoto, M., Hara, A., Makita, H., Tatematsu, N., Ushida, J., Tsuda, H., Mori, H., 1999. Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 83(3), 381-386.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., 1999. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 3565–3571.
- Kayman, Ü. 2013. Fenil Propanoid Ve Terpenoid Karışımlarının Jel Ekstraksiyonu İle Ayrılmasının İncelenmesi Ümit Kayman Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Temel İşlemler Ve Termodinamik Programı İstanbul Üngversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Kelebek, H., Selli, S., Gubbuk, H., Gunes, E., 2015. Comparative evaluation of volatiles, phenolics, sugars, organic acids and antioxidant properties of SEL-42 and tainung papaya varieties. *Food Chemistry*, 173, 912–919.
- Keskin, N., 2010. Prokaryotik çeşitlilik: bakteriler. brock mikroorganizmaların biyolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara, 353.
- Khajeh, M., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F., Pirmoradei, M.R., 2005. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 91, 639-644.
- Khan, M.T., Orhan, I., Enol, S.S., 2009. Cholinesterase inhibitory activities of some

- flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chemico-Biological Interactions*, 181, 383–389.
- Khan, N., Ahmed, M., Ahmed, A., Shaukat, S., Wahab, M., Ajaib, M., Siddiqui, M.F., Nasir, M., 2011. Important medicinal plants of chitral gol national park (CGNP). *Pakistan Journal of Botany*, 43, 797–809.
- Khan, M.I.R., Iqbal, N., Masood, A., Per, T.S., Khan N.A., 2013. Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. *Plant Signaling and Behaviour*, 8(11), 26374.
- Khan, M.I.R., Nafees, M., Khan, A., 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in Mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 67-74.
- Khanam, U.K.S., Oba, S., Yanase, E., Murakami, Y., 2012. Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4, 979–987.
- Khiari, Z., Makris, D.P., Kefalas, P., 2009. An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems. *Food Bioprocess Technology*, 2, 337-343.
- Kim, S.H., Choi, K.C., 2013. Anti-cancer effect and underlying mechanism(s) of kaempferol, a phytoestrogen, on the regulation of apoptosis in diverse cancer cell models. *Toxicology Research*, 29, 229–234.
- Kimbaris, A.C., Siatis, N.G., Daferera, D.J., Tarantilis, P.A., Pappas, C.S., Polissiou, M.G., 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*), *Ultrasonic Sonochemistry*, 13, 54–60.
- Konczak, I., Zhang, W., 2004. Anthocyanins-more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 239–240.
- Konica Minolta, 2003. Handbook. Konica Minolta Sensing, Inc.
- Konieczynski, P., Arceusz, A., Wesolowski, M., 2016. Essential elements and their relations to phenolic compounds in infusions of medicinal plants acquired from different European regions. *Biological Trace Elements Research*, 170, 466–475.
- Koohmaraie, M., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Guerini, M., Shachelford, S.D., Wheeler, T.L., 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, 71(1), 79-91.
- Kouyakhi, E.T., Naghavi, M.R., Alayhs, M., 2008. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 124–126.
- Köksal, E., Gülçin, İ., Öztürk, S.B., Bursal, E., 2009. On the in vitro antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition Medicine Chemistry*, 24, 395–405.
- Krenn, L., Unterrieder, I., Rupprechter, R., 2002. Quantification of isoflavones in red clover by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 777, 123–128.
- Kubo, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T. Ishikawa, H., 1996. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medicine*, 62, 427–430.
- Kumar, A., Nair, A.G.C., Reddy, A.V.R., Garg, A.N., 2005. Availability of essential elements in Indian and US tea brands. *Food Chemistry*, 89 (3), 441-448.
- Kurt C., 2007. Sağlıklı Gönüllülerde Dipiridamolün Serum ve İdrar Kalsiyum - Fosfor

- Düzeylerine Etkileri. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Nefroloji Bilim Dalı. Adana.
- Kwon, H.J., Hong, Y.K., Kim, K.H., Han, C.H., Cho, S.H., Choi, J.S., Kim B.W., 2006. Methanolic Extract Of *Pterocarpus santalinus* Induces Apoptosis In Hela Cells, *Journal of Ethnopharmacology*, 105 (1-2),229-334.
- Lall, R.K., Syed, D.N., Adhami, V.M., Khan, M.I., Mukhtar, H., 2015. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *International Journal of Molecular Science*, 16, 3350–3376.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, N., Belletti, N., Guerzoni, M. E., Gardini, F., 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 201-208
- Lang, Q., Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 53 (4), 771–782.
- Lapchak, P.A., 2007. The phenylpropanoid micronutrient chlorogenic acid improves clinical rating scores in rabbits following multiple infarct ischemic strokes: synergism with tissue plasminogen activator. *Experimental Neurology*, 205(2), 407-413.
- Lee, Y., Yuk, D., Lee, J., 2009. Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of β -amyloid generation and memory deficiency. *Brain Research*, 1250, 164–174.
- Lee, K., Lee, J.S., Jang, H.J., Kim, S.M., Chang, M.S., Park, S.H., Kim, K.S., Bae, J., Park, J.W., Lee, B., Choi, H.Y., Jeong, C.H., Bu, Y., 2012. Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology*, 689(1-3), 89-95.
- Lehotay, S. 1997. Supercritical Fluid Extraction of pesticides in foods, *Journal of Chromatography A*, 785 (1-2), 289-312.
- Leong, T., Ashokkumar, M.S. 2011. Kentish, the fundamentals of power ultrasound: a review, *Acoustics Australia*, 39,: 54–63.
- Leung, L.K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., 2001. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, 131, 2248–2251.
- Li, H., Pordesimo, L., Weiss, J., 2004. high intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans, *Food Research International*, 37, 731–738.
- Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.-J., Xu, X.-R., Chen, Y.-M., Li, H.B., 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020–6047.
- Li, H., Chen, B., Yao, S., 2005. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (E. Ulmodies). *Ultrasonics Sonochemistry*, 12 (4), 295–300.
- Li, X.J., Yang, Y.J., Li, Y.S., Zhang, W.K., Tang, H.B., 2016. α -pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 22-26.
- Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Souza, E.L., Farias, N.P., Navarro, D.F., 2005. Inhibitory action of some phytochemicals of yeasts potentially causing of opportunistic infections. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 199-203.
- Linuma, M., Tanaka, T., Hamada, K., 1987. Revised structure of neoflavone in *Coutarea Hexandra*. *Phytochemistry*, 26, 3096–3097.

- Liu, T., Stern, A., Roberts, L.J., 1999. the isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Journal of Biomedicine Science*, 6, 226–35.
- Liu, Y., Wong, T.P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T.W., Wu, D.C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A.M., Wang, Y.T., 2007. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *Journal of Neuroscience*, 27, 2846-2857.
- Liu, R.H., 2013. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advanced Nutrition*, 4, 384–392.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Research*, 4(8), 118-26.
- Longchamp, M., Castrec-Rouelle, M., Biron, P., Bariac, T., 2015. Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature zea mays plants supplied with selenite or selenate original research article. *Food Chemistry*, 182, 128-135.
- López-Lázaro, M. 2009. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Review of Medicinal Chemistry*, 9, 31–59.
- López, A., De Tangil, M.S., Vega-Orellana, O., Ramírez, A.S., Rico, M., 2013. Phenolic constituents, antioxidant and preliminary antimycoplasmic activities of leaf skin and flowers of Aloe vera (L.) Burm. F. (Syn. A. Barbadensis Mill.) from the Canary Islands (Spain). *Molecules*, 26,18(5), 4942-54.
- Lorimer, J.P., Mason, T.J., 1987. Sonochemistry. Part 1-The physical aspects, *Chemical Society Review*, 16, 239–274.
- Lourens, A.C., Reddy, D., Baser, K.H., Viljoen, A.M., Van Vuuren, S.F., 2004. In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African Helichrysum species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 253–258.
- Luengo, E., Condon, S., Condon, S., Raso, J., 2014. Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. *Separation and Purification Technology*, 136, 130–136.
- Luo, M.R., 2006. Applying colour science in colour design. *Optics and Laser Technology*, (38), 392-398.
- Luo, M., Bi, S., 2003. Solid phase extraction–spectrophotometric determination of dissolved aluminum in soil extracts and ground waters. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 173–178.
- Luthria, D.L., Pastor-Corrales, M., 2006. Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) varieties. *Journal of Food Composition Analysis*, 19, 205–211.
- Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Xu, G., Liu, D., 2008. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel, *Ultrasonic Sonochemistry*, 15 (3), 227–232.
- Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H., Ye, X.Q., 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrasonic Sonochemistry*, 16, 57–62.
- Ma, N.S., Abraham, M., Choi, M.J., Kim, J.S., 2014. Skin permeation and comparative evaluation of gentisic acid ester derivatives as skin-lightening agents. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24 (2), 212-217.

- Machado, A.P.F, Pereira A., Barbero, G.F., Martínez, J., 2017. recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasoundassisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry*, 231, 1-10.
- Maclennan, D.H., 2000. Ca^{2+} signalling muscle disease. *European Journal of Biochemistry*, 267 (17), 5291–7.
- Mackert, J.D., McIntosh, M.K., 2016. Combination of the anthocyanidins malvidin and peonidin attenuates lipopolysaccharide-mediated inflammatory gene expression in primary human adipocytes. *Nutrition Research*, 36(12), 1353-1360.
- Maggi, F., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M. M., Tirillini, B., Sagratini, G., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. Subsp. *Glauca*) growing in Marche (Central Italy). *Fitoterapia*, 80(1), 68–72.
- Maggi, F., Papa, F., Dall'acqua, S., Nicoletti, M., 2015. Chemical analysis of essential oils from different parts of *Ferula communis* L. growing in central Italy. *Natural Product Research*, 30(7), 806-813
- Mahendra, P., Bisht, S., 2012. *Ferula assafoetida*: Traditional uses and pharmacological activity. *Pharmacognosy Review*, 6, 141–146.
- Mahesha, M. Poojary, P.P., Danijela B.K., Francisco J. B., Jose M.L., Daniel A.D., Avi, S., 2017. stability and extraction of bioactive sulfur compounds from allium genus processed by traditional and innovative technologies. *Journal of Food Composition and Analysis*, 6, 28-39.
- Mahn, A., 2017. Modelling of the effect of selenium fertilization on the content of bioactive compounds in broccoli heads. *Food Chemistry*, 233, 492-499.
- Maier, G., Mayer, P., Dietrich, H., Wucherpfennig, K., 1990. Polyphenoloxidasen und ihre anwendung bei der stabisierung von fruchsaften, *Flüssiges Obst*, 57(4), 230-239.
- Mailloux, R.J., Lemire, J., Appanna, V.D., 2011. Hepatic response to aluminum toxicity: dyslipidemia and liver diseases. *Experimental Cell Research*, 317(16), 2231–2238.
- Majekodunmi, S.O., 2015. Review of extraction of pharmaceutica. *Mjrmms*, 3, 521–527.
- Maksumova, N.S., Yuldashev, M.P., Batirov, E.K., 1994. Luteolin glucosides from *Ferula varia*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 5, 679-680.
- Malagutti, A.R., Zuin, V., Cavalheiro, É., 2006. Determination of rutin in green tea infusions using square-wave voltammetry with a rigid carbon–polyurethane composite electrode. *Electroanalysis*, 18, 1028–1034.
- Mamani, M.C.V., Aleixo, L.A., Abreu, M.F., Rath, S., 2005. Simultaneous determination of cadmium and lead in medicinal plants by anodic stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37(4), 709-713.
- Mamoci, E., Cavoski, I., Simeone, V., Mondelli, D., Al-Bitar, L., Caboni, P., 2011. Chemical composition and in vitro activity of plant extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against postharvest fungi. *Molecules*, 16, 2609–2625.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. 1. review of 97 bioavailability studies.

- American Journal of Clinical Nutrition, 81 (1), 230–242.
- Mandegary, A., Sayyah, M., Heidari, M.R., 2004. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of the seed and root extracts of *Ferula gummosa* Boiss in mice and rats. Daru Journal of Pharmaceutical Sciences, 12(2), 58-62.
- Mane, S., Bremner, D. H., Tziboula-Clarke, A., Lemos, M. A., 2015. Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from purple majesty potato. Ultrasonics Sonochemistry, 27, 509–510.
- Manolakou, S., Tzakou, O., Yannitsaros, A., 2013. Volatile constituents of *Ferula communis* L. Subsp. *communis* growing spontaneously in Greece. Records of Natural Products, 7 (1), 54–58.
- Mao, L.C., Pan, X., Que, F., Fang, X.H., 2006. Antioxidant properties of water and ethanol extracts from hot air-dried and freeze dried daylily flowers. European Food Research and Technology, 222, 236–241.
- Margulis, M.A., Margulis, I.M., 2003. Calorimetric method for measurement of acoustic power absorbed in a volume of a liquid. Ultrasonic Sonochemistry, 10, 343–345.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V., 2003. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. Food Chemistry, 81, 189-197.
- Mason, T.J., 1990. Chemistry With Ultrasound, Elsevier Applied Science, New York.
- Mason, T.J., Lorimer, J.P., 2002. General principles, In: T.J. Mason, J.P. Lorimer (Eds.), Applied Sonochemistry: Uses of power ultrasound in chemistry and processing, Wiley-Vch Verlag, Germany, Pp. 25–74.
- Mason, T.J., Copley, A.J., Graves, J.E., Morgan, D., 2011. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound, Ultrasonic Sonochemistry, 18, 226–230.
- Masniyom, P., Benjama, O., Maneesri, J., 2012. Effect of turmeric and lemongrass essential oils and their mixture on quality changes of refrigerated Green mussel (*Perna Viridis*). International Journal of Food Science and Technology, 47, 1079–1085.
- Matthies, A., Clavel, T., Gütschow, M., 2008. Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine. Applied Environmental Microbiology, 74: 47-48.
- Mazewski, C., Liang, K., De Mejia, E.G., 2018. Comparison of the effect of chemical composition of anthocyanin-rich plant extracts on colon cancer cell proliferation and their potential mechanism of action using in vitro, in silico, and biochemical assays. Food Chemistry, 242, 378-388.
- Mazlum, B., 2012. Antioksidan vitaminler ve psikiyatride kullanımı. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar, 4 (4), 486-505.
- Mccord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for Erythrocyperin (Hemocuprein), Journal of Biological Chemistry, 224, 6049-6055.
- Medina, I., Undeland, I., Larsson, I., Storr, I., Rustad, T., Jacobsen, C., Kristinová, V., Gallardo, J., 2012. Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review. Food Chemistry, 131, 730–740.
- Medjakovic, S., Jungbauer, A., 2008. Red clover isoflavones biochanin a and formononetin are potent ligands of the human aryl hydrocarbon receptor. Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology, 108, 171–177.
- Mekonnen, A., Yitayew, B., Tesema, A., Taddese, S., 2016. In vitro antimicrobial

- activity of essential oil of *Thymus Schimperi*, *Matricaria Chamomilla*, *Eucalyptus Globulus*, *Androsmarinus Officinalis*. International Journal of Microbiology, 9545693.
- Metcalf, C.R., Chalk, L., 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon Press.
- Metodiewa, D., Kochman, A., Karolczak, S., 1997. Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active n, n, diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. Biochemical Molecular Biology International, 41, 1067–1075.
- Mianabadi, M., Hoshani, M., Salmanian, S., 2015. antimicrobial and anti-oxidative effects of methanolic extract of *Dorema aucheri* Boiss. Journal of Agricultural Science and Technology, 17(3), 623-634.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacological Reviews, 52, 673–751.
- Mikova, K., 2001. The regulation of antioxidants in food. in antioxidants in foods (J. Pokorny, N. Yanisshlieva And M. Gordon, Eds.) Pp. 266–283, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
- Milder, I.E.J., Arts, I.C.W., Van De Putte, B., Venema, D.P., Hollman, P.C.H., 2005. Lignan contents of dutch plant foods: A database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. British Journal of Nutrition, 93, 393-402.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D., 1990. Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. Free Radical Biology and Medicine, 8, 95–108.
- Mitropoulou, G., Fitsiou, E., Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Bardouki H., Vamvakias M., Panas P., Chlichlia K., Pappa A., Kourkoutas, Y., 2017. *Citrus Medica* essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity. LWT - Food Science and Technology, 84, 344-352.
- Moghadam, F.H., Zarch, B.V., Shafiei, M., 2013. Double edged effect of gum-resin of *Ferula assa-foetida* on lifespan of neurons. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 16(4), 668-671.
- Moghaddam, M., Farhadi, N., 2015. Influence of environmental and genetic factors on resin yield, essential oil content and chemical composition of *Ferula assa-foetida* L. populations. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2, 69–76.
- Mohammadhosseini, M., Mahdavi, B., Akhlaghi, H., 2013. Characterization and chemical composition of the volatile oils from aerial parts of *Eryngium Bungei* Bioss. (Apiaceae) by using traditional hydrodistillation, microwave assisted hydrodistillation and head space solid phase microextraction methods prior to GC and GC/MS analyses: A comparative approach. Journal of Essential Oil-Bear. Plants, 16, 613–623.
- Mohammadhosseini, M., Akbarzadeh, A., Hashemi-Moghaddam, H., Mohammadi Nafchi, A., Mashayekhi, H.A., Aryanpour, A., 2016. Chemical composition of the essential oils from the aerial parts of *Artemisia sieberi* by using conventional hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation: A comparative study. Journal of Essential Oil-Bear. Plants, 19: 32–45.
- Mohammadhosseini, M., 2017. The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological

- properties and medicinal applications of essential oils and extracts of different *Ziziphora* species. *Industrial Crops and Products*, 105, 164–192.
- Mojzer, E.B., Hrnčić, M.K., Skerget, M., Knez, Z., Bren, U., 2016. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic. *Molecules*, 21, 901- 939.
- Mollazadeh, S., Matin, M.M., Iranshahi, M., Bahrami, A.R., Neshati, V., Behnam-Rassouli, F., 2010. The enhancement of vincristine cytotoxicity by combination with feselol. *Journal of Asian Natural Product Research*, 12, 569–75.
- Moran, N.A., Jarvik, T., 2010. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science*, 328, 624–627.
- Mortazaienezhad, F., Sadeghian, M.M., 2006. Investigation of compounds from Galbanum (*Ferula gummosa*) Boiss. *Asian Journal of Plant Science*, 5, 905–906.
- Mossa, J.S., El-Ferally, F.S., Muhammad, I., 2004. Antimycobacterial constituents from *Juniperus procera*, *Ferula communis* and *Plumbago zeylanica* and their in vitro synergistic activity with isonicotinic acid hydrazide. *Phytotherapy Research*, 18, 934–937.
- Mot, C.A., Dumitrescu, S.R., Sarbu, C., 2011. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-VIS spectroscopic data. *Journal of Food Composite and Analysis*, 24, 516-522.
- Mourey, A., Canillac, N., 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13, 289-292.
- Munoz-Bertomeu, J., Arrillaga, I., Segura, J., 2007. Essential oil variation within and among natural populations of *Lavandula latifolia* and its relation to their ecological areas. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 479.
- Mungan, G., 1996. Kan Bankalarında Cpda-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine) ile Saklanan Kanlarda Allopürinolün Lipit Peroksidasyonu ve Biyokimyasal Parametrelere Etkisinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. Ankara Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya. Ankara.
- Nabavi, S.F., Habtemariam, S., Sureda, A., Nabavi, S.M., 2012. *Ferula gummosa* Boiss as a rich source of natural antioxidants with numerous therapeutic uses-a short review. A. Capasso (Ed.), *Medicinal plants as antioxidant agents: Understanding their mechanism of action and therapeutic efficacy*, Research Signpost, Trivandrum, Pp. 15-26.
- Naczki, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 29 (1-2), 95-111.
- Nahr, F.K., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Kafi, H.S., 2018. Food grade nanostructured lipid carrier for cardamom essential oil: preparation, characterization and antimicrobial activity. *Journal of Functional Foods*, 40, 1–8.
- Nalcı, K.A., 2016. Seftriaksonun Eksitator Aminoasit Taşıyıcı 1 (EAAT1), EAAT2, EAAT3 Blokerleriyle Birlikte Kullanımının Sıçan Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. Erzurum.
- Nardini, M., Leonardi, F., Scaccini, C., Virgili, F., 2001. Modulation of ceramide-induced nf-kb binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidant, *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 722–

733.

- Nasirizadeh, N., Shekari, Z., Dehghani, M., Makarem, M., 2016. Delphinidin immobilized on silver nanoparticles for the simultaneous determination of ascorbic acid, noradrenalin, uric acid, and tryptophan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(2), 406-416.
- National Agricultural Library, 2014. Dr Duke's phytochemical and ethnobotanical databases. Citrus Aurantium L. <https://Phytochem.Nal.Usda.Gov/Phytochem/Search/List> (Accessed June 2016).
- Naveena, B.M., Sen, A.R., Kingsly, R.P., Singh, D.B., Kondarah, N., 2008. Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1807–1812.
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S., Khan, N.A., 2011. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 168, 807–815.
- Nazar, R., Umar, S., Khan, N. A., 2015. Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate-glutathione metabolism and s assimilation in mustard under salt stress. *Plant Signal Behavior*, 10(3), 1003751.
- Nazari, Z.E., Iranshahi, M., 2011. Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytotherapy Research*, 25(3), 315-23.
- Negi, P.S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 7-17.
- Neshati, V., Matin, M.M., Iranshahi, M., Bahrami, A.R., Behravan, J., Mollazadeh, S., 2009. conferone enhances vincristine cytotoxicity in 5637 cell line. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64, 317–22.
- Ngamwonglumert, L., Devahastin, S., Chiewchan, N., 2017. Natural colorants: pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. *Critical Review in Food Science Nutrition*, 13,57(15), 3243-3259.
- Nguir, A., Mabrouk, H., Douki, W., Ben Ismail, M., Ben Jannet, H., Flamini, G., Hamza, M.A., 2016. Chemical composition and bioactivities of the essential oil from different organs of *Ferula communis* L. growing in Tunisia, *Medicinal Chemistry Research*, 25, 515-525.
- Nicotera, P., Bernassola, F., Melino, G., 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 23, 2757-2765.
- Nielsen, K.F., Sumarah, M.W., Frisvad, J.C., Miller, J.D., 2006. Production of metabolites from the penicillium roqueforti complex. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 3756-3763.
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., 2018. Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mandarin (*Citrus Reticulata* Blanco Cv. Sainampung) peel. *Food Chemistry*, 241, 338-345.
- Nishimura, S., Taki, M., Takaishi, S., 2000. Structures of 4-aryl coumarin (neoflavone) dimers isolated from *pistacia chinensis bunge* and their estrogen-like activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48, 505–508.
- Noe, S.M., Cicciooli, P., Brancaleoni, E., Loreto, F., Niinemets, Ü., 2006. Emissions of

- monoterpenes linalool and ocimene respond differently to environmental changes due to differences in physico-chemical characteristics. *Atmospheric Environment*, 40, 4649-4662.
- Nurdağ, N., 2013. Cytotoxic and Apoptotic Effects of Caffeic Acid and Caffeoyl Malic Acid on Cancer Cells. Master Thesis. Fatih University The Graduate School of Sciences and Engineering Master of Science In Biology. Istanbul.
- Nunez De Gonzalez, M.T., Boleman, R.M., Miller, R.K., Keeton, J.T., Rhee, K.S., 2008. Antioxidant properties of dried plum ingredients in raw and precooked pork sausage. *Journal of Food Science*, 73, 63–71.
- Oh, B.S., Shin, E.A., Jung, J.H., 2015. Apoptotic effect of galbanic acid via activation of caspases and inhibition of MCL-1 in H460 non-small lung carcinoma cells. *Phytotherapy Research*, 29(6), 844-849.
- Oke Altuntas, F., Aslim, B., Duman, H., 2016. The anti-lipid peroxidative, metal chelating, and radical scavenging properties of the fruit extracts from endemic *Prangos meliocaroides* Boiss Var. *meliocaroides*. *Gazi University Journal of Science*, 29(3), 537-542.
- Omar, H.R., Guglin, M., 2017. Longer-than-average length of stay in acute heart failure: Determinants and outcomes. *Herz*, 43 (2), 131-139.
- Oniszczyk, A., Woźtowiec, A., Oniszczyk, T., Olech, M., Nowak, R., Wojtunik, K., Klimek, M., Krawczyk, W., Hajnos, M., 2015. Extruded corn Gruels containing linden flowers: Quantitation of phenolic compounds and selected quality characteristics. *Open Chemistry*, 13, 1209–1217.
- Osma, E., 2009. İstanbul'da Yetişen Bazı Sebzelere Ağır Metal Birikiminin Tespiti. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ovando, C., Hernandez, D., Hernandez, E., 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Ozkan, H., Yanmis, D., Karadayi, M., Bal, T., Baris, O., Gulluce, M., 2012. Determination of genotoxic and antigenotoxic properties of essential oil from *Ferula orientalis* L. using Ames/Salmonella and E. Coli Wp2 bacterial test systems. *Toxicol Ind Health*, 30(8), 714-23.
- Özenç, B. 2011. *Fumaria officinalis*'un Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı. Konya.
- Özpak Akkuş, Ö. 2015. Tip 2 Diyabeti Olan ve Olmayan Bireylerin Serum D Vitamini, Kalsiyum ve Magnezyum Düzeyleri ile Beslenme Alışkanlıklarının Karşılaştırılması. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Ankara.
- Pichette, A., Larouche, P.-L., Lebrun, M., Legault, J., 2006. Composition and Antibacterial Activity of *Abies Balsamea* Essential Oil. *Phytotherapy Research*, 20, 371–373.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Lefter, R., Serban, I., Stefanescu, C., Chirita, R., 2013. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease *Psychiatria Danubina*, 25 (4), 401-409.
- Paiva, S.A., Russell, R.M., 1999. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal American College of Nutrition*, 18, 426–433.
- Pakaştıçalı, N., 2014. Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde *Staphylococcus aureus* Küçük Koloni Varyantlarının ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul

- Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. İstanbul.
- Palma, M., Barbero, G.F., Pineiro, Z., Liazid, A., Barroso, C.G., Rostagno, M.A., Prado, J.M., Meireles, M.A.A., 2013. Chapter 2: Extraction of natural products: Principles and fundamental aspects, In: M.A. Rostagno, J.M. Prado (Eds.), *Natural Product Extraction: Principles and applications*, The Royal Society of Chemistry, Uk, Pp. 58–88.
- Palma, M., Barroso, C.G., 2002. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, 458, 119-130.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5(47), 1- 15.
- Papas, A.M., 1993. Oil-soluble antioxidants in foods. *Toxicology Ind. Health*, 9, 123-149.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L., 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis Mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos De Biologiae Technologia*, 40, 97-106.
- Pavlović, I., Petrović, S., Radenković, M., Milenković, M., Couladis, M., Branković, S., Pavlović Drobac, M., Niketić, M., 2012. Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. Ex Heuffel (Apiaceae) essential oil. *Food Chemistry*, 130(2), 310-315.
- Pavlovic, I., Petrovic, S., Milenkovic, M., 2015. Antimicrobial and cytotoxic activity of extracts of *Ferula heuffelii* Griseb. Ex Heuff. and its metabolites. *Chemistry and Biodiversity*, 12(10), 1585-1594.
- Peng, K., Shirley, D.C., Xu, Z., Huang, Q., Mcallister, T.A., Chaves, A.V., Acharya, S., Liu, C., Wang, S., Wang, Y., 2016. effect of purple prairie clover (*dalea purpurea* vent.) hay and its condensed tannins on growth performance, wool growth, nutrient digestibility, blood metabolites and ruminal fermentation in lambs fed total mixed rations. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 100-110.
- Pereira, F.J. Castro, E.M., Oliveira, C., Pires, M.F. E Pasqual, M., 2011. Mecanismos Anatômicos E Fisiológicos De Plantas De Aguapé Para A Tolerância À Contaminação Por Arsênio. *Planta Daninha*, 29(2), 259-267.
- Perez-Rodríguez, L. 2009. Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. *Bioessays*, 31, 1116–1126.
- Perumalla, A.V.S., Hettiarachchy, N. S., 2011. Green tea and grape seed extracts—potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44, 827–839.
- Pétrier, C., Gondrexon, N., Boldo, P., 2008. ultrasons et sonochimie, techniques de l'ingénieur chimie verte: optimisation des modes de séparation. D'activation Et De Synthèse Base Documentaire: T1b493duo.
- Peyrat-Maillard, M.N., Bonnely, S., Berset, C., 2000. Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51(4), 709-16.
- Pichersky, E., Noel, J. P., Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311, 808-811.
- Pierpoint, W.S., 2000. Why do plants make medicines? *Biochemist*, 22, 37-40.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F., 2013. Chapter 3: Ultrasound-Assisted Extraction, In: M.A. Rostagno, J.M. Prado (Eds.), *Natural product extraction:*

- Principles and applications, The Royal Society of Chemistry, Uk, 2013, Pp. 89–112.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. Fungi and food spoilage, Third Ed. Springer, London Peters.
- Golden, M., Henderson, W.R., 2007. Leukotrienes. The New England Journal of Medicine, 357, 1841–1854.
- Pratt, D.E., 1996. Antioxidants: Technical and regulatory considerations. In Bailey's Industrial Oil & Fat Products (Y.H. Hui, Ed.) Pp. 524–545, Wiley, New York.
- Preece, K.E., Hooshyar, N., Krijgsman, A.J., Fryer, P.J., Zuidam, N.J., 2017. pilot-scale ultrasound-assisted extraction of protein from soybean processing materials shows it is not recommended for industrial usage. Journal of Food Engineering, 206, 1-12.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agriculture Food Chemistry, 53, 4290-4302.
- Ponmurugan, K., Al-Dhabi N.A., Maran, J.P., Karthikeyan, K., Moothy, I.G., Sivarajasekar, N., Manoj, J.J.B., 2017. Ultrasound assisted pectic polysaccharide extraction and its characterization from waste heads of Helianthus Annus. Carbohydrate Polymers, 173, 707-713.
- Popovic, V.B., Tomic, M.A., Stepanovic-Petrovic, R.M., 2017. Laserpitium Zernyi Hayek Flower and Herb extracts: Phenolic compounds, and anti-edematous, antioxidant, and antimicrobial activities. Chemistry and Biodiversity, 14, 5.
- Porres-Martinez, M., Gonzalez-Burgos, E., Emilia Carretero, M., 2016. In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes alpha-pinene and 1,8-cineole against h₂o₂-induced oxidative stress in pc12 cells. Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-A Journal Of Biosciences, 71(7-8), 191-199.
- Qian, Y., Guan, T., Tang, X., Huang, L., Huang, M., Li, Y., Sun, H., Yu, R., Zhang, F., 2011. Astrocytic glutamate transporter-dependent neuroprotection against glutamate toxicity: An in vitro study of maslinic acid. European Journal of Pharmacology, 651, 59- 65.
- Rahali, F.Z., Lamine, M., Gargouri, M., Rebey, I.B., Hammami, M., Sellami, I.H., 2016. Metabolite profiles of essential oils and molecular markers analysis to explore the biodiversity of *Ferula communis*: Towards conservation of the endemic giant fennel. Phytochemistry, 124, 58–67.
- Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. Clinical Interventions in Aging, 2, 219–236.
- Ramdane, F., Essid, R., Fares, N., El Ouassis, D., Aziz, S., Mahammed, M.H., Hadj, M.D.O., Limam F., 2017. Antioxidant antileishmanial cytotoxic and antimicrobial activities of a local plant *Myrtus nivellei* From Algeria Sahara. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(8), 702–707.
- Ramos, S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. Molecular Nutrition Food Research, 52, 507–526.
- Rassouli, F.B., Matin, M.M., Iranshahi, M., Bahrami, A.R., Neshati, V., Mollazadeh, S., 2009. Mogoltacin enhances the cytotoxicity of vincristine on TCC cell line. Phytomedicine, 16, 181–7.
- Rassouli, F.B., Matin, M.M., Iranshahi, M., Bahrami, A.R., Behravan, J., Mollazadeh, S., 2011. Investigating the enhancement of cisplatin cytotoxicity on 5637 cells by

- combination with mogoltacin. *Toxicol In Vitro*, 25, 469–74.
- Rathmell, W.G., Bendall, D.S., 1971. Phenolic compounds in relation to phytoalexin biosynthesis in hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Plant Pathology*, 1, 351–362.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, N.M.V.R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, 189–207.
- Rawson, A., Hossain, M.B., Patras, A., 2013. Effect of boiling and roasting on the polyacetylene and polyphenol content of fennel (*Foeniculum vulgare*) Bulb. *Food Research International*, 50(Special Issue), 513-518.
- Rayman, M. P., 2008. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 100, 254–268.
- Razavi, S.M., Nahar, L., Talischia, H., Sarker, S.D., 2016. Ferulone A and Ferulone B: Two new coumarin esters from *Ferula orientalis* L. Roots. *Natural Product Research*, 30(19), 2183–2189.
- Razic, S., Onjia, A., Dogo, S., Slavkovic, L., Popovic, A., 2005. Determination of metal content in some herbal drugs-empirical and chemometric approach. *Talanta*, 67, 233-239.
- Reichardt, C., 2003. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, Wiley-Vch Publishers.
- Reische, D.W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R.R., 1998. Food lipids. In *Chemistry, nutrition and biotechnology* (C.C. Akoh And D.B. Min, Eds.) Pp. 423–448, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Renna, M., Gonnella, M., 2012. The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1(2), 111-115.
- Renna, M., Cocozza, C., Gonnella, M., Abdelrahman, H., Santamaria, P., 2015. Elemental characterization of wild edible plants from countryside and urban areas. *Food Chemistry*, 177, 29–36.
- Rezende, Y.R.R.S., Nogueira, J.P., Narain, N., 2017. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial Acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 158-169.
- Ribeiro, B., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2007. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1805–1813.
- Riss, T.I., Moravec, R.A., Niles, A., Duellmann, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L., 2016. *Assay Guidance Manual* (Internet): Cell Viability Assays. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/Nbk144065/?Report=Reader#!Po=1.16279>, Erişim Tarihi, 10.04.2018.
- Roberson, T., Heymann, O., Swift, E., 2010. In: *Sturdevant's art and science of operative dentistry*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, Pp. 67- 134.
- Roma'n Aguirre, M., Gochi, Y. P., Sa'nchez A. R., De La Torre, L., Aguilar-Elguezabal, A., 2008. Synthesis of camphene from α -pinene using SO₃ 2- Functionalized Mcm-41 As Catalyst. *Applied Catalysis A: General*, 334, 59–64.
- Romney, A.K., Fulton, J., 2006. Transforming reflectance spectra into munsell color space by using prime colors. *Proceedings of the National Academy of Science of*

- the United States of America, 103(42),15698-15703.
- Roriz, C.I., Barros, L., Prieto, M.A, Barreiro, M.F., Morales, P., Isabel, C.F.R. 2017. Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Industrial Crops and Products*, 105, 29–40.
- Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G., 2003. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012 (2), 119–128.
- Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review Nutrition*, 22, 19–34.
- Sadraei, H., Asghari, G. R., Hajhashemi, V., Kolagar, A., Ebrahimi, M., 2001. *Phytomedicine*, 8, 370.
- Sahu, B.D., Kalvala, A.K., Koneru, M., 2014. Ameliorative effect of fisetin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats via modulation of NF-KB Activation And Antioxidant Defence. *Plos One* 9: 105070.
- Saleem, M., Alam, A., Sultana, S., 2001. Asafoetida inhibits early events of carcinogenesis: a chemopreventive study. *Life Science*, 68, 1913–1921.
- Salem, B.S., Jabrane, A., Harzallah-Skhiri, F., Jannet, B.H., 2013. New bioactive dihydrofuranocoumarins from the roots of the tunisian *Ferula lutea* (Poir.) Maire. *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*, 23, 4248–4252.
- Salem, B.S., Mansour, Z., Aymen, J., 2016. Chemical composition, antimicrobial, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of the root essential oil from the Tunisian *Ferula lutea* (Poir.) Maire (*Apiaceae*). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(4), 897-906.
- Sališová, M., Toma, Š., Mason, T.J., 1997. Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*, *Ultrasonic Sonochemistry*, 4, 131–134.
- Samadi, N., Shahani, S., Akbarzadeh, H., 2016. Essential oil analysis and antibacterial activity of *Ferula assa-foetida* L. Aerial parts from neishabour mountains. *Research Journal of Pharmacognosy*, 3(3), 35-42.
- Samaranayaka, A.G.P., Li-Chan, E.C.Y., 2011. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Food*, 3 (4), 229-254.
- Sánchez-Mata, M.C., Cabrera Loera, R.D., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Díez Marqué, S C., Pardo-De-Santayana, M., Tardío, J., 2012. Wild vegetables of the mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59, 431–443.
- Sanna, C., Ballero, M., Maxia, A., 2006. Le piante medicinali utilizzate contro le patologie epidermiche in ogliastra (Sardegna Centro-Orientale). *Atti Della Società Toscana Di Scienze Naturali, Memorie, Serie B*, 113,73–82.
- Santos, H.M., Lodeiro, C., Capelo-Martínez, J.L., 2009. The power of ultrasound, In: Capelo-Martínez J. L. (Ed.), *Ultrasound in chemistry: Analytical applications*, Wiley-Vch Verlag, Germany, Pp. 1–16.
- Santos, I.S., Ponte, B.M., Boonme, P., Silva, A.M., Souto, E.B., 2013. Nanoencapsulation of polyphenols for protective effect against colon-rectal cancer. *Biotechnology Advances*, 31, 514–523.
- Santos, D.C.M.B., Carvalho, L.S.B., Lima, D.C., Leão, D.J., Teixeira, L.S.G., Graças, M., 2017. Korndetermination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP-OES after ultrasound-assisted extraction procedure. *Journal Of Food Composition and*

- Analysis, 34(1),75-80.
- Sawalha, S.M.S., 2009. Characterization Of Bioactive Compounds İn Food Products Using Advanced Seperatives Techniques. Doctoral Thesis. Granada University Faculty of Science Department of Analytical Chemistry. Granada, Spain.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 45, 287–306.
- Scientific Committee For Food, 1993. Reports of the scientific committee for food of the european community (Thirty-First Series). Nutrient and Energy İntakes for the European Community. Luxembourg: Commission Of The European Communities.
- Selamoglu, Z. , Dusguna, C, Akgul, H., Gulhan, M.F., 2017. In-vitro antioxidant activities of the ethanolic extracts of some contained-allantoin plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16 (Special Issue), 92-98.
- Sengul, G., Coskun, S., Cakir, M., Coban, M.K., Saruhan, F., Hacimuftuoglu, A., 2011. Neuroprotective effect of ace inhibitors in glutamate - induced neurotoxicity: rat neuron culture study. *Turkish Neurosurgery*, 21, 367-371.
- Sengul, M., Yildiz, H., Kavaz, A., 2014. The effect of cooking on total polyphenolic content and antioxidant activity of selected vegetables. *International Journal of Food Properties*, 17(3), 481-490.
- Seo, W.H., Baek, H.H., 2005. Identification of characteristic aroma-active compounds from Water Dropwort (*Oenanthe javanica* DC.) *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 6766–6770.
- Sepahi, S., Ghorani-Azam, A., Sepahi, S., 2014. in vitro study to evaluate antibacterial and non-haemolytic activities of four Iranian medicinal plants. *West Indian Medical Journal*, 63(4), 289-293.
- Serim, E., 2017. Papatya İçeren Kozmetiklerde Apigenin Miktar Tayini. Bezm-i Alem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı. İstanbul.
- Seyidoğlu, N., 2015. Tavşanlarda *Spirulina Platensis* ve Canlı Maya Kültürü *Saccharomyces cerevisiae*'nin Bağışıklık Sistemi ve Büyüme Performansı Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Veterinerlik) Anabilim Dalı. Bursa.
- Shahidi, F., Naczk, M., 1995. *Food Phenolics: Sources, chemistry, effects, applications*, lancaster: Technomics, 312p, USA.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44, 158–163.
- Shahidi, F., 2003. Antioxidants. In *food additive databook* (J. Smish And L. Hong-Shum, Eds.) P. 75, Blackwell Science Ltd., Oxford, U.K.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2005. Antioxidants: Regulatory status. In *Bailey’s industrial oil and fat products* (F. Shahidi, Ed.) Pp. 491–511, Wiley, New Jersey.
- Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Zarrini, G., Dehghan, G., Iranshahi, M., 2007. Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin g and cephalixin against *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30.
- Sharififar, F.F., Yassa, N., Mozaffarian, V., 2010. Bioactivity of major components from the seeds of *Bunium persicum* (Boiss.). *Pak. Journal of Pharmaceutical Science*, 23(3), 300-304.

- Sharma, S., Sahni, J. K., Ali, J., Baboota, S., 2013. Patent perspective for potential antioxidant compounds-rutin and quercetin. *Recent Patents on Nanomedicine*, 3, 62-68.
- Shayganni, E., Bahmani, M., Asgary, S., Rafieian, K.M., 2016. Inflammaging and cardiovascular disease: management by medicinal plants. *Phytomedicine*, 23, 1119- 1126.
- Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z., 2014. Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products. *Food Chemistry*, 157, 553-558.
- Shi, X.Q., Chang, K.C., Schwarz, J.G., Wiesenborn, D.P., Shih, M.C., 1996. Optimizing pectin extraction from sunflower heads by alkaline washing. *Bioresource Technology*, 58(3), 291–297.
- Shimamura, M., Nishiyama, T., Shigetomo, H., Toyomoto, T., Kawahara, Y., Furukawa, K., Fujii, T., 2007. Isolation of a multiheme protein with features of a hydrazine-oxidizing enzyme from an anaerobic ammonium-oxidizing enrichment culture. *Applied Environment Microbiology*, 73, 1065–1072.
- Shirin, K., Imad, S., Shafiq, ., Fatima, K., 2010. Determination of major and trace elements in the indigenous medicinal plant *Withania somnifera* and their possible correlation with therapeutic activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 14, 97-100.
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H., Gogate, P.R., 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – a review of current status. *Chemistry of Engineering Process*, 53, 10–23.
- Shirsath, S.R., Sablea, S.S., Gaikwad, S.G., Sonawane, S.H., Sainic, D.R., 2017. Intensification of extraction of curcumin from curcuma amada using ultrasound assisted approach: effect of different operating parameters. *Gogatee Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 437–445.
- Silvina-Latito, B., Frei, B., 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 1727-1746.
- Singh, G., Marimuthu, P., De Heluani, C. S., Catalan, C. A., 2006. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (Seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 174–181.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods In Enzymology*, 299, 152-178.
- Sivakumar, V., Lakshmi, A. J., Vijayeeswaree, J., Swaminathan, G., 2009. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 782–789.
- Sivaramakrishnan, V., Shilpa, P.N.M., Kumar, V.R.P. And Devaraj, S.N., 2008. Increased LDL and especially oxidized LDL are recognized as risk factors in coronary artery disease (Cad). *Chemico Biological Interaction*, 171, 79-88.
- Skalicka-Woźniak, K., Główniak, K. 2008. Quantitative analysis of phenolic acids in extracts obtained from the fruits of *Peucedanum alsaticum* L. and *Peucedanum cervaria* (L.) Lap. *Chromatographia*, 68, 85-90.
- Skendi, A., Iraki, M., Chatzopoulou, P., 2017. Analysis of phenolic compounds in Greek

- Plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 62-69.
- Smiljkovic, M., Stanisavljevic, D., Stojkovic, D., 2017. Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin: insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. *Excli Journal*, 16:795-807.
- Snene, A., Sirignano, C., Rigano, D., Formisano, C., El Mokni, R., Ercolano, G., Dhaouadi, H., Ianaro, A., Hammami, S., Tagliatalata-Scafati, O., 2017. Antiproliferative metabolites from the Northern African endemic plant *Daucus virgatus* (Apiaceae). *Phytochemistry*, 143, 194-198.
- Sri Harsha, P.S.C., Khan, M.I., Prabhakar, P., Giridha, P., 2013. *Food Research International*, 50(1), 275-281.
- Solereeder, H., 1908. *Systematische anatomie der dicotyledonen*. Vol. II. Stuttgart, Germany: Verlag Von Ferdinand Enke.
- Soliman, K.M., Badeaa, R.I., 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669–1675.
- Sousa, W.R., Rocha, C., Cardoso, C.L., Silva, D.H.S., Zanoni, M.V.B., 2004. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange 70 juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 619-633.
- Sreedharan, V., Venkatachalam, K.K., Namasivayam, N., 2009. Effect of morin on tissue lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Investigational New Drugs*, 27, 21-30.
- Srinivasan, K., 2005. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Research International*, 38, 77–86.
- Sroka, Z., Cisowski, W., 2003. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chemistry and Toxicology*, 41(6), 753-8.
- Stewart, A.J., Bozonnet, S., Mullen, W., 2000. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 2663–2669.
- Stoner, G.D., Mukhtar, H., 1995. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of Cell Biochemistry*, 22, 169–180.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K. S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., Olson, M. V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* pao1, an opportunistic pathoge. *Nature*, 406, 959-964.
- Subash, S., Subramanian, P., 2009. Morin a flavonoid exerts antioxidant potential in chronic hyperammonemic rats: a biochemical and histopathological study. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 327(1-2), 153-161.
- Sultana, B., Anwar, F., 2008. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, 108(3), 879-884.
- Sung, S.-Y., Sin, L.T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Rahmat, A.R., 2014. Effects of *Allium sativum* essence oil as antimicrobial agent for food packaging plastic film. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 26, 406–414.

- Suslick, K.S. 1989. The chemical effects of ultrasound, *Science American*, 260, 80–86.
- Suslick, K.S., Didenko, Y., Fang, M.M., Hyeon, T., Kolbeck, K.J., Mcnamara, W.B., Mdeleleni, M. M., Wong, M., 1999. Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Ser. A*, 357,335–353.
- Suslick, K.S., Eddingsaas, N.C., Flannigan, D.J., Hopkins, S.D., Xu, H., 2011. Extreme conditions during multibubble cavitation: sonoluminescence as a spectroscopic probe. *Ultrasonic Sonochemistry*, 18, 842–846.
- Sun, J., 2007. D-Limonene: safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*, 12(3), 259-264.
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Yu, D., 2011. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans-b-carotene from citrus peels. *Ultrasonic Sonochemistry*, 18, 243–249.
- Sylvestre, M., Legault, J., Dufour, D., Pichette, A., 2005. Anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12, 299–304.
- Szatkowski, M., Attwell, D., 1994. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends in Neurosciences*, 17, 359-365.
- Szkudelska, K., Nogowski, L., 2007. Genistein – a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105, 37–45.
- Szopa, A., Ekiert, H., 2015. *Anethum graveolens* L. in vitro cultures - a potential source of bioactive metabolites, phenolic acids and furanocoumarins. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 57(2), 29-37.
- Şahan, T. 2010. *Leontice smirnowii*'nin Muhtemel Nöroprotektif ve Nörodejeneratif Potansiyellerinin Belirlenmesi. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Bolu.
- Tabrez, S., Priyadarshini, M., Urooj, M., Shakil, S., Ashraf, G.M., Khan, M.S., Kamal, M.A., Alam, Q., Jabir, N.R., Abuzenadah, A.M., 2013. Cancer chemoprevention by polyphenols and their potential application as nanomedicine. *Journal of Environment Science and Health*, 31, 67–98.
- Takaya, J., Higashino, H., Kobayashi, Y., 2004. Intracellular magnesium and insulin resistance. *Magnesium Research*, 17, 126-136.
- Tayeboon, G.S., Tavakoli, F., Hassani, S., Khanavi, M., Sabzevari, O., Ostad, S.N., 2013. Effects of *cymbopogon citratus* and *Ferula assafoetida* extracts on glutamate-induced neurotoxicity. *In Vitro Cellular Development Biology-Animal*, 49, 706-715.
- Taylor, M., Kambuou, R., Lyons, G.H., Hunter, D., Morgan, E.H., Quartermain, A., 2015. Realizing the potential of indigenous vegetables through improved germplasm information and seed systems. *Acta Horticulture*, 1102, 29-42.
- Teuscher, E., 2006. *Medicinal Spices. A handbook of culinary herbs, spices, spice mixtures and their essential oils.* Stuttgart: Medpharm GmbH Scientific Publishers.
- Thomas, B., 2001. *Manual of dietetic Practice (3rd Ed.)*. Oxford: Blackwell Publishing.
- Thompson, L.U., Boucher, B.A., Liu, Z., 2006. phytoestrogen content of foods consumed in canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutrition and Cancer*, 54, 184–201.
- Thomson, C. 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium

- status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 391–402.
- Thosaikham, W., Jitmanee, K., Sittipout, R., Maneetong, S., Chantiratikul, A., Chantiratikul, P., 2014. Evaluation of selenium species in selenium-enriched pakchoi (*Brassica Chinensis* Jusl var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion-pair reversed phase HPLC–ICP-MS. *Food Chemistry*, 145, 736–742.
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: a clean, green extraction technology, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109.
- Tokur, O., Aksoy, A., 2017. In vitro sitotoksiste testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 112-118.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J., 2001. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonic Sonochemistry*, 8, 137–142.
- Tomas-Barberan, F., Clifford, M., 2000. dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food And Agriculture*, 80(7):,1024-1032.
- Tomasch, R., Wagner K.H., Elmadfa, I., 2001. Antioxidative power of plant oils in humans: the influence of alpha and gamma-tocopherol, *annals of nutrition and metabolism*, 45, 110–115.
- Tonhosolo, R., D'alexandri, F.L., De Rosso, V.V., Gazarini, M.L., Matsumura, M.Y., Peres, V.J., Merino, E.F., Carlton, J.M., Wunderlich, G., Mercadante, A.Z., 2009. Carotenoid biosynthesis in intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*. 284(15), 9974-85.
- Topdaş, E.F., 2012. Elmaların Ultrases Yardımlı Ozmotik Kurutulması. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Erzurum.
- Traber, M.G., Stevens, J.F., 2011. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biological Medicine*, 51, 1000–1013.
- Truong, V.D., Deighton, N., Thompson, R.T., 2010. Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple- fleshed sweetpotatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58, 404–410.
- Tunçtürk, M., Özgökçe, F., 2015. Chemical composition of some apiaceae plants commonly used in herby cheese in eastern Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39, 55-62.
- Tupec, M., Hýsková, V., Bělohožníková, K., Hraníček, J., Červený, V., Ryšlavá, H., 2017. Characterization of some potential medicinal plants from central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. *Food Bioscience*, 20, 43–50.
- Tübives, 2017. http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=4347. Erişim: Aralık 2017.
- Türkez, H., Aydın, E., 2016. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene. *Toxicol ind Health*, 32(1), 168-76.
- Uğuzlar, H., 2009. Antalya'da Yetişen *Araceae arum*'un Antioksidan Aktivitesi ve Toplam Fenolik Madde Tayini. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- Ubwa, S.T., Tyohemba, R.I., Oshido, B.A., Amua, Q.M., 2014. Chemical analysis of some wild underutilized mucilaginous vegetables and a domesticated vegetable in benue state, Nigeria. *Br Journal of Applied Science Technology*, 4, 4566-74.
- Umpress, S.T., Murphy, S.P., Franke, A.A., 2005. Isoflavone content of foods with soy

- additives. *Journal Food Composition and Analysis*, 18, 533–550.
- Unuofin, J.O., Otunola, G.A., Afolayan, A.J., 2017. Toxicity assessment of *kedrostis africana* cogn: a medicinal plant used in the management of obesity in south africa using Brine shrimp (*Artemia salina* Linn.) assay. *Ijpsr*, 8(9), 3719-3725.
- Usal, G., 2014. Buğday Tarlası Atıklarından Alkali Hidroliz ile Fenolik Maddelerin Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Tokat.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161–1208.
- Van Aardt, M., Duncan, S.E., Long, T.E., O’keefe, S.F., Marcy, J.E., Sims, S.R., 2004. Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: Thermogravimetric analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52, 587–591.
- Vankar, P.S., 2004. Essential oils and fragrances from natural Sources. *Resonance*, 9 (4), 30–41.
- Vauzour, D., 2014. Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer’s disease pathophysiology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1042–56.
- Velickovic, V., Durovic, S, Radojkovic, M., 2017. Application of conventional and non-conventional extraction approaches for extraction of *Erica carnea* L.: Chemical profile and biological activity of obtained extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 128, 331-337.
- Verma, S., Singh, A., Mishra, A., 2013. Gallic Acid: molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35, 473–485.
- Verma, N., Shukla, S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
- Verporte, R., Ingkanianan, K., Memelink, J., Heijden, R., 1999. Chapter 4. Plant cell biotechnology: Production of natural products. Ed: Amélia Pilar Rauter, Fernando B.P., Jorge J., Maria E.A., Susana, P.D.S., 347 P.
- Vetal, M.D., Lade, V.G, Rathod, V.K., 2013. Extraction of ursolic acid from *ocimum sanctum* by ultrasound: process intensification and kinetic studies. *Chemical Engineering Processes*, 69, 24–30.
- Vijayalakshmi, A.S., Bhat, P., Chatuverdi, A., Baiiry, K.L., Kamath, S., 2012. Evaluation of the effect of *Ferula assafoetida* Linn. Gum Extract on learning and memory in wistar rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 44(1), 82-87.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review. *Innovative Food Science Emerging Technology*, 9, 161–169.
- Vilkhu, K., Manasseh, R., Mawson, R., Ashokkumar, M., 2011. Ultrasonic recovery and modification of food ingredients, In: H. Feng, G. Barbosa-Canovas, J. Weiss (Eds.), *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*, Springer, New York, Usa, Pp. 345–368.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonic Sonochemistry*, 8, 303–313.
- Vinatoru, M., Mason, T.J., Calinescu, I., 2017. Ultrasonically assisted extraction (UAE)

- and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.
- Viot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, M.C.G.C., Chemat F., 2010. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 1066-1074.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., 2008. Antifungal Activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19 (12), 1130-1138.
- Volk, R.B., 2004. Porträt einer arzneipflanze: Tang (Fucus). *Zeitschrift Für Phytotherapie*, 25 (1), 46-54.
- Volpi, N., Bergonzini G., 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line hplc-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(3), 354-361.
- Venigalla, M., Gyengesi, E., Münch, G., 2015. Curcumin and apigenin-novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 10 (8), 1181- 85.
- Walker, E., Pacold, M., Perisic, O., 2000. Structural determinations of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, ly294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular Cell*, 6, 909-919.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J., 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus Officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*, 108, 1019-1022.
- Wang, W., Tao, R., Tong, Z., Ding, Y., Kuang, R., Zai, S., Liu, J., Ni, L., 2012. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysopsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides*, 33(2), 212-219.
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., Ye, X., Liu, F.X., 2015. Ultrasound assisted extraction of pectin from grapefruit peel: optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry*, 178, 106-114.
- Wang, S., Zhu, F., 2017. Chemical composition and biological activity of staghorn sumac (*Rhus typhina*). *Food Chemistry*, 237, 431-443.
- Wang, Z., Hwang, S.H., Quispe, Y.N.G., Arce, P.H.G., Lim, S.S., 2017. investigation of the antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of extracts from Peruvian Tea plant infusions. *Food Chemistry*, 231(15), 222-230.
- Waters, W.A. 1943. Achemical interpretation of the mechanism of oxidation by dehydrogenase enzymes, *Transactions of the Faraday Society*, 39, 140-151.
- Weber, G. 1988. HPLC with electrochemical detection of metal-flavonoid-complexes isolated from food. *Chromatographia*, 26(1), 133-138.
- Weichselbaum, E., Buttriss, J.L., 2010. Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, 35, 157-164.
- Weiss, L. 1935. Investigation of free radical H₂O in solution, *Transactions of the Faraday Society*, 31, 668-681.
- WHO (World Health Organization), 1993. Evaluation of certain food additives and contaminants. who technical report series, No. 837. Available From: Access Date 11.09.14.
- WHO (World Health Organization), 2012.. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Food Additives Series 65.

- [Http://Whqlibdoc.Who.Int/Publications/2012/9789241660655_Eng.Pdf](http://Whqlibdoc.Who.Int/Publications/2012/9789241660655_Eng.Pdf). Who, 2012. Guideline: Sodium İntake For Adults And Children.
- Wikipedia, 2017. https://En.Wikipedia.Org/Wiki/4-Hydroxybenzoic_Acid. Erişim: Kasım 2017
- Wikipedia, 2018. <https://en.0wikipedia.org/index.php?q=aHR0cHM6Ly9lbi53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvR2VudGlzaWNfYWNPZ> A Erişim tarihi: Ocak 2018.
- Wu, F., Zhang, M., Gong, W., 2001. Crystallization preliminary crystallographic studies apoptosis-linked cabp alg-2. *Acta Crystallographica D, Biological Crystallography*, 57, 1162–3.
- Wu, C., Luan, H., Zhang, X., Wang, S., Zhang, X., Sun, X., Guo, P., 2014. Chlorogenic acid protects against atherosclerosis in apoe^{-/-} mice and promotes cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages. *Plos One*, 9(9), 95452.
- Wu, P., Ma, G., Li, N., Deng, Q., Yin, Y., Huang, R., 2015. Investigation of in vitro and in vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food Chemistry*, 173, 194–202.
- Wu, J. C., Lai, C. S., Lee, P. S., Ho, C. T., Liou, W. S., Wang, Y.J., Pan, M. H., 2016. Anti-cancer efficacy of dietary polyphenols is mediated through epigenetic modifications. *Current Opinion in Food Science*, 8, 1–7.
- Wu, J., Sun, X., Guo, X., Ge, S., Zhang, Q., 2017. Physicochemical properties, antimicrobial activity and oil release of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil. *Aquaculture and Fisheries*, 2(4), 185-192.
- Xia, T., Shi, S., Wan, X., 2006. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. *Journal of Food Engineering*, 74, 557–560.
- Xu, D.P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., Li, H.B., 2017. ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and Comparison with Conventional Methods *Food Chemistry*, 217, 552-559.
- Yan, W., Qiu, H., Iyer, N., 2008. Feature extraction for bearing prognostics and health management (phm) – a survey. MFPT 2008, Virginia Beach, Virginia.
- Yang, Y., Zhang, F., 2008. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (4), 308–313.
- Yang, F.Y., Jiang, S.J., Sahayam, A.J., 2014. Combined use of HPLC–ICP-MS and microwave-assisted extraction for the determination of cobalt compounds in nutritive supplements. *Food Chemistry*, 147, 215-219.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L., 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21, 381–406.
- Yang, L., Wang, H., Yuan-Gang, Zu., Zhao, C., Zhang, L., Chen, X., Zhang, Z., 2011. Ultrasound-Assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* using ionic liquid aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 172 (2–3), 705–712.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A.O., Wang, Y., Huang, S., Zhou, C., Ye, X., Ma, H., Duan, Y., 2018. Effects of ultrasound-assisted α -amylase degradation treatment with multiple modes on the extraction of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40, 890-899.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L., 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of

- ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79, 307-313.
- Yetük, G., 2013. Gıda Katkı Maddesi Sodyum Benzoat'ın İnsan Eritrositleri Üzerinde İn Vitro Toksik Etkisi ve Kateşin ve Kuersetinin Koruyucu Rolü. Bozok Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yozgat. 1-37.
- Yildiz, O., Can, Z., Laghari, A.Q., Ahin, H.S., Malkoç, M., 2015. Wild edible mushrooms as a natural source of phenolics and antioxidants. *Journal of Food Biochemistry*, 39, 148–154.
- Yolmeh, M., Najafi, Mbh., Farhoosh, R., 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (Rsm). *Food Chemistry*, 155 (15), 319-324.
- Yoo, S.K., Day, D.F., Cadwallader, K.R., 2000. Bioconversion of α - and β - pinene by *Pseudomonas* Sp. Strain Pin, *Process Biochemistry*, 925–932.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176–86.
- You, J., Song, Z., 2013. Determination of picomole concentrations of aluminum (III) in human saliva and urine by a luminol-carboxymethyl chitosan chemiluminescence system. *Instrumentation Science and Technology*, 41, 524–534.
- Yuan, W., Hui W.L.H.W., Yuk, H.G., 2017. Antimicrobial efficacy of cinnamomum javanicum plant extract against *Listeria monocytogenes* and its application potential with smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 260, 42-50.
- Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A., Zandi, K., 2017. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*, 162(9), 2539-2551.
- Zellagui, A., Gherraf N., Hegazy M. E. F., Akkal, S., 2012. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of crude extract of the roots of *Ferula vesceritensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48, 5.
- Žemlička, L., Fodran, P., Lukeš, V., Vagánek A., Slováková, M., Staško, A., Dubaj, T., Liptaj, T., Karabín, A., Birošová, L., Rapta P., 2014. Physicochemical and biological properties of luteolin-7-o- β -d-glucoside (cynaroside) isolated from *Anthriscus sylvestris* (L.) Hoffm. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 145(8), 1307–1318.
- Zhang, Y., Wang, G.J., Song, T.T., 1999. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *Journal of Nutrition*, 129, 957–962.
- Zhang, J., Yang, J., Duan, J., Zhang, L., Huo, Y. Zhang, Y., 2005. Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *adinandra nitida* by high performance liquid chromatography with uv and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 532(1), 97-104.
- Zhang Z.S., Wang L.J., Li, D., Jiao, S.S., Chen, X.D., Mao Z.H., 2008. Ultrasound assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62, 192– 198.
- Zhang, R., Kang, K.A., Piao, M.J., Maeng, Y.H., Lee, K.H., Chang, W.Y., You, H.J., Kim, J.S., Kang, S.S. And Hyun, J.W., 2009. Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Chemicobiological Interactions*, 177, 21-27.
- Zhang H.F., Yang X.H., Zhao L.D., Wang, Y., 2009a. Ultrasonic-assisted extraction of epimedine from fresh leaves of *Epimedium* and extraction mechanism.

- Innovative Food Science Emerging Technology, 10, 54–60.
- Zhang Q.A., Zhang Z.Q., Yue X.F., Fan X.H., Li T., Chen S.F., 2009b. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder, *Food Chemistry*, 116, 513–518.
- Zhang, R., Kang, K.A., Kang, S.S., Park, J.W., Hyun, J.W., 2010. Morin (2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone) protected cells against γ -radiation-induced oxidative stress. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 108, 63-72.
- Zhang, W., Liu, T., Ren, G., Hörtensteiner, S., Zhou, Y., Edgar, B., Cahoon, C.Z., 2014. Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. *Fuel Processing Technology*, 127, 111-116.
- Zhang, H., Lu, J., Zhou, L., 2015a. Antioxidant and antitumor effects of *Ferula sinkiangensis*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20845-20852.
- Zhang, Y., Xu S., Yang, S., Chen, Y. 2015b., Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis Melo* L.). *Protoplasma*, 252, 911–924.
- Zhang, Q.A., Wang, T.T., 2017. effect of ultrasound irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage. *Food Chemistry*, 234, 372-380.
- Zhang, W., Zeng, G., Pan, Y., Chen, W., Huang, W., Chen, H. Li, Y., 2017. Properties of soluble dietary fiber-polysaccharide from papaya peel obtained through alkaline or ultrasound-assisted alkaline extraction. *Carbohydrate Polymers*, 172, 102–112.
- Zhao, L.I., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., Hu, X., 2006. Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-e)-astaxanthin. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54(21), 8346-51.
- Zheng, G. Q., Kenney, P. M., Lam, L. K., 1992. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Natural Products*, 55, 999–1003.
- Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 5165–5170.
- Zhu, Z., Wu, Q., Di, X., Li, S., Barba, F.J., Koubaa, M., Roohinejad, S., Xiong, X., He, J., 2017. Multistage recovery process of seaweed pigments: investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 40-47.
- Zia-Ul- Haq, M., Mansoor, A., Mehjabeen, N.J., Shakeel, A. , Mughal, Q., Inamullah, K.M., 2011. Antimicrobial screening of selected flora of Pakistan. *Archives of Biological Science*, 63 (3), 691-695.
- Zicari, G., Russo, M., Rivetti, D., Soardo, V., 2011. Nickel and health and environmental risks. *Progress in Nutrition*, 14, 249–255.
- Zidorn, C., Perry, N.B., 2002. a chemosystematically significant 6,8,11-trihydroxygermacrane derivative from the New Zealand *Apiaceae* *Anistome Pilifera*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(11), 1055-1063.
- Zinoviadou, K.G., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C.G., 2011. Biopolymer-based films as carriers of antimicrobial agents. *Procedia Food Science*, 1, 190-196.
- Znati, M., Hichem, B.J., Cazaux, S., 2014. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of plant extracts and compounds isolated

- from *Ferula lutea*. *Molecules*, 19(3), 2733-2747.
- Znati, M., Filali, I., Jabrane, A., 2017. Chemical composition and in vitro evaluation of antimicrobial, antioxidant and antigerminative properties of the seed oil from the Tunisian endemic *Ferula tunetana* Pomel Ex Batt. *Chemistry and Biodiversity*, 14, 1.
- Zu, G., Zhang, R., Yang, L., Ma, C., Zu, Y., Wang, W., Zhao, C., 2012. Ultrasound assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Molecular Science*, 13 (9), 11027–11043.
- Zucca, P., Sanjust, E., Loi, M., Sollai, F., Ballero, M., Pintus, M., Rescigno, A., 2013. Isolation and characterization of polyphenol oxidase from sardinian poisonous and non-poisonous chemotypes of *Ferula communis* (L.). *Phytochemistry*, 90, 16–24.



ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Erzurum’da tamamladı. 2004 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2012 yılında ‘Elmaların ultrases yardımlı ozmotik kurutulması’ konulu yüksek lisans tezini tamamladı ve aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim dalında doktora eğitimine başladı.