



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**SARI KANTARON OTUNUN (*Hypericum perforatum* L.) BATARYA TİPİ BİR
EKSTRAKTÖRDE EKSTRAKSİYONU ve HİPERİSİN'İN
SAFLAŞTIRILMASININ İNCELENMESİ**

Emre YILMAZOĞLU

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Metin HASDEMİR

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Programı

Haziran, 2022

BÜTÇE DESTEKLERİ

SARI KANTARON OTUNUN (*Hypericum perforatum* L.) BATARYA TİPİ BİR EKSTRAKTÖRDE EKSTRAKSİYONU ve HİPERİSİN'İN SAFLAŞTIRILMASININ İNCELENMESİ

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK) 2211-C
Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bana, sadece bu tez çalışmasını yapmamda değil hayatın getirdiği diğer zorlukları aşmamda da destek olan sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Metin HASDEMİR'e,

Tez İzleme Komitesi üyesi sayın hocalarım Doç. Dr. İlknur KÜÇÜK ve Doç. Dr. Yavuz Selim AŞÇI'ya,

çalışmamın antioksidan ölçümü ve kolon kromatografisi ile ilgili kısımlarında verdiği destek için sayın Doç. Dr. Belma HASDEMİR'e,

farklı kısımlarda verdikleri destekler için sayın hocalarım Prof. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ'ye, Prof. Dr. Ali DURMUŞ'a, Prof. Dr. Serkan EMİK'e Doç. Dr. Hasniye YAŞA'ya, Doç. Dr. Adem ÇINARLI'ya, Doç. Dr. Aslı GÖK'e, Araş. Gör. Ayşecik KAÇMAZ'a, Araş. Gör. arkadaşlarım Ebru KURTULBAŞ ŞAHİN ve İrem TOPRAKÇI YÜKSEL'e,

yaşamım boyunca bana destek olan rahmetli babam Halil YILMAZOĞLU'na ve varlıkları benim için hayatın anlamına denk olan annem Ayşe, kardeşlerim Duygu, Esra, Mine, Yasemin ve Başak YILMAZOĞLU'na,

ailemizi tamamlayan Louka ve Kömür'e

teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2022

Emre YILMAZOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	1
ÖZET	2
ABSTRACT	4
1. GİRİŞ.....	6
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	8
2.1. SARI KANTARON OTU.....	8
2.1.1. Kimyasal Bileşimi	10
2.1.2. Tıbbi Etkileri	13
2.1.3. Antioksidan Etki.....	18
2.1.4. Antimikrobiyal Etki	28
2.1.5. Uçucu Yağ İçeriği	29
2.1.6. Hiperisinle İlgili Çalışmalar	41
2.1.7. Kurutma.....	48
2.2. BİTKİSEL ÜRÜNLERİN ELDE EDİLME YÖNTEMLERİ	49
2.2.1. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri.....	50
2.2.2. Yağ Elde Etme Yöntemleri	52
3. YÖNTEM	59
3.1. MALZEME.....	59
3.1.1. Sarı Kantaron Otu (<i>Hypericum perforatum</i> L.).....	59
3.1.2. Kimyasal Malzemeler	59
3.2. EKİPMANLAR	60

3.2.1. Soxhlet Aparatı.....	60
3.2.2. Clevenger Aparatı	61
3.2.3. Çalkalamalı Su Banyosu	62
3.2.4. Batarya Tipi Ekstraktör	62
3.2.5. UV-Vis Spektrofotometresi.....	64
3.2.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi.....	64
3.2.7. İnce Tabaka Kromatografisi	65
3.2.8. Kolon Kromatografisi	65
3.3. YÖNTEMLER.....	65
3.3.1. Uçucu Yağ Eldesi.....	65
3.3.2. Toplam Hiperisin Ölçümü.....	66
3.3.3. Çalkalamalı Su Banyosunda Ekstraksiyon.....	67
3.3.4. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	67
3.3.5. Batarya Tipi Ekstraktörde Ekstraksiyon	68
3.3.6. DPPH Radikali Süpürme Kapasitesi	68
3.3.7. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi.....	69
3.3.8. Toplam Fenolik Madde İçeriği.....	69
3.3.9. İnce Tabaka Kromatografisi	70
3.3.10. Kolon Kromatografisi	70
3.3.11. Kristallendirme.....	70
4. BULGULAR	71
4.1. UÇUCU YAĞ.....	71
4.2. TOPLAM FENOLİK MADDE İÇERİĞİ.....	73
4.3. ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ.....	75
4.3.1. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi.....	75
4.3.2. DPPH Radikali Süpürme Kapasitesi	76
4.4. ÇALKALAMALI SİSTEMDE EKSTRAKSİYON	78
4.4.1. Suyla Ekstraksiyon.....	78
4.4.2. Metanol-Su Karışımıyla Ekstraksiyon	79
4.4.3. Aseton-Su Karışımıyla Ekstraksiyon	80
4.4.4. Etanol-Aseton Karışımıyla Ekstraksiyon	81
4.4.5. Etanol-Su Karışımıyla Ekstraksiyon	83
4.5. HİPERİSİN İÇERİĞİ TAHMİNİ	86
4.6. BATARYA TİPİ EKSTRAKTÖRDE EKSTRAKSİYON	87

4.7. SAFLAŞTIRMA.....	90
4.7.1. Kolon Kromatografisi	90
4.7.2. Piridinle Kristallendirme	92
5. TARTIŞMA.....	94
5.1. UÇUCU YAĞ.....	94
5.2. TOPLAM FENOLİK MADDE İÇERİĞİ.....	95
5.3. ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ	97
5.3.1. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi.....	97
5.3.2. DPPH Radikali Süpürme Kapasitesi	98
5.4. ÇALKALAMALI SİSTEMDE EKSTRAKSİYON	99
5.5. BATARYA TİPİ EKSTRAKTÖRDE EKSTRAKSİYON	100
5.6. SAFLAŞTIRMA.....	101
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
KAYNAKLAR.....	105
EK-1	131
EK-2	133
ETİK RAPORU İLK SAYFASI.....	136
ETİK KURUL İZİN YAZISI	137
KURUM İZNİ YAZILARI	138
ÖZGEÇMİŞ.....	139

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Sarı kantaron otunun ülkemizde yayılışı.....	8
Şekil 3.1: Soxhlet aparatı.....	60
Şekil 3.2: Hidrodestilasyon için kullanılan bir Clevenger aparatı.....	61
Şekil 3.3: Çalkalamalı su banyosu.....	62
Şekil 3.4: Batarya tipi ekstraksiyon sistemi.....	62
Şekil 3.5: Batarya tipi ekstraktör.	63
Şekil 3.6: Vakumlu döner buharlaştırıcı.....	63
Şekil 3.7: UV-Vis spektrofotometresi.	64
Şekil 3.8: GC-MS cihazı.....	64
Şekil 3.9: Hidrodestilasyon işlemi (sağda) ve uçucu yağ (solda).....	65
Şekil 3.10: Çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyon ürünleri.	67
Şekil 3.11: Soxhlet ekstraksiyon işlemi.....	67
Şekil 3.12: DPPH radikalinin reaksiyonu.....	68
Şekil 4.1: Toplam fenolik madde içeriği için çizilen pirokateşol kalibrasyon eğrisi.	73
Şekil 4.2: <i>H. perforatum</i> L. yapraklarının pirokateşol eşdeğeri toplam fenolik madde içeriği.	74
Şekil 4.3: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin pirokateşol eşdeğeri toplam fenolik madde içeriği. .	74
Şekil 4.4: <i>H. perforatum</i> L. yapraklarının CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasiteleri.....	75
Şekil 4.5: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasiteleri.....	76
Şekil 4.6: <i>H. perforatum</i> L. yapraklarının ve standart antioksidanların DPPH süpürme kapasiteleri.....	77
Şekil 4.7: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin ve standart antioksidanların DPPH süpürme kapasiteleri.....	78
Şekil 4.8: Suyla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.	79

Şekil 4.9: Metanol-suyla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.	80
Şekil 4.10: Aseton-suyla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.	81
Şekil 4.11: Etanol-asetonla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.	82
Şekil 4.12: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin etanol-suyla yapılan ekstraksiyonunda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.	84
Şekil 4.13: <i>H. perforatum</i> L. yapraklarının etanol-suyla yapılan ekstraksiyonunda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.	85
Şekil 4.14: Toplam hiperisin içeriği tahmin programının sonuçlarıyla deneysel verilerin karşılaştırılması.....	87
Şekil 4.15: Batarya tipi sistemde çözücü debisinin pompa frekansı ile değişimi.....	87
Şekil 4.16: Tek kolondan alınan ürünlerdeki toplam hiperisin içeriğinin çözücü debisi ile değişimi.	88
Şekil 4.17: 3 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi.	89
Şekil 4.18: 4 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi.	90
Şekil 4.19: İnce tabaka kromatografisi: Soldan sağa kloroform:metanol (8:1); kloroform:asetonitril (1:1); etanol:asetonitril (1:1); metanol:aseton:diklorometan (75:10:15).	91
Şekil 4.20: Metanol:aseton:diklorometan (75:10:15) ile yapılan kolon kromatografisi.	91
Şekil 4.21: Kolon kromatografisinden alınıp kurutulan ürün.....	92
Şekil 4.22: HCl ile asitlendirilmiş metanolle bekletilen üründe çökelti oluşumu.	92
Şekil 4.23: a) HCl-metanol karışımının süzülmesiyle elde edilen çökelti; b) Çökeltinin çözücüsü buharlaştırılmış hâli; c) Çözücüsü buharlaştırılan maddenin piridinle yıkanmasıyla elde edilen ürün; d) Piridin buharlaştırılmasıyla elde edilen ürün.	93

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Sarı kantaron otu üretici sayılarıyla bu üreticilerin ektiği alan büyüklükleri.....	10
Tablo 2.2: Sarı kantaron otu yağının bileşimi.	11
Tablo 2.3: Sarı kantaron yağının başlıca bileşenleri.....	12
Tablo 2.4: Sarı kantaron otu uçucu yağının ana bileşenleri.	36
Tablo 3.1: <i>H. perforatum</i> L. çiçek ve yapraklarının boyut analizi.	59
Tablo 4.1: <i>H. perforatum</i> L. yaprak uçucu yağının bileşenleri.	71
Tablo 4.2: <i>H. perforatum</i> L. çiçek uçucu yağının bileşenleri.....	72
Tablo 4.3: <i>H. perforatum</i> L. yapraklarının toplam fenolik madde içeriği.....	73
Tablo 4.4: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin toplam fenolik madde içeriği.	74
Tablo 4.5: CUPRAC yöntemine göre <i>H. perforatum</i> L. yaprak ekstreleriyle standart maddelerin absorbansları.....	75
Tablo 4.6: CUPRAC yöntemine göre <i>H. perforatum</i> L. çiçek ekstreleriyle standart maddelerin absorbansları.....	76
Tablo 4.7: Standart antioksidanlar, <i>H. perforatum</i> L. yaprakları ve çiçeklerinin DPPH radikali süpürme kapasiteleri.....	77
Tablo 4.8: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin sulu ekstrelerinde toplam hiperisin (%g/g) içeriği..	78
Tablo 4.9: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin metanol-su ekstrelerinde toplam hiperisin (%g/g) içeriği.....	79
Tablo 4.10: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin aseton-su ekstrelerinde toplam hiperisin (%g/g) içeriği.....	81
Tablo 4.11: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin etanol-aseton ekstrelerinde toplam hiperisin (%g/g) içeriği.....	82
Tablo 4.12: <i>H. perforatum</i> L. çiçeklerinin etanol-su ekstrelerinde % hiperisin (g/g) içeriği..	83
Tablo 4.13: <i>H. perforatum</i> L. yapraklarının etanol-su ekstrelerinde % hiperisin (g/g) içeriği.	83

Tablo 4.14: Farklı çözücü debileri ile tek kolondan alınan ürünlerin toplam hiperisin içeriği (%g/g)	88
Tablo 4.15: 3 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi (%g/g).....	89
Tablo 4.16: 4 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi (%g/g).....	90
Tablo 5.1. Elde edilen uçucu yağların başlıca bileşenlerinin bazı örneklerle karşılaştırılması.	95



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
$^{\circ}\text{C}$	: Derece Celcius
%	: Yüzde
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar

Kısaltmalar Açıklama

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Örgütü
UV-Vis	: Mor Ötesi-Görünür Bölge
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
SK	: Süperkritik
hac	: Hacmen
dk	: Dakika
BHT	: Bütil Hidroksi Toluen
BHA	: Bütil Hidroksi Anisol
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
HCl	: Hidroklorik asit
MSE	: Ortalama Hata Karesi
RMSE	: Ortalama Hata Karelerinin Kökü
R^2	: Regresyon Katsayısı

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SARI KANTARON OTUNUN (*Hypericum perforatum* L.) BATARYA TİPİ BİR EKSTRAKTÖRDE EKSTRAKSİYONU ve HİPERİSİN'İN SAFLAŞTIRILMASININ İNCELENMESİ

Emre YILMAZOĞLU

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Programı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Metin HASDEMİR

Ülkemizin birçok bölgesinde yetişebilen sarı kantaron otu (*Hypericum perforatum* L.) Haziran-Temmuz aylarında çiçeklenmeye başlayan çok yıllık bir bitkidir. 1 Ocak 2010 tarihinden beri T.C. Sağlık Bakanlığı'nın tıbbi bitkiler listesinde yer almaktadır. Çalışma konusu olarak seçilen bitki Türkiye'de kolaylıkla yetişebilir ve halk arasında çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılır. Bitki özellikle düşük ve orta dereceli depresyona karşı antidepresan etkisi, yanık, cilt lekesi, varis, ülser, iltihap gibi iç ve dış yaralara karşı antienflamatuvar, antimikrobiyal, antibakteriyel etkisi, içeriğindeki fenolik maddeler sayesinde antioksidan etkisi nedeniyle kullanılır. Geleneksel olarak bitkinin içinde bekletildiği zeytinyağının cilde sürülerek, suyla seyreltilip içilerek, demlenerek kullanımı görülmektedir. Aromaterapide masaj yağı olarak sürülerek ve solunum yollarını rahatlatmak için koklanarak kullanımı da mevcuttur.

Piyasada geleneksel veya süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi modern yöntemlerle üretilmiş yağlar bulunmaktadır. Bu yağların içeriklerinin birbirinden farklı olduğu, hatta bazılarının iyileştirici hiçbir bileşen içermediği kayıtlara geçmiştir. Bu nedenle standartlara uygun, kaliteli bir ürünün düşük maliyetle üretimi önemlidir. Tıbbi amaçlı standartlarda hiperisin oranı %0,3 olarak belirlenmiştir. Antidepresan etki gösteren hiperisinin oranının yüksek olması ürünün katma değerinin daha yüksek olduğunu gösterir. Yapay olarak da üretilabilen bu bileşenin doğal yollardan üretimi, bu konudaki dışa bağımlılığı azaltacaktır. Bitkinin yerli, teknolojik bir ürün için değerlendirilebilmesi ekimi arttıracak, kırsal kalkınmayı destekleyecektir.

Bu tezde, ülkemizin bitkisel kaynaklarından sarı kantaron bitkisinden, kaliteli yağların üretilmesi ve başta hiperisin olmak üzere katma değeri yüksek bileşenlerin saf hâlde elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaçla, piyasada kendine yer bulabilecek bileşime ve maliyete sahip ürün elde edilmeye çalışılmıştır. Üzerinde çalışılacak bitki örnekleri İstanbul'un Şile ilçesindeki kırsal alanlardan Haziran-Temmuz aylarında toplanmıştır. Toplanan bitkiler laboratuvar koşullarında kurutulduktan sonra yaprak ve çiçekler ayrı ayrı Soxhlet aparatı, ısıtmalı çalkalamalı su banyosu ve Clevenger aparatı ile çalışılmıştır. Her çalışmada çeşitli parametreler (çözücü, çözücü oranı, sıcaklık, süre) incelenecek ve en uygun çalışma koşulları bulunmuştur. Laboratuvarda yapılan denemelerle belirlenen koşullarda çalışacak batarya tipi bir ekstraktörde pilot ölçekli üretim yapılmıştır.

Bileşenlerin çoğu benzer lipofilik özellikte olduğundan hiperisin bakımından saf yağlar elde edilmesi özel çalışmalar gerektirmektedir. Üretilen yağlar içerik, maliyet, uygulama kolaylığı gibi açılardan değerlendirilerek uygun numuneler sıvı-sıvı ekstraksiyonu, ince tabaka kromatografisi ve kolon kromatografisi gibi analitik yöntemlerle hiperisin bakımından saflaştırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca ürünlerin antioksidan aktiviteleri de incelenmiştir.

Çalışmanın özgün değeri batarya tipi bir ekstraktörde ilk kez sarı kantaron otunun ekstrakte edilmesi ve saflaştırma işleminin yeni bir bakış açısıyla gerçekleştirilecek olmasıdır. Çalışma sonunda piyasadaki ürünlere rakip olabilecek kalitede yüksek oranda hiperisin içeren yağlar üretilmesi hedeflenmiştir.

Haziran 2022 , [152] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Sarı kantaron otu, *Hypericum perforatum* L., Ekstraksiyon, Hiperisin]

ABSTRACT**Ph.D. THESIS****EXTRACTION of ST. JOHN'S WORT (*Hypericum perforatum* L.) USING A
BATTERY TYPE EXTRACTOR and INVESTIGATION of PURIFICATION of
HYPERICIN****Emre YILMAZOĞLU****Istanbul University-Cerrahpaşa****Institute of Graduate Studies****Department of Chemical Engineering****Programme of Unit Operations and Thermodynamics****Supervisor : Assist. Prof. Dr. İbrahim Metin HASDEMİR**

St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.), which can grow in many regions of our country, is a perennial plant that begins to bloom in June-July. Since January 1, 2010, it has been on the list of medicinal plants of the Ministry of Health of the Republic of Turkey. Plant selected as study subject can be easily grown in Turkey and is used in the treatment of various ailments of the people. The plant is used especially for its antidepressant effect against low and moderate depression, for its anti-inflammatory, antimicrobial, antibacterial effects against internal and external wounds such as burns, skin spots, varicosis, stomach ulcers, skin inflammation, for its antioxidant effect from its phenolic components. Traditionally, olive oil, in which the plant is kept, is applied to the skin, diluted with water and drunk or brewed. In aromatherapy, it is also used as a massage oil and smelling to relieve the airways.

There are oils on the market produced by traditional or modern methods such as supercritical fluid extraction. It was recorded that the contents of these oils differ from each other, and some of them even contain no healing ingredients. For this reason, it is important to produce a qualified product in compliance with the standards at low cost. The rate of hypericin in medical standards has been determined as 0.3%. The high rate of hypericin with antidepressant effect indicates that the higher value of the product. The natural production of this component, which can also be produced artificially, will reduce foreign dependence on this matter. Evaluation of the plant for a domestic, technological product will increase cultivation and support rural development.

In this thesis, it is aimed to produce high qualified oils and to purify high valuable components like hypericin from St. John's Wort, is one of our country's vegetable sources. For this purpose, it was tried to obtain a product with a composition and cost that can find itself in the market. Plant samples to be studied were collected from rural areas in Şile district of Istanbul in the June-July months. Collected plants were dried in laboratory conditions. Leaves and flowers were studied separately with Soxhlet apparatus, heated shaking water bath, and Clevenger apparatus system. In each study, various parameters (solvent, solvent ratio, temperature, duration, etc.) were examined and the most suitable working conditions were found. Pilot scale production was done in a battery-type extractor that will operate under conditions determined with laboratory studies.

Since most of the components have similar lipophilic properties, obtaining pure oils with regards to hypericin requires special studies. The produced oils were evaluated in terms of content, cost, ease of application. Appropriate samples were purified in terms of hypericin by analytical methods such as liquid-liquid extraction, thin layer chromatography and column chromatography. In addition, antioxidant activities of products were examined.

The original value of the study is that for the first time St. John's Wort was extracted in a battery-type extractor and purified with a new perspective. At the end of the study, it was aimed to produce oils with high hypericin ratio which can compete with the products in the market. |

June 2022, |152| pages.

Keywords: |St. John's wort, *Hypericum perforatum* L., Hypericin, Extraction |

1. GİRİŞ

Yurdumuzda birçok bölgede yetişen sarı kantaron otu, tarihsel ve yöresel olarak farklı adlarla tanınmaktadır. Yapraklarında ve çiçeklerinde bulunan delikler nedeniyle binbirdelik otu, kırmızı renkli yağı nedeniyle kan otu, yaraların iyileşmesini sağladığı için kılıç otu veya mayasıl otu adları bitkinin en yaygın kullanılan adlarıdır. Hem Anadolu coğrafyasında hem de Avrupa ve Amerika kıtalarında, çeşitli rahatsızlıkların iyileştirilmesinde bir alternatif tıp yöntemi olarak bitkiden yararlanılmasının tarihi eskidir. Örneğin, geçmiş tarihlere dair kitaplarda, Osmanlı ordularının savaşlarda aldıkları yaraların tedavisinde kullanmak üzere sefere çıkarken yanlarına sarı kantaron otu yağı taşıdıklarına değinilmiştir. Bitki Aziz John adlı ermişin anıldığı 24 Haziran civarında çiçek açtığı için İngilizce ad olarak St. John's wort (Aziz John Otu) adıyla anılır. Diğer Avrupa dillerinde de yine Aziz John'a atıf yapılarak adlandırılmıştır.

Bitkinin öne çıkan kullanım amaçlarına bakıldığında, en başından itibaren antimikrobiyal ve iltihap kurutucu özelliklerinden yararlanıldığı görülmektedir. Yağı cilde sürülerek bu özelliğinden yararlanır. Sindirim sistemi yaralarının iyileştirilmesinde yağının suyla seyreltilip içildiğine ve çayının demlendiğine de rastlanmaktadır. Uçucu yağının aromaterapide ve solunum yolları rahatsızlıklarında kullanımı mümkündür. Önde gelen diğer bir tıbbi etkisi ise doğal bir antidepresan olarak kullanılabilmesidir. Kurutulmuş ekstresi tüketilerek hafif ve orta şiddetli depresyon ile çeşitli nörolojik rahatsızlıkların semptomlarının ortadan kaldırılabilmesine dair çalışmalar mevcuttur.

Birçok şehrimizdeki aktar dükkânlarında sarı kantaron otu ekstresi bulmak mümkündür. Ayrıca hem bu dükkanlarda hem de internet ortamında çeşitli bileşimlere sahip ekstreler de satılmaktadır. Bitkisel ürünlerin yararları bu ürünlerin üretim süreçlerine ve kalitelerine bağlıdır. Ülkemizde ekstrelerin denetimi T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yapılmasına rağmen bazı kayıtsız işletmelerde uygun olmayan koşullarda üretilen maddeler de piyasaya sürülebilmektedir. Çeşitli şehirlerdeki aktarlardan alınan 23 adet ürünün incelendiği bir çalışmada hem içerik açısından hem de ruhsat, kullanım talimatı gibi özellikler bakımından ürünlerin yetersiz olduğu tespit edilmiştir [1]. Özellikle bazı ilaçlarla birlikte alındığında yan etkiler görülebileceğinden piyasadaki ürünlerin belli standartlarda olması gerekmektedir. Diğer yandan gelişmiş yöntemlerle üretilmiş, saf ürünlerin fiyatları yüksektir. Bu yüzden, yüksek kalitede sarı kantaron otu ürünlerinin düşük maliyetle üretilip uygun bir fiyatla satışa sunulması önemlidir.

Tez konusunun sarı kantaron otuyla ilgili olmasının en önemli nedeni bitkinin ülkemizde kolay yetişmesi dolayısıyla birçok bölgemizde görülmesi ve halk tarafından çeşitli tedavi amaçlarıyla kullanılmasıdır. Farklı yöntemlerle üretilip piyasaya sunulan sarı kantaron ürünlerinin içerikleri birbirlerinden farklıdır. Özellikle uygun olmayan koşullarda üretilmiş ekstre ve yağların kullanılması sağlık açısından risk yaratabilmektedir. Ayrıca belli bileşenleri içermeyen ürünlerin de tedavi edici bir özellik göstermeyeceği bilinmektedir. Bu bileşenlerin en önemlilerinden biri antidepresan özelliğiyle öne çıkan hiperisindir. Bitkiden elde edilmiş %95 saflıktaki hiperisinin 04.07.2022 tarihindeki güncel fiyatı 438 EURO/mg'dır [2]. Tez çalışması, ülkemizin bitkisel kaynaklarından biri kullanılarak piyasadaki ürünlere alternatif, kaliteli bir ürün ve bu ürünün değerli bir etken maddesinin üretimini içerdiği için önem arz etmektedir.

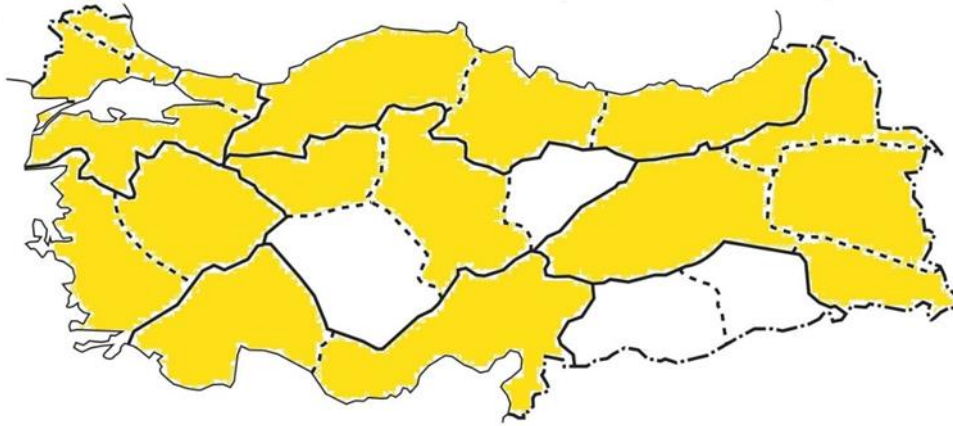


2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. SARI KANTARON OTU

Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre dünyada yetişmekte olan 20 bin kadar bitki türünün 4000 tanesi ticari değere sahiptir. Tüm Avrupa'da 12 bin bitki türü varken ülkemizde 3 bin kadarı aromatik özellikte olan 10 binin üzerinde bitki yetişmektedir. Bunlardan biri de sarı kantaron otudur.

Hypericum perforatum L., Plantae (Bitkiler) âlemi, Magnoliophyta (kapalı tohumlular) bölümü, Magnoliopsida (iki çenekliler) sınıfı, Malpighiales takımı, Hypericaceae (sarı kantarongiller) familyasına ait Türkiye'deki 70-80, dünyadaki 350-400 adet *Hypericum* türünden biridir. Anadolu, Avrupa, Kuzey Afrika, Batı Asya ve Amerika'da doğal olarak yetişirken bazı Avrupa ülkelerinde, Avustralya'da, Çin'de, Kuzey ve Güney Amerika'da kültürel olarak ekilmektedir. Ülkemizin neredeyse tüm kesimlerinde görülmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Sarı kantaron otunun ülkemizde yayılışı [3].

Çalımsı, çok dallı ve çok yıllık bir bitkidir. Yol ve çit kenarlarında, çayırarda, yazın kurak, kışın nemli ve daha çok hafif asidik-nötr topraklarda yetişir. Genellikle 30-60 cm boyundadır fakat Amerika'nın Pasifik kıyılarında 1,5 m'ye kadar uzayabilir. Yaprakları tek, karşılıklı veya spiral şeklinde sıralanabilir. Çiçeğin tomurcuğunda beşer adet çanak ve taç yaprak bulunur. Yaprakları oval şekilde ve çiçekleri parlak sarı renklidir. Güneş gören tepelerde bolca görülebilen bitki yaz aylarında altın renkli taç yapraklarıyla kolaylıkla fark edilir [1], [4]–[8].

Tescilli olarak geliştirilen tiplerden en bilinenleri Almanya’da Authos, Hyperimed, Hyperixtrale ve Motiv, Polonya’da Topaz, Slovakya’da Uperikon, Hypera ve Gold adıyla üretilenlerdir. Dünyada en çok ekimi yapılan tür yüksek hiperisin içeriğinden dolayı Topaz’dır.

Ekonomik getirisi yüksek bir bitkidir. Tohumdan yetiştirilmek istenirse kaliteli bir toprak hazırlanıp dekar başına 50-200 g kadar tohumun sonbaharda ekimi önerilir. Fide ile üretimde, Ekim-Aralık ayları arasında yastıklara tohum ekilip fideler elde edildikten sonra tarlaya aktarılma zamanı Mart-Nisan ayları arasındadır. Vejetatif üretim için ilkbaharda yetişkin bitkinin sürgünlerinden beşer cm gövde çelikleri alınır. Mart-Nisan ayları arasında köklenmiş çelikler tarlaya dikilebilir.

Ülkemizde Ege bölgesinde 65 metre ile 1600 metre arasında bitki görülmüştür. Fakir topraklarda da yetişebilir fakat humuslu ve nötr toprakları daha çok sever. Fosforlu gübreler etken madde oranını arttırırken azotlu gübreler hiperisin oranını azaltır. Azotlu gübrelerin diğer zararlarıysa mantara bağlı bitki hastalıklarını arttırması, çiçeklenmeyi geciktirmesi ve verimi azaltmasıdır. Organik gübre kullanımında gübrelemenin hasattan en az 3 ay önce yapılması veya sarı kantaron otundan önce ekilen bitkiye verilmesi önerilir. Ön bitki olarak en iyi seçim hasattan sonra tarlada kalan kısım hastalık etkeni içermediğinden tahıllardır. Önceden sarı kantaron otu ekilen bir yere tekrar sarı kantaron ekilebilmesi için aradan 4-5 yıl geçmesi önerilir çünkü hastalık bakımından dayanıksızdır.

Tam çiçeklenme döneminde toplanması uygundur. İlk ekim yılında bir kez, ikinci ekim yılında iki kez hasat yapılabilir. Kaliteli bir ürün üstteki 1/3’lük kısımdan alınır. Hasattan sonra yığın hâlinde en fazla 4 saat tutulup kurutma işlemine başlanmalıdır. Kurutma sıcaklığının da sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için 40°C’nin altında olması gerekir [3].

Orta çağdan beri Hipokrat ve Plinius’tan başlayarak birçok botanikçi tarafından bitkinin tıbbi özellikleri kayıt altına alınmıştır. İlk başta öne çıkan özellikleri yaraları iyileştirici, idrar söktürücü ve sırt ağrısını geçirici olmasıdır. John Gerard’ın 1633’te yazdığı The Herball kitabında bitkinin merhem olarak yanıklarda kullanıldığından bahsedilmiştir. Yaygın kullanılan antidepresanlar kadar etkilidir ve doğru kullanımında bunlardan daha az yan etki gösterir. Bitkinin yaz aylarında toplanan toprak üstü kısmı gölgede kurutulur. Dâhilen kullanılmak istenirse su ile kaynatılır. Haricen kullanılacaksa taze veya kuru bitki zeytinyağına yatırılarak birkaç hafta gölgede bekletilir. İçerdiği katı parçalar süzildükten sonra yağı serin ve güneş görmeyen bir yerde bekletilebilir. Yağ, vücuda sürülebilir veya birkaç damla kadar içilebilir.

Çay olarak içilmek istenirse bir miktar taze veya kuru otun üzerine kaynar su dökülerek demlenmesi beklenir [9].

Ülkemizde sarı kantaron otunun ıslahına yönelik tarımsal çalışma yapılmamaktadır fakat ekimi desteklenmektedir. T.C. Fırat Kalkınma Ajansı'nın Eylül 2012 raporunda bitkinin yerel halk tarafından kullanıldığına ve bu konuda sürdürülebilir duyarlılık yaratılması gerektiğine dikkat çekilmiştir [10]. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu Aydın İl Koordinatörlüğü aralarında sarı kantaron otunun da bulunduğu tıbbi ve aromatik bitkilerin yetiştirilmesi konusunda yetiştiricilere en az %50'si hibe olmak üzere maddi destek ve başlıca vergilerden muafiyet verileceğini ilan etmiştir [11].

T. C. Tarım ve Orman Bakanlığı'nın hazırladığı raporda 2020 yılı Çiftçi Kayıt Sistemi'nden aktardığına göre sarı kantaron otu üretici sayısı son yıllarda sürekli artmıştır. 2019 yılında üretime başlayan üreticilerle birlikte sarı kantaron ekim alanı 534 dekaraya ulaşmıştır (Tablo 2.1):

Tablo 2.1: Sarı kantaron otu üretici sayılarıyla bu üreticilerin ektiği alan büyüklükleri [3].

Yıl	Ekim alanı (dekar)	Üretici sayısı
2012	6,45	3
2013	-	5
2014	10,9	6
2015	9,00	10
2016	15,3	12
2017	18,6	14
2018	22,1	16
2019	534	25

Türk Gıda Kodeksi Aroma Vericiler ve Aroma Verme Özelliği Taşıyan Gıda Bileşenleri Yönetmeliği Ek-4 Bölüm-B'de sarı kantaron otuyla ilgili "Bu kaynak materyalden elde edilen aroma vericiler ve aroma verme özelliği taşıyan gıda bileşenleri, sadece alkollü içkilerin üretiminde kullanılır" ibaresi vardır. Farmakope olarak kullanılan referans ise Türk Farmakopesi-II Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu-2016'dır [3].

2.1.1. Kimyasal Bileşimi

1830'da Buchner, *Hypericum perforatum* L.'den elde ettiği kırmızı renkli pigmente hypericumrot (*Hypericum kırmızısı*) adını vermiştir. Hiperisin adı ise 1911'de Cerny tarafından ortaya atılmıştır. Cerny, 1 kg kurutulmuş çiçekten 1,2 g izole ettiği bileşiğin $C_{16}H_{10}O_5$ formülüne sahip olduğunu belirtmiştir. 1927'de antosiyanidin sınıfına ait olduğu sanılan hiperisinin 10-11-dimethyl-1,3,4,6,8,12,-hekzahidroksinaftodiantron ($C_{30}O_{16}O_8$) molekülü olduğu 1953'te Brockmann ve Sanne tarafından anlaşılmıştır. Hiperisinin bitkinin yağına

kırmızı rengi veren madde olduğu ve pigmentlerin mor ötesi-görünür bölge spektrumunda 590 nm’de belirlendiği düşünülürken sonrasında bu renkten [3,||8-biapigenin ve 1,3,6,7-tetrahidroksiksanton’un da sorumlu olabileceği düşünülmüştür [12].

Ülkemizde yaygın görülen, Asya ve Avrupa’da en çok kullanılan tür olan *Hypericum perforatum* L.’nin içerdiği ikincil metabolit çeşitleri diğer *Hypericum* türlerinkinden daha fazladır. Bitkide bulunan başlıca bileşen grupları naftodiantronlar, floroglusinoller, fenilpropanlar, flavonoidler, flavonol glikozidler, biflavonlar, taninler, proantosiyanidinler, ksantonlar, uçucu yağ bileşenleri, aminoasitler ve fenolik asitlerdir. Naftodiantronların yara iyileştirici, flavonoidlerin antienflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir [7], [13].

Bitkiden üretilen yağın bileşimi Tablo 2.2’de verilmiştir:

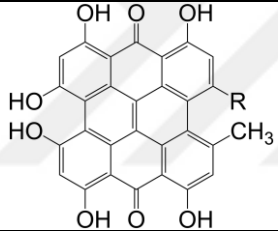
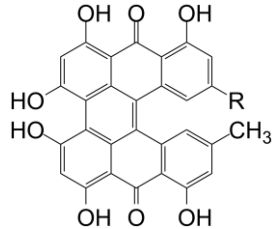
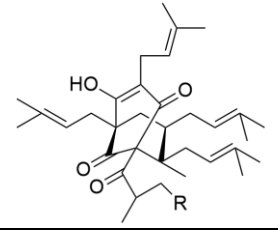
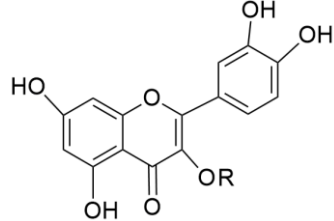
Tablo 2.2: Sarı kantaron otu yağının bileşimi [14].

Bileşenin sınıfı	Taze bitkideki toplam oran (% g/g)	Aktif bileşen	Taze bitkideki oran (% g/g)
Naftodiantronlar	0,03-3 (Çiçekler/tomurcuklar)	Hiperisin	0,09
		Psödohiperisin	0,23
Floroglusinoller	2-5 (Çiçekler/tomurcuklar)	Hiperforin	2,0-4,5
		Adhiperforin	0,2-1,8
Flavanoidler	12 (Yapraklar) 7 (Sap) 2-4 (Tomurcuk)	Kuersetin	2,0
		Hiperozit	0,7
		Kuersitrin	0,5
		İzokuersitrin	0,3
		Rutin	0,3
		Kamferol	İz miktarda
		Mirisetin	İz miktarda
		Amentoflavon	0,01-0,05
		[3, 8-Biapigenin	0,1-0,5
Prosiyanidinler	12 (Vejetatif kısımlar) 8 (Çiçekler/tomurcuklar)	Prosiyanidin	İz miktarda
		Kateşin	İz miktarda
		Epikateşin polimerleri	İz miktarda
Taninler	6-15	Tannik asit	İz miktarda
Uçucu yağ	0,06-1,0 (Çiçekler/yapraklar)	Terpenler, alkoller	İz miktarda
Aminoasitler	0,01	GABA	0,0007
		Sistein	İz miktarda
		Glutamin	İz miktarda
		Lösin	İz miktarda
		Lisin	İz miktarda
		Ornitin	İz miktarda
		Prolin	İz miktarda
		Treonin	İz miktarda
Fenilpropanlar	0,1	Kafeik asit	0,1
		Klorojenik asit	<0,1
Ksantonlar	0,01 (Kökler) 0,0004 (Yaprak/sap)	Kielsorin, Noratiriol	İz miktarda
Diğer suda çözünebilirler	0,5	Organik asitler, peptitler, polisakkaritler	İz miktarda

Yağın içerdiği bileşikler genel olarak hiperisin, psödohiperisin, protohiperisin, protopsödohiperisin, izohiperisin, siklopsödohiperisin, hiperforin, adhiperforin, hiperozit, rutin, kuersitrin, izokuersitrin, kuersetin, biapigenin, amentoflavon, kamferol, luteolin, mirisetin, kateşinler, protosiyanidinler, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, izoferulik asit, p-kumarik asit, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, izovalerianik asit, nikotinik asit, miristik asit, palmitik asit, stearik asit, karotenoidler, nikotinamid, pektin, β -sitosterol, A vitamini, C vitamini, düz zincirli hidrokarbon ve alkoller ile uçucu yağ bileşikleridir [1], [4], [7], [8], [15].

Bitkinin kendine has özelliklerinin oluşmasında tüm bileşenleri etkilidir. Fakat yine de endüstri açısından en çok naftodiantronlar (hiperisin ve türevleri) ile floroglusinoller (hiperforin ve türevleri) öne çıkar. Bunlar dışında antioksidan bileşenlerin de kullanım nedenine bağlı olarak önemi vardır. Sarı kantaron yağının bileşiminde bulunan başlıca bileşenlerin yapıları Tablo 2.3'teki gibidir:

Tablo 2.3: Sarı kantaron yağının başlıca bileşenleri.

	Hiperisin	R = CH ₃
	Psödohiperisin	R = CH ₂ OH
	Protohiperisin	R = CH ₃
	Protopsödohiperisin	R = CH ₂ OH
	Hiperforin	R = H
	Adhiperforin	R = CH ₃
	Rutin	R = Glikoz-Ramnoz
	Hiperozit	R = Galaktoz
	Kuersetin	R = H
	Kuersitrin	R = Ramnoz
	İzokuersitrin	R = Glikoz
	Pentoz	R = Kuersetin-3-O-pentozit

2.1.2. Tıbbi Etkileri

Bitkinin tıbbi etkileri çok çeşitlidir. Daha çok antidepresan ve yara iyileştirici etkileri nedeniyle kullanılır fakat dolaylı olarak da birçok rahatsızlığa iyi gelen yanları vardır. Özellikle nörolojik ve onkolojik rahatsızlıkların tedavisinde farklı açılardan faydaları görülür. Medikal açıdan reçetesiz bir ilaç olsa da son yıllarda hem bir alternatif tedavi yöntemi hem de destekleyici bir tedavi olarak kullanımı oldukça artmıştır.

Stresi, anksiyeteyi ve depresyonu azaltıcı, sindirimi rahatlatıcı, idrar söktürücü, ağrıları hafifletici, damarları daraltarak kanamayı azaltıcı, iltihap oluşmasını önleyici, mantar, mikrop ve bakteri öldürücü etkileri belirlenmiştir.

Bitki, tıbbi amaçla kullanılacaksa en uygun hasat zamanı Temmuz ayıdır. Ülkemizde Haziran ile Eylül ayları arasında toplanmaktadır. Ülkemizin birçok bölgesinde sarı kantaron otu toplanmakta ve içeriğinin bozulmaması için en kısa zamanda kurutulmaktadır. Yağı yapraklarda, çiçeklerde ve dişilik organında bulunabilen salgı kanallarında veya salgı bezlerinde üretilebilir. Yağın miktarı ve bileşimi bitkinin genetik özellikleri, gelişmişlik durumu, hangi bölümünün işlendiği (yaprak, çiçek, gövde...), yetiştiği çevresel koşullar, yağın çıkarılmasında kullanılan yöntem gibi etkenlere bağlı olarak değişebilir.

Sıcaklığın etkisiyle çiçeklenme durur, depo ettiği besini tüketmeye başlayan bitkide biyolojik kütle azalır ve hiperisin oranı artar [16]. Aynı şekilde CO₂ artışı da bu oranı arttırırken bitkinin susuz kalmasıyla hiperisin oranı azalır [17]. Öte yandan fotosentez sonucu oluşan asetat ve malonat, emodin ve protohiperisin yoluyla hiperisin biyosentezinin kaynağını oluşturduğundan, fotosentez hızını azaltan faktörler hiperisin ve türevlerinin oluşumunu da azaltır [18]. Toplam hiperisin içeriğine sıcaklığın etkisinin incelendiği bir çalışmada fotosentez hızının en yüksek olduğu 25°C sıcaklıkta toplam hiperisin oranı bitkide 30 mg'a kadar artarak en yüksek seviyesine ulaşmıştır [19].

FDA'nın besin takviyesi olarak sınıflandırdığı bitkisel ürünlerin üretiminde içerik ve kalite önceden tahmin edilemez. Ekstrelerin içeriği sıcaklıkla, ışıkla, ışık yoğunluğuyla, toprağın besleyici bileşenlerinin miktarıyla veya üretim yöntemiyle değişebilir. O yüzden sarı kantaron ekstrelerinin ve yağlarının bileşimi de birbirinden farklı olabilir. Genel olarak sarı kantaron otu tıbbi preparatlarının içeriğinde %3-5 hiperforin veya %0,3 hiperisin bulunur. Kısa süreli tedavilerde ve devamlı terapilerde yıl boyunca günde üç doz olarak 600-1200 mg'lık ekstreler kullanılır [8]. *H. perforatum* L. üzerinde yapılan çalışmaların sonuçları, bitkinin standardize

ekstresini içeren preparatlarının günlük 500-1000 mg arasında değişen dozlarda alınmasının hafif ve orta şiddetli depresyon tedavisinde faydalı olabileceği yönündedir. Standart doz günde 3 kez %0,3 hiperisin içeren 300 mg ekstre alınmasıdır. Bazı ürünler ise hiperisine göre değil %2-3 oranlarında hiperforine göre standardize edilmiştir [20].

Reçetesiz psikotropik bitkisel ilaçlardan biri olan bitki özellikle depresyon, anksiyete ve insomnianın tedavisinde kullanılır. Bipolar bozukluğa etkisinin incelendiği çalışmalar da vardır [21]. Beyinde oksidatif hasara sebep olan faktörlerin önde gelenlerinden olan kısıtlanma stresine karşı antioksidan ve antidepresan etkilerinin fark yarattığı görülmüştür [22]. Nörolojik koruyucu etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için etkilediği genler belirlenmeye çalışılmıştır [23].

Halk sağlığı açısından sarı kantaron bitkisinin en önemli kullanılma nedenlerinden biri antidepresan etkisidir. 1997'de Almanya'da satılan antidepresan maddelerin dörtte birini bu bitki oluşturmuştur [20]. Hem antidepresan kullanımı hem de sarı kantaron otu gibi antidepresan etki gösteren bitki üretimi ve tüketimi yıldan yıla artmaktadır. Avrupa ülkelerinde depresyon hastalarının en az %40'ı bu bitkiyi tüketmektedir. Sarı kantaron otunun ekstresi plasebo ve yaygın olarak kullanılan antidepresanlara göre daha verimlidir. Orta şiddetli depresyon tedavisinde tedaviyi yarıda bırakma oranının ilaç kullananlara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Günümüzde insanların büyük çoğunluğu ilaç kullanmak yerine bitkisel kaynaklardan yararlanma eğilimindedir [24]. Linde ve diğ. (2008) çalışmasına göre sarı kantaron otu plasebo tedavisinden çok daha verimlidir ve geleneksel olarak kullanılan antidepresanlarla aynı etkiyi daha az yan etkiyle verir [25]. Farelerin merkezi sinir sistemine etkisinin incelendiği bir çalışmada, bitki desipramin ve trimipramin kadar etkili olmuştur [26].

Alzheimer hastalığı gibi nörolojik sorunlara iyi gelen etkileri, anti-MAO-A, anti- α -glukosidaz aktivitesi, antihiperglisemik bileşenleri çalışılmıştır [27]. (+)-Kateşin ve (-)-epikateşin gibi maddeler sayesinde, Alzheimer hastalığının tedavisinden önce kullanımının tedavinin etkisini arttırdığı belirtilmiştir [28]. Nöronal asetilkolin esterase aktivitesini inhibe etmesi hastalığın ortaya çıkardığı semptomların iyileştirilmesinde en çok işe yarayan özelliğidir [29]. Bu hastalığa karşı en faydalı bileşenin ise hiperforin olduğu anlaşılmıştır [30].

Miringoskleroza karşı koruyuculuğu Eğilmez ve diğ. (2015) [31], böbrek iskemi-reperfüzyon hasarını iyileştiriciliği Abolfathi ve diğ. (2011) [32], birinci derece yanıklar, miyalji, akut yaralanmalar ve çürüklerin iyileştirilmesinde etkisi Poppenga (2002) [33], merkezi sinir sistemini koruyuculuğu Altun ve diğ. (2013), Oliveira ve diğ. (2016) ve Paulke ve diğ. (2006)

[34]–[36], bağışıklığı güçlendirici etkisi Sultan ve diğ. (2014) [37] tarafından detaylıca incelenmiştir. Metanollü ekstrelerin asetil ve bütiril kolinesteraz enzimleriyle DPPH, DMPD ve NO gibi serbest radikallerin giderilmesi yoluyla nörokoruyucu etkisi bulunmaktadır [34].

Hiperisinin fotodinamik terapilerde kullanımıyla ilgili de birçok çalışma vardır. Fotodinamik terapi sırasında bitkinin ekstrelerinin veya direkt olarak hiperisinin kullanımı sağlıklı hücrelerin korunup hastalıklı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Hiperisin, C vitaminiyle desteklendiğinde nötrofil solunum patlaması oksidaz enzimini inhibe eder [38] Diğer yandan bitkinin ışığa karşı saf hiperisinden daha düşük hassasiyete sahip olmasının muhtemel sebebi metabolizmada bulunan antioksidanların hücreleri zararlı etkilere karşı korumasıdır [39]. Hiperisinin fotodinamik etkisinin oluşumuyla bazı proteinler arasındaki etkileşim çeşitli açılardan incelenmiştir [40]. Bitki UV ışınlarına bağlı lipid peroksidasyonundan korunmada etkilidir [41]. Hiperisin alımı göz epitel hücrelerini güneş ışığına duyarlı hâle getirir. 0,1-10 μM hiperisin alımı UV-A ve görünür ışıktaki hücrelerin kopup ayrılmasına veya ölümüne neden olur. Bitki tüketildikten sonra güneş ışığına maruz kalınması gözde kataraktogeneze neden olabilir [42]. Maya genleri kullanılarak yürütülen çalışmada bitkinin, hem hücre içi ve hücrelerarası taşınımında hem de sinyal iletiminde iş gören 52 farklı geni etkilediği anlaşılmıştır [43].

Hiperisin, lösemiye ve kanserli hücrelerin mitokondrisini bozması sayesinde katı tümörlere karşı etkilidir. Antineoplastik, antiproliferatif, apoptotik etki gösterir. 0,5 μM hiperisin dozu 1/10000 seyreltilmiş ekstre ile aynı sitotoksik etkiyi göstermiştir. Buna göre, bitkinin başlıca sitotoksik bileşeni hiperisin olup h-TERT mRNA baskılamasını etkileyerek HL-60 hücrelerinin programatik ölümünü başlatmıştır [44]. Tümör oluşumunda etkili olan epidermal büyüme faktörü reseptörleri ile proteinlerin tirozin kalıntıları üzerinden fosforilasyonu, hücre döngüsü ve dönüşümünün kontrolü gibi süreçler üzerinde etkili protein tirozin kinaz aktivitesini doğrudan inhibe etmektedir [45]. Bununla birlikte normal hücrelere yüksek miktarda uygulanması da herhangi bir toksik etki yaratmamaktadır [4]. Hiperisinin kanser hücrelerine yönelik etkileri Agostinis ve diğ. (2002) tarafından bir derleme çalışmasında konu alınırken Theodossiou ve diğ. (2009) de hücre içi etkilerini detaylıca incelemiştir [46], [47].

Hiperisinin obezite, karaciğer yağlanması, tip 2 diyabet gibi durumlarda görülen lipid dzensizliğinin olumsuz sonuçlarını önlemesi ve hiperforinin pankreas β hücreleri üzerindeki uzun süreli koruyucu etkisi sarı kantaron otunun öne çıkan diğer özellikleridir [48], [49].

Bitki hem tedavi edici hem de koruyucu özellikler gösterir. Örneğin, kemoterapötik siklofosfamidin zararlı etkilerine karşı antimutajenik koruma sağlar [50]. Oksitleyici düşük yoğunluklu lipoprotein vücutta aterojenik etki gösterir ve kolesterole bağlı ölümlere neden olabilir. Hiperisin, psödohiperisin ve hiperforin gibi bitkinin lipofilik etken maddeleri sayesinde, sarı kantaron otunun antidepresan ve antioksidan etkileriyle birlikte bu proteini inhibe ederek antiaterojenik fayda da sağladığı tespit edilmiştir [51]. Üçüncü molar diş ameliyatından sonra gargara yerine kullanılabilir [52]. Yaşlanma karşıtı etkisinin anlaşılabilmesi için d-galaktoz'a karşı kullanımı incelenmiştir [53]. Antidepresan etki mekanizmasının, plazmadaki kortikosteron ve proenflamatuar sitokin konsantrasyonlarının azalmasını içerdiği belirlenmiştir [54]. Apoptoza neden olan ve bitkinin Ca^{+2} giriş etkilerini düzenleyen antioksidan aktivitesi, Behçet hastalığına karşı nötrofil hücrelerinde oksidatif stres tedavisinde kullanılabilir [55]. Bitkinin yara iyileştirici etkisinin hiperisin içeriği ile değil, kinoinler, ksantonlar ve flavonoidlerle ilgili olduğu bildirilmiştir [56]. Metanolik sarı kantaron tohumu ekstresinde çok miktarda ksanton olduğu gözlenmiştir. Bu bileşikler ayrıca antioksidan aktivite ve antimikrobiyal etki ile de ilişkilidir [57].

Yanık ve yara tedavisinde sarı kantaron yağının yararları birçok çalışmaya konu olmuştur. Süntar ve diğ. (2010) çalışmasında bu yağın kopma direncini geliştirdiği, dokuda enflamatuvar hücrelerin inhibe olduğu, bağ doku oluşumunun pekiştiği görülmüştür [58]. 2013 yılında yapılan bir çalışmada ise %1'lik gümüş sülfodiazin (Silverdin) ile karşılaştırıldığında subkutan ödem, nekroz, hiperemi varlığının azaldığı, kolajen oluşumu ve PMNL infiltrasyonunun oldukça arttığı ortaya konmuştur [7].

Yapılan araştırmalara göre bitkinin intraperitoneal adezyon oluşumuna [59] ve sigarayı bırakmaya [60] etkisinin olmadığı, ancak antidepresan etkisi sayesinde alkol bağımlılığını azalttığı anlaşılmıştır [61].

Bitkinin başta depresyon olmak üzere farklı hastalıkların tedavisinde kullanımı ve ilaç etkileşimleri hakkında birçok derleme çalışması bulunmaktadır. Bu konu oldukça önemlidir çünkü birçok tıbbi ve aromatik bitkinin olumlu etkilerinin yanı sıra metabolizma üzerinde zararlı etkileri de olabilir. Sarı kantaron otu ekstresi gibi reçetesiz satılan ilaçlar eczacılara danışılmadan kullanılmamalı ve reçeteli ilaçlarla etkileşimlerine azami dikkat gösterilmelidir [62]–[69]. Birçok antidepresan ilaçla etkileşiminin yüksek olmasına ve farklı bitkilerle sinerjik etkileri olmasına rağmen çeşitli bitki çaylarına eklenerek kullanılabilir [70].

Sarı kantaron otunun halk arasında kullanımı birçok incelemede yer almıştır. Bazı yayınlarda kullanım önerileri de yer almaktadır [14], [71]–[77]. Avrupa İlaç Ajansı tarafından hazırlanan rapor ise bitkinin çeşitli tıbbi amaçlarla kullanımına ilişkin dikkate alınması gereken bir çalışmadır [78]. Seyreltilmemiş hiperisin ve hiperforin prooksidan etki gösterirken sulandırıldıkça güçlü bir antioksidan etki göstermeye başlarlar. Elbette vücuda alındığında seyrelmeden kalması mümkün olmadığından prooksidan etki ile karşılaşılmaz ancak aşırı alımı bu açıdan zararlı olabilir. Birçok yayında kullanılması önerilen doz günde üç kez 300 mg ekstre tüketimidir. Bu durumda 1:10-1:20 oranında seyreltilerek yeterli antioksidan etki sağlanır [79].

Bitki sığır yemi olarak tek başına veya başka bitkilerle karıştırılarak kullanılabilir. Yem katkı maddesi olarak kullanıldığında, yerel faydalı mikroorganizmalara zarar vermeden ruminal nitrojen döngüsünü ve uçucu yağ asidi oluşumunu iyileştirir [80]. Atlantik somonu (*Salmo salar*) yemine eklendiğinde bağışıklık sistemini güçlendirir ve kalabalık stresine karşı antioksidan etki gösterir [81].

Bitkinin sulu ekstresinin gümüş nitrat ile hazırlanan çözeltisinden elde edilen antioksidan ve antikanser etkili nano parçacıkların üretimi, farklı alanlarda kullanılabilecek yeni bir trend olarak ortaya çıkmıştır. Tıbbi cihaz kaplamalarında, antibakteriyel ürünlerde, kozmetikte, gıda ve eczacılıkta kullanılabilen bu nano parçacıklar, benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde hem ilaç hem de ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilir [82]. Lipid taşıyıcı nano sistemlerin araştırılması da bir diğer çalışma konusudur [83], [84].

Bitkinin zararlarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Uzun süreli veya yüksek doz kullanımın ciltte ışık hassasiyeti, ödem ve saç dökülmesine neden olduğu bilinmektedir. Antidepresan etkileriyle birlikte kullanan kişiye göre kaşıntı, baş dönmesi, kabızlık, yorgunluk [85], anksiyete, uykusuzluk, huzursuzluk, ishal [86], gastrointestinal rahatsızlık ve ağız kuruluğu [87] gibi yan etkiler de görülebilir. Besin takviyesi olarak kullanılmasının, nükleik asit ve protein olmayan sülfhidrilde azalmaya ve malondialdehitte artışa neden olarak karaciğer ve testis hücrelerinde anomaliler oluşturduğu belirlenmiştir [88].

Diğer antidepresanlar, MAO inhibitörleri, sitokrom P-450 karışık işlevli oksidazlar (MFO), reserpin, narkotikler veya ışığa duyarlılığı artıran maddeler ile alınması, bitkinin normal dozlarından daha yüksek dozlarda tüketimi gibi bir durum yaratır ve rahatsızlıklara neden olur [33], [89], [90]. Etil alkol veya dimetil sülfoksit ile hazırlanan çeşitli sarı kantaron otu ekstraktları CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 sitokrom P-450 enzimlerini önemli

ölçüde inhibe etmiştir. Bu enzim grubu, bazı ilaçların etkili olmadan vücuttan atılmasını ve bazı ilaçların aktif hale getirilmesini sağladığından, ilaç kullanımında bu bitkinin tüketimine daha çok özen gösterilmelidir [66], [87], [91], [92]. Ayrıca bu enzim grubunun 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit (TNBS) koliti, enflamatuvar bağırsak hastalığı ve intestinal serulein kaynaklı pankreas iltihabı üzerinde iyileştirici etkisi vardır [93]–[95].

Aktarlarda satılan ürünlerin incelendiği çalışmalarda birçok ağır metale rastlanmıştır. Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb ve Zn gibi kimyasal elementlerin yüksek seviyede görülmesi kontrol edilmeyen üreticilerin halk sağlığıyla oynadığını göstermiştir [96]–[101]. Bitkinin özellikle üst kısımlarında kadmiyum elementi biriktiğinden kadmiyumca fakir topraklara ekilmesi veya buralardan toplanması tercih edilmelidir. Bitkinin 0,5 mg/kg'dan yüksek kadmiyum içermemesi insan sağlığı açısından önemlidir [3]. Türkiye'den toplanan 23 farklı ev yapımı ve ticari zeytin yağı maseratına bakıldığında bunların bazılarının tağşişe uğradığı belirlenmiştir [102].

2.1.3. Antioksidan Etki

Oksijenli solunum yapan metabolizmalarda hem solunum sisteminin hem de diğer metabolik süreçlerin bir sonucu olarak serbest radikaller oluşur. Metabolizma tarafından üretilen veya dışarıdan alınan serbest radikaller, diğer moleküllerle kimyasal reaksiyonlara giren, eşleşmemiş elektrona sahip kararsız/aktif atom veya moleküllerdir. Metabolizmada reaktif oksijen, azot ve kükürt türlerinin parçaları serbest radikal olarak bulunur. Süperoksit (O_2^-), hidroperoksil (OOH^-), hidroksil (HO^-), alkoksil (RO^-), peroksil (RO_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($1O_2$), ozon (O_3), hipoklorit (ClO^-), hipokloröz asit ($HOCl$), hipobromöz asit ($HOBr$) gibi moleküller reaktif oksijen türlerine örnektir. Nitrat (HNO_3), nitrozil (NO^+), nitroksil (NO^-), diazot tetroksit (N_2O_4), diazot trioksit (N_2O_3), peroksinitrit ($ONOO^-$), alkil peroksinitritler ($ROONO$), peroksi nitrat ($ONOOH$), nitronyum (NO_2^-), nitrik oksit (NO^-), azot dioksit (NO_2^-) gibi moleküller serbest azot türleridir. Serbest oksijen türleriyle tepkimeye giren tiyollerden oluşan serbest radikaller reaktif kükürt türlerini oluşturur.

Serbest radikallerin oluşumu 3 yolla gerçekleşebilir:

- Kovalent bağ içeren bir molekülün homolitik parçalanması sonrası oluşan her parçada ortak elektronlardan biri kalır.



- Bir molekülden bir elektronun kaybı veya heterolitik parçalanma sonucu oluşur.



- Bir moleküle bir elektron katılımıyla oluşur.



Serbest radikal oluşumunu hızlandıran nedenlere bakıldığında günümüzde en çok stres, katkı maddesi içeren gıdalar, ilaçlar, UV ışınları, radyasyon, alkol ve sigara gibi dış etkenlerle yağ oksidasyon reaksiyonları, bağışıklık sistemi reaksiyonları, biyokimyasal reaksiyonlar gibi iç etkenler karşımıza çıkar. Sağlıklı bir vücut açısından serbest radikallerin metabolizmada oluşum ve vücut içi antioksidan mekanizmaları sayesinde kaybolma hızının eşit olma durumuna oksidatif denge denir. Bu denge içerisinde serbest radikaller vücuda zarar vermez ve yerine göre önemli roller oynayabilir. Örneğin, reaktif oksijen türleri hücre içi ve hücreler arası iletişim, gen ekspresyonu, iyon taşınması gibi süreçlerde görev alır. İç ve dış nedenlere bağlı olarak metabolizmada serbest radikal birikimi veya antioksidatif reaksiyonlardaki yetersizlik sonucu denge bozulduğunda oluşan oksidatif gerilime maruz kalan vücutta iltihaba bağlı rahatsızlıklar, kalp yetmezliği ve damar sertliği gibi dolaşım sistemi hastalıkları, böbrek yetmezliği, bronşit ve amfizem gibi solunum sistemi hastalıkları, karaciğer hastalıkları, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif rahatsızlıklar, katarakt, otizm ve yaşlanma gibi durumların gelişimi artar. Bunun önüne geçmek için antioksidan adı verilen moleküllerin elektron alarak veya vererek radikallerin eşleşmemiş yapısını tamamlaması gerekir.

Antioksidanlar yapı ve işlev bakımından çok çeşitlidir. Hızlı etki gösteren antioksidanlar serbest radikallerin yaratacağı hasarları derişimlerine bağlı olarak bir süre geciktirebilir ve var oldukları süre boyunca hasar oluşumunu önler. Geciktirici etkili olanlar ise bu hasarların daha yavaş gerçekleşmesini sağlar. Kendileri yükseltgenip vücuda zararlı reaksiyonların kırılmasını sağlayarak da metabolizmayı koruyan antioksidanların bu etkisi derişimleri kadardır. Ortamdaki antioksidan madde yükseltgendikten sonra oksidatif süreç kendi doğal akışını sürdürür. Bu yüzden antioksidanların güçleri hem birim sayıdaki molekülleri başına indirgeyebildikleri serbest radikal sayısı ile hem de girdikleri reaksiyonların hızlarıyla ilişkilidir. Dolayısıyla herhangi bir antioksidanın ne kadar aktif olduğunu belirlemek için onun radikal süpürme yeteneği, redoks reaktivitesi, metal şelatlama yeteneği ve aynı ortamda bulundukları diğer antioksidan maddelerle aralarındaki etkileşimin incelenmesi gerekir [103].

Endojen antioksidanlar metabolizma tarafından üretilen maddelerdir. Çoğunlukla kompleks yapıya sahip olan bu maddelerin bir kısmı çeşitli enzimlerdir. Örneğin, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin bakır ve çinko içeren formu (Cu/Zn SOD) sitozolde, mangan içeren formu (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler formu (EC SOD) hücre dışı sıvılarda süperoksit radikalının aşağıdaki reaksiyon sayesinde hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar:



Burada açığa çıkan hidrojen peroksit daha çok peroksisom organelinde ve biraz da katalaz (CAT) enzimi tarafından mitokondride parçalanır:



Sitoplazmada bulunarak hidrojen peroksidin hidroksil iyonuna dönüşümünü engelleyen enzim glutatyon peroksidaz (GPx) enziminin özellikle selenyum bağımlı (Se-GPx) formudur. Selenyum bağımlı olmayan formu (GST) ise daha çok organik peroksitlerin (ROOH) metabolize edilmesinde iş görür. GPx reaksiyonu sırasında elektron kaynağı olarak glutatyon kullanıldığından reaksiyon sonucu glutatyon disülfid (GSSG) oluşur:



Oluşan GSSG, glutatyon redüktaz (GR) enziminin etkisiyle indirgenerek glutatyon hâline geri döner:



Enzimatik olmayan endojen antioksidanlardan metabolizmada en çok bulunanı glutatyon olup bunun da tamamına yakını sitoplazmada bulunur. Glutamin, sistein ve glisin moleküllerinin enzimatik dönüşümüyle oluşan glutatyon, hidrojen peroksit, hidroksil ve singlet oksijen radikallerinin gideriminin yanı sıra hücre duvarından aminoasit geçişi yoluyla C ve E vitaminlerinin oluşumunu sağlar.

Epifiz bezinden salgılanan melatonin, metabolizmada birçok serbest radikalın parçalanmasını sağlar. Hidroksil, hidrojen peroksit, singlet oksijen, nitrat, peroksinitrit, peroksinitrat gibi radikaller ve reaktif türlerin gideriminde görev alırken bir yandan da yukarıda adı geçen enzimlerin uyarılmasını ve yeterli seviyede tutulmasını sağlar. Hücre duvarını hasarlara karşı sağlamlaştırır, elektron taşıma sistemini güçlendirerek serbest radikal oluşumunu azaltır.

Metabolizmanın oluşturduğu atıklardan biri olan ürik asit varlığı kanın antioksidan kapasitesinin yaklaşık yarısını sağlar. Süperoksit, hidroksil, singlet oksijen, peroksinitrit ve peroksinitratın giderimiyle birlikte Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin iyonlarını şelatlaştırır ve bunların serbest radikal oluşumuna katılımını önler.

Bilirubin molekülü metabolizma gereği yıkıma uğrayan eritrositlerde bulunan demirli-porfirin proteinlerinin parçalanmasıyla meydana gelir. Dolaşım sistemine katıldıktan sonra karaciğer tarafından tutulup parçalanan bilirubin, peroksil radikallerinin oluşumunu önleyici etkinlik gösterir.

Plazmada bulunan albümin molekülünün en önemli görevi ozmotik basıncın ayarlanmasıdır. Antioksidan etkisi ise beyaz kan hücrelerinin metabolizma gereği salgıladığı miyeloperoksidaz enziminin etkisiyle oluşan hipokloratın giderilmesi şeklindedir. Böylece hipokloratın, zarar alması durumunda özellikle akciğer ve karaciğer dokularında hasar oluşumu görülen α -antiproteaz enzimine olumsuz etkisi önlenmiş olur.

Koenzim Q10, solunum sistemi için enerji üretiminde görev alan bir molekül olup hem kendisi hem de indirgenmiş formu olan ubikinol antioksidan etki gösterir. Kendisi serbest radikal gideriminde, lipid ve protein peroksidasyonunun baskılanmasında, ubikinol ise elektron taşıma sisteminin güçlendirilmesinde ve oksidan moleküllerinin nötralizasyonunda aktiftir.

α -Lipoik asit hidroksil, singlet oksijen, nitrik oksit, hipoklorat, hidrojen peroksit ve peroksinitriti, bunun indirgenmiş formu olan dihidro lipoik asit ise singlet oksijen dışında bunları, süperoksit ve peroksil moleküllerini süpüren güçlü antioksidan maddelerdir.

Seruloprotein metabolizmada Cu taşınımı ve kullanımında görev almakla birlikte ferroksidaz ve SOD antioksidan enzimleri gibi bir yolla eritrosit yapılarını serbest radikallerden korur.

Transferin Fe^{+2} iyonunun metabolizmada serbest dolaşan derişimini baskılar ve bu iyonun katkısıyla gerçekleşip hidrojen peroksidi daha zararlı bir reaktif yapı olan hidroksile dönüştüren Fenton reaksiyonunu önler.

Vücutta üretilemeyen eksojen antioksidanlar vitamin veya ilaç olarak dışarıdan alınır. E vitamininin α , β , γ , δ tokoferol, α , β , γ ve δ tokotrienol izomerlerinden insanlarda en çok bulunan ve en güçlü antioksidan etkiye sahip olanı α -tokoferol formudur. Başlıca etkisi dokularda lipid peroksidasyonu kaynaklı hasarları önlemektir. Serbest radikallerin süpürülmesi, daha zararlı

yapılara dönüşümünün önlenmesi, doku hasarlarının iyileştirilmesi gibi çeşitli alanlarda çalışarak metabolizmanın antioksidan kapasitesine önemli oranda katkıda bulunur.

C vitamini, süperoksit, singlet oksijen, ozon, hidroperoksil, peroksinitrit, azot dioksit ve hipokloröz asit moleküllerinin süpürülmesi ve α -tokoferoksilden α -tokoferolün yeniden üretimi gibi antioksidan etkilerinin yanı sıra Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşümünü sağlayarak oksidan bir etki de gösterir.

Karotenoidler, doğada daha çok bitkilerin klorofillerle birlikte renk verici bileşenleri olarak bilinirler. Bitkilerin dışında fotosentez yapmayan bazı organizmalarda da üretilirler ve karotenoidlerin toplam sayısı yüzlercedir. Bunların β -karoten gibi bazıları özellikle A vitamininin öncülü olarak görev alırken lutein ve likopen gibi bol bulunan bazı karotenoidler provitamin olarak görev almazlar. Karotenoidler singlet oksijen başta olmak üzere serbest radikallerin süpürülmesinde etkilidirler.

B9 vitamini (folik asit), metabolizmada kan hücrelerinin üretimi ve doğurganlık bakımından öneminin yanında hem C ve E vitaminlerine yardımcı olması hem de serbest radikallere karşı etkisiyle güçlü bir antioksidandır [104].

Polifenoller serbest radikallerin oluşumunun önlenmesi ve süpürülmesi, lipid oksidasyonunun kırılması, başta Fe^{+2} olmak üzere metal iyonlarının şelatlanması gibi etkilerde bulunan çok geniş bir bileşik sınıfıdır. Fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanları içerir fakat antioksidan özellikleri bakımından literatürde ilk ikisiyle karşılaştırılır.

Fenolik asitler doğada daha çok amidler, esterler ve glikozitlerle bağlı bulunur ve fenil propanoid adıyla da bilinir. Hidroksi benzoik ve çoğunlukla hidroksi sinamik asit şeklinde iki gruba ayrılırlar. Yapısal farklılıkları dikkate alınarak p-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik, klorojenik, gallik, vanilik, şiringik, protokateşuik asit gibi adlarla tanımlanan bileşikler mevcuttur. Hidroksi sinamik asitlerin H verebilme kapasitesi daha yüksek olup hidroksi benzoik asitlerden daha kararlı yapıdadırlar. Hidroksi benzoik asitler ise OH almaya eğilimli, güçlü hidroksil süpürücülerdir.

Flavonoidler arasında en bilinen ve en çok bulunan yapılar kateşin, hesperidin, siyanidin, proantosiyanidin, kuersetin ve bunların türevleridir. Doğada bulunan 4000'den fazla flavonoid molekülü iki aromatik ve bir hetero halkasına sahiptir ve bu halkaların gösterdiği farklılıklarla

çeşitli gruplara ayrılırlar: Flavonlar, flavonoller, flavanoller, flavanonlar, izoflavonlar, antosiyanidinler.

Yapısal olarak flavonoidler sınıfında yer alan kateşinlerin başta gelen molekülleri kateşin, epikateşin ve gallat epikateşindir. Serbest radikallerin süpürülmesinde, metal iyonlarının şelatlanmasında, lipid oksidasyon zincirinin kırılmasında, antioksidan enzimlerin oluşumu ve prooksidan enzimlerin baskılanmasında etkileri vardır [105].

Selenyum, glutatyon peroksidaz enzimi, selenoprotein P ve W proteinlerinin yapısında yer alarak antioksidasyon süreçlerine katkı sağlar [106]. Çinko, enzimlerin çalışmasında ve genetik yapının bütünlüğünün korunmasında görev alan bir diğer elementtir. Singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil reaktiflerinin vereceği zararlara karşı koruma sağlar [107]. Mangan, çeşitli enzim, protein ve vitaminlerin oluşum ve çalışma süreçleriyle SOD enziminin yapısında yer alarak antioksidan mekanizmasına katkıda bulunur [108]. Bakır hem çinkoyla birlikte SOD gibi enzimlerin yapısına katılarak hem de metabolizmada aldığı diğer görevlerle serbest radikallere karşı direnç sağlayan elementlerden biridir [109].

Bir antioksidan maddenin aktivitesi onun serbest radikal tutuculuk/gidericilik potansiyeli demektir. Bu da radikal süpürücülük, hidrojen atomu veya elektron alışverişine gösterdiği ilgi, metal şelatlama potansiyeli ve diğer antioksidanlarla olan etkileşimine bakılarak ölçülür. Yapısal olarak aktivite hidroksil gruplarının sayısına ve konumuna, şeker yapısının ve metoksi gruplarının varlığına bağlı olarak değişir.

Bir maddenin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin temelinde örneğin içerdiği tüm antioksidanların tükenmesi için gerekli sürenin ölçülmesi, belirli bir antioksidanın serbest radikal içeren ortama eklenmesi ve tükenen serbest radikal miktarının ölçülmesi ya da belirli bir serbest radikalın reaksiyon hızının tespit edilmesi ve antioksidan eklenen ortamda hız düşüşünün ölçülmesi gibi prensipler yatar.

Antioksidan içeriğinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler ya elektron aktarımına ya da hidrojen atomu aktarımına dayalıdır. Elektron aktarımı temelli yöntemlerde antioksidanla serbest radikal arasındaki etkileşim renk değişimi ölçülerek belirlenir. Bunlardan en çok bilinenleri Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde tayini, troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi, demir iyonu indirgeyici antioksidan gücü, oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyeli ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil yöntemleridir. Hidrojen aktarımı temelli

yöntemlerin çoğu ise azo bileşiklerinin bozulma ürünlerinden peroksil radikallerine karşı antioksidan ve substrat reaktivitesinin karşılaştırılmasını kullanır. Bu yöntemlerin en bilinenleri oksijen radikal yakalayıcı antioksidan parametre, toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre ve krosin beyazlatma yöntemleridir.

Hidrojen aktarımına dayanan yöntemlerde yapay bir serbest radikal üretici, yükseltgenebilir moleküler prob ve antioksidan bileşik kullanılır. Başlatıcıdan elde edilen peroksil radikali için antioksidan ve ortamdaki substrat yarışır. Radikalin antioksidandan aldığı hidrojen atomları sayesinde radikalle substrat arasındaki reaksiyon geciktirilir.

2.1.3.1. Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi

Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC) ile hedef molekülün peroksil radikali tarafından oksitlenmesi sürecinde ortamdaki antioksidan tarafından ne derecede korunduğu ölçülür. Radikal üretici olarak 2,2-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) kullanılır. Floresans veya absorbans ölçümü yapılarak bozunma kinetiği eğrisinin altındaki alanın değişimi ölçülerek antioksidan aktivitesi hesaplanır. İlk zamanlarda hedef molekül olarak β -fikoeritrin kullanılırken sonrasında floressein kullanımı tercih edilmeye başlanmıştır. Antioksidan aktivitesinin yüksekliği karşısında spektrofotometrik ölçümlerin doğruluğunun düşük olması nedeniyle pirogalol kırmızısı kullanımı önerilmiştir. Bu bileşik kullanılarak yapılan çalışmalarda ölçümlerin, bileşiklerin reaktivitesini daha iyi yansıttığı ve floresans yerine görünür bölge spektrofotometresi uygulamasının daha kolay gerçekleştirildiği anlaşılmıştır. İçinde antioksidan bileşik olmayan örneğin spektrofotometrik eğrisinin altında kalan alan ile içinde antioksidan bileşik bulunan örneğin eğrisinin altındaki alan arasındaki fark antioksidan kapasitesini verir [110].

2.1.3.2. Toplam radikal yakalayıcı parametre

Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre (TRAP) yönteminde, bir azo bileşik sıcaklıkla bozunurken sağlanan lipit peroksidasyonu sırasında gerçekleşen oksijen tüketimi ölçülür. ORAC'ta olduğu gibi AAPH eklenen ortamdaki oksidasyon süreci antioksidanlarca yavaşlatılır. Floresan prob olarak R-fikoeritrin kullanılan yöntem ile suda çözünebilen peroksil radikalleri ve lipit peroksidasyonu ile ilgili antioksidanların aktivitesi 565 nm'de ölçülebilir. Öte yandan, oksijen elektrotunun stabilite zorluğu, uzun ve emek gerektiren bir süreç olması gibi dezavantajları vardır [111].

2.1.3.3. Krosin beyazlatma yöntemi

Benzer şekilde Krosin Beyazlatma Yöntemi'nde de azo yapılı AAPH molekülünün sıcaklıkla bozunması sonucu oluşan peroksil radikalleri kullanılır. Bu radikaller, bir karotenoid olan ve ortama fosfat tamponu içinde eklenen krosini oksidasyona uğrattırırken ortamın rengi beyazlaşır. Ortamdaki antioksidanlar beyazlaşmayı engeller. 443 nm'de yapılan ölçüm antioksidan derişimine duyarlı değildir. Yöntemin bir diğer dezavantajı ise krosinin safrandan elde edilen doğal pigmentlerin bir karışımı olması ve bileşiminin değişiklik göstermesidir [111].

2.1.3.4. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi

Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi (TEAC) yönteminde kısa adı troloks olan ve E vitamininin suda çözünen bir analogu olan ($\pm$)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit molekülü standart olarak kullanılır. Bu yöntemde radikal üretici olarak ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)) kullanıldığından ABTS yöntemi olarak diye de bilinir. Radikalin farklı çözücülerde çözünür olması sayesinde hidrofilik ve hidrofobik antioksidanlar ölçülebilir. Orijinal yöntemde ABTS⁺ radikalinin oluşabilmesi için ortama metilmiyoglobin katılması gerekir ve bu madde de antioksidanlar tarafından indirgenebilir. Bu yüzden yöntemin gelişmiş versiyonunda, ortama antioksidan katılmadan önce ABTS potasyum persülfat ile tepkimeye sokularak radikalin oluşumu sağlanır ve yöntem 743 nm'de ölçülebilen bir renk giderimi şeklinde uygulanabilir hâle getirilmiş olur. Yöntemin bunun dışında da versiyonları bulunmaktadır.

2.1.3.5. Bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi

CuCl₂ ile neokuproin molekülünün oluşturduğu şelatın indirgenerek kromojenik bir yapıya dönüşümü ile antioksidan kapasitesinin ölçülebilmesinin keşfi ile birlikte en çok kullanılan yöntemlerden biri hâline gelen Bakır İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) yöntemi kolay uygulanabilir, hidrofilik ve hidrofobik antioksidanlara uygun ve düşük maliyetli oluşu ile öne çıkar. Ölçüm 450 nm'de gerçekleştirilir.

2.1.3.6. DPPH radikal süpürücü antioksidan kapasitesi

DPPH Radikal Süpürücü Antioksidan Kapasitesi yönteminde radikal üretici olarak DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) kullanılır. Başlangıçta menekşe rengine sahip olan çözelti, antioksidan maddelerin H⁺ vermesiyle indirgenir ve rengini kaybeder. Rengin açılmasının ardından yapılan 517 nm'deki ölçüm ile antioksidan kapasitesi hesaplanır. DPPH yönteminde çoğu zaman antioksidan etkinliği, DPPH radikalinin derişimini yarıya düşürecek antioksidan derişimini bulmakla hesaplanır. Organizmada lipit peroksidasyonuna yol açan peroksil radikallerini hızlı bir şekilde gideren birçok antioksidan madde DPPH ile yavaş tepkimeye girer. Bu nedenle

antioksidan kapasitesinin bu yöntemle ölçümü bazı şüphelere neden olabilir. DPPH radikali ile antioksidanlar arasında gerçekleşen tepkimelerin kinetiğinin DPPH derişimiyle doğrusal bir şekilde değişmemesi de bu yöntemi dezavantajlı kılan bir diğer noktadır [110].

2.1.3.7. Demir (III) indirgeme antioksidan gücü

Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü (FRAP) yönteminde demir(III)-tripridiltiazin (Fe^{+3} -TPTZ) şelatı pH=3,6 iken bir antioksidanla tepkimeye girerse güçlü bir mavi renge sahip olan Fe^{+2} -TPTZ yapısına indirgenir. 593 nm’de ölçüm yapılarak belirlenen antioksidan kapasitesi ile ilgili bazı çelişkili durumlar dikkat çeker. 1 mol demir(III)’ün demir(II)’ye indirgenmesi üzerinden demir(II) eşdeğer indirgen kapasite ölçümü yapılır. Fakat bu eşdeğerlik benzer elektron vericiliğine sahip standart antioksidanlar için farklılık gösterebilir. Orijinal yöntemin sonlandırıldığı süreden sonra da yavaş bir şekilde tepkimelerin gerçekleşmesi ve yöntemin uygulandığı pH’ta redoksa uğramayan antioksidanların bulunması da soru işareti yaratır [112].

2.1.3.8. Toplam fenolik madde içeriği

Folin-Ciocalteu yöntemi olarak da bilinen bu yöntemde reaktif olarak kullanılan fosfomolibdat-fosfotungstat karışımının fenolik maddelerce oksidasyona uğramasını önleyici aktivite gösteren antioksidanların kapasitesi ölçülür. Yöntem, çeşitli alanlarda farklı şekillerde uygulanabilmekle birlikte reaktifin sadece fenolik maddelerce indirgenmeyeceği, bu yüzden sadece fenolik madde içeriğini değil toplam indirgeme kapasitesini ölçtüğü ile ilgili tartışmalar mevcuttur [110].

Sarı kantaron otunun naftodiantron ve floroglusinol sınıfından olanlar gibi bileşenleri tıbbi açıdan direkt etkilere sahiptir. Diğer bileşenleri ise sağlığa farklı açılardan ve dolaylı olarak katkıda bulunur. Antioksidan bileşenleri bunlara örnek verilebilir. Antioksidan maddeler vücutta oluşan reaktif oksijen türleri gibi serbest radikallere karşı metabolizmayı korurlar. Bu sayede kanser gibi birçok hastalığın oluşumu önlenir ve bağışıklık güçlü tutulur.

Bitkinin antioksidan etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalar oldukça fazladır. Balkanlar’da yetişen sarı kantaron otunun metanollü ekstrelerine ait toplam antioksidan kapasitesi tüm bitkide 1560 ± 95 , saplarda 3630 ± 83 , yapraklarda 5430 ± 55 ve çiçeklerde 73100 ± 49 $\mu\text{mol/g}$ α -tokoferol asetat/ekstre olarak ölçülmüştür. Yapraklardaki (%7,4) ve çiçeklerdeki (%11,7) flavonoid içeriği ile antioksidan etki arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur [113]. Bulgaristan’da halk arasında kullanılan çeşitli bitkilerin sulu ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada da sarı kantaronun antioksidan kapasitesi değeri troloks eşdeğeri cinsinden $3,74 \pm 0,14$ mM, toplam fenolik madde miktarı ise kuersetin eşdeğeri olarak

881,93±6,68 µM olarak bulunmuş ve çalışmadaki en yüksek antioksidan kapasitesine sahip bitkilerden biri olduğu belirtilmiştir [1].

İkincil metabolitler bitkilerin biyotik ve abiyotik stres faktörlerine cevap olarak ürettikleri kimyasallardır. Su, ışık, sıcaklık, CO₂, azot varlığı, topraktaki besleyici maddeler, coğrafi çevre, genetik özellikler, hasat zamanı, kirleticiler, elisitörler, zararlı mikroorganizmalar, otoburlar bu faktörlerden bazılarıdır [58]. Bitkinin yetiştirildiği koşulların düzenlenmesiyle kimyasal bileşenlerinin çeşitliliği ve oranları da değiştirilebilir [114]. Bu da tarımsal üretimin belli amaçlara yönelik yapılabilmesine olanak tanır. Örneğin, Mir ve diğ. (2019) güçlü bir radikal süpürücü üretmek üzere çalışma koşullarını düzenlemiştir [115]. Özel amaçlı bitki tasarımı bir örnek çalışma da Pan ve diğ. (2005) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada bitkinin hipokotil kısımlarından alınan kalluslardan izole edilen protoplast, bitkinin rejenerasyonunda kullanılmıştır [116]. Ciccarelli ve diğ (2001) sarı kantaronun salgı kanallarıyla saydam yağ bezelerindeki sıvıları inceleyerek farklı kısımlardaki kanal ve bezelerin salgılarındaki bileşenleri sınıflandırmıştır [117].

Sıcak ve ışıklı ortamlarda biyoaktif bileşenlerin oranı artar. Vejetasyon ve çiçeklenme aşamalarında fenolik ve flavonoid maddeler artar. Hiperisin oranı da sıcaklığın ve ışığın arttığı durumda artar fakat çiçeklenme aşamasına girildiğinde azalmaya başlar [118]. Rutin tomurcuklanma, kuersitrin, kuersetin ve [3, ||8-biapigenin ise tam çiçeklenme aşamasında en yüksek değerdedir. Bu süreçte hiperozit oranı değişmez [119]. Yaz sonunda doğadan toplanan taze bitkiler, diğer örneklerle göre daha yüksek flavanol içerir. Kurutmanın ve ekstraksiyonun ışıktaki yürütülmesi aktif bileşenlerin oranlarını düşürür [120]. Bitki hidroksil radikalinden çok hidrojen peroksite karşı etkilidir [121].

H. perforatum L. subsp. *perforatum* alttürünün flavonoid, tanen, fenolik madde içeriği *angustifolium* alttürüne göre daha yüksektir. Ayrıca rutin içeren tek alttür olarak tespit edilmiştir [122]. Farklı alttürlerin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada *veronense* alttüründe, *perforatum* alttüründen daha yüksek hiperisin, hiperforin ve fenolik madde bulunmuştur [123]. Radulovic ve diğ. (2007), 9 *Hypericum* türünü incelediğinde 73100 µmol α-tokoferol asetat/g ekstre ile en yüksek antioksidan kapasitesini *perforatum* türünde bulmuştur. Çiçeklerde, yaprak ve gövde kısımlarından daha yüksek kapasite görülmesinin nedeni olarak flavonoid içeriğinin yüksekliğini öne sürmüşlerdir [113]. Maltaş Çağıl ve diğ. (2013) ise bu çalışmada yer almayan iki (*salsugineum* ve *aviculariifolium*) türün antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde içeriği

ve demir şelatlama gücünü *H. perforatum* L.'den daha yüksek bulmuş, bakır şelatlama gücü ve toplam flavonoid içeriğini ise benzer seviyede tespit etmiştir [124]. Kladar ve diğ (2015) de çeşitli *Hypericum* türlerinin kimyasal içeriklerini ve biyolojik aktivitelerini derlemiştir [125].

Bitkinin antioksidan etkisinden yararlanılmak istendiğinde 80-100°C'de 5-10 dk demlemenin en iyi yöntem olduğu belirtilmiştir. Çayın kırmızı renk aldığı 3 dakikalık süre naftodiantronların görülebilmesi için yetersiz kalmıştır. 3 dakikadan sonra fenolik ve klorojenik asitler de önemli derecede artmaktadır [126]. 20 dakikaya kadar süren kaynatma sırasında biyoaktif maddelerin miktarı artarken demleme süresinin daha da artması kaliteyi azaltır. Kaynatmak demlemekten daha iyi bir yöntem olup antioksidan içeriği bakımından iki kata kadar daha aktif ürün vermektedir [127].

Bu maseratların raf ömrü ve kalitesi incelendiğinde ise palm yağı maseratı renk, koku, rölatif yoğunluk ve asit sayısı açısından kalitesiz bir ürün olmuştur. Maseratlara BHA ve α -tokoferol katkısının raf ömrünü 6 aydan 12 aya kadar çıkardığı görülmüştür [128]. Zeytin yağı maseratının toplam flavonoid içeriği ve raf ömrü açısından kalitesi Şahin ve diğ. (2020) tarafından da tespit edilmiştir [8]. Metanolle elde edilen ürünler hiperisin ve hiperforin açısından zenginken sulu çözeltilerin antioksidan etkisi daha güçlüdür [129]. Kateşin, epikateşin, protokateşik asit, gallik asit, kuersetin ve kamferolce zengin ürünler kolon kanseri hücrelerine karşı en etkili ürünlerdir [95], [130], [131]. Bitkinin biyolojik aktivitesini oluşturan antioksidan içeriği [132]–[135], toplam klorofil, toplam karotenoid ve fenolik bileşikler [70], [136], polisakkaritleri [137], ksanton içeriği [138] çalışılmıştır.

2.1.4. Antimikrobiyal Etki

Sarı kantaron otunun öne çıkan özelliklerinden biri de antibakteriyel ve antimikrobiyal etkili olmasıdır [139]. Bu etkileri, özellikle yara iyileştirici ve iltihap kurutucu etkileriyle birlikte daha da değer kazanır. In vivo ve in vitro yapılan çok sayıda çalışmayla bitkinin mikroorganizmaları inhibisyon oranları incelenmiştir [113], [122].

En bilinen mikroorganizmalara karşı davranışı düşünüldüğünde *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* için çiçekler, *Aspergillus niger* için yapraklar daha etkilidir. Gram-pozitif bakterileri, gram-negatif bakterilere göre daha iyi durdurmaktadır [124]. Poliüretan köpüklerle birlikte kullanımından üretilen biyofilmin *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı etkisi *Candida albicans* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı gösterdiği etkiden daha yüksek

olmuştur [140], [141]. Yine *Staphylococcus aureus*'a karşı etkisinin incelendiği bir çalışmada metanolle ve kaynar suyla hazırlanan ekstreler, sıvı ticari etanolik ekstreya, ticari tablet ürünün metanolik çözeltisine, ayçiçeği yağı, zeytin yağı ve iki içeriği bilinmeyen bitkisel yağa göre daha yararlı olmuştur [142]. Kitosan ve jelatinden yapılan biyofilm ise *Salmonella typhi*'ye karşı, *Staphylococcus aureus*'tan daha etkili olmuştur [143].

Staphylococcus aureus, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Moraxella catarrhalis*, *Lactobacillus* ve *Helicobakter pilori* bakterilerine karşı etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır [1], [4], [6], [7], [144], [145].

Sarı kantaron yağı katkısıyla üretilen biyofilmlerin fiziksel özellikleri (pH, su geçirgenliği [143]), mekanik testler, şişme davranışı, yüzey hidrofobikliği [141], su aktivitesi testi, LF-NMR analizi, doku analizi ve L*-a*-b* renk testi [146] gibi) çeşitli çalışmalarda incelenmiş ve literatüre eklenmiştir. Buhar geçirgenliği, gerilme oranı ve çekme gerilimi yağ katılan filmlerde daha fazla olsa da yağ miktarı arttığında bu özellikler azalmıştır [141].

2.1.5. Uçucu Yağ İçeriği

Esansiyel yağ, esans, eterik yağ, aromatik yağ gibi adlarla da bilinen uçucu yağlar bitkilerin özellikle gıda, kozmetik, eczacılık gibi sanayilerde kullanılan ürünlerinden biridir. Sabit yağlardan farklı olmakla birlikte su ile karışmadıkları için yağ adıyla anılırlar. Özetle bileşenlerinin gliseritlerin esterleri olmaması, kaynama sıcaklıklarının çok daha düşük olması ve üretim yöntemlerinin farklılıkları nedeniyle diğer bitkisel yağlardan ayrılırlar.

Terpenler, terpenoidler, fenolik ve alifatik terpen türevlerinden oluşan uçucu yağlar bitkilerin yaprak (nane, defne), çiçek (gül, yasemin), meyve (turunçgiller, çilek), kök (zencefil), tohum (biber, anason), kabuk veya gövde (tarçın) gibi kısımlarından veya tümünden (lavanta, kekik) elde edilebilir [147].

Doğu ve batıda neredeyse tüm uygarlıklarda uçucu yağlar kullanılmıştır. Uçucu yağlar kullanılarak elde edilen aroma, tütsü ve merhem gibi ürünler özellikle antimikrobiyal ve iltihap kurutucu özellikleri ile koku, tat gibi fiziksel özelliklerinden dolayı kullanılmıştır. 20. yüzyılın başlarından itibaren geliştirilen aromaterapi alanında uçucu yağların elde edilmesi ve kullanılması konularında çalışılır. Başta gıda, parfümeri, kozmetik, temizlik ve eczacılık olmak üzere çok çeşitli alanlarda kullanılan uçucu yağların günümüzde tekstil ve boya gibi alanlardaki

nanoteknolojik çalışmalarda veya hayvancılık gibi alanlardaki verim arttırıcı çalışmalarda da yer bulduğu görülmektedir [148].

Zararlı kimyasallar kullanmadan böcekleri uzak tutmanın yollarından biri uçucu yağlardan yararlanılmasıdır. Birçok böceksavar sprey ve losyon gibi ürün terpenik bileşikler içerir. Bu bileşenler ya doğal ya da doğala özdeş olarak FDA tarafından GRAS (Generally Regards As Safe, genel olarak güvenilir kabul edilir) olarak belirlenen maddelerdir. Limonen, geraniyol, öjenol, mirisen gibi terpenlerin bu amaçla kullanımı bulunmaktadır. Limon otundan elde edilen bir terpen aldehit olan sitral de böcek, bakteri ve mantarlara karşı etkili diğer bir uçucu yağ bileşenidir.

Uçucu yağların geleneksel ve modern kullanım amaçlarından biri de antimikrobiyal etkisinden yararlanılmasıdır. Çamgiller, adaçayı, biberiye, kimyon, karanfil, kekik, altın otu gibi birçok bitkinin uçucu yağı bu amaçla kullanılabilir. Çam türlerinin kabuk yaralanmalarından sonra dokularından sızan reçineler ve arıların peteklerinde kullandıkları propolis de böyle büyük terpenik bileşikler içerir.

Uçucu yağların özelliklerinden en çok yararlanılan kullanım yöntemi solunum yoluyla alınmasıdır. Fototoksik olmayan ürünler cilde sürülerek kullanılabilir. Az da olsa suya damlatılarak içilmesi şeklinde kullanımı da görülmektedir.

Bitki türü, mevsim, coğrafi özellikler, kullanılan kısım, kullanılan yöntem gibi etkenler uçucu yağın verimini ve bileşimini değiştirir. Bu nedenle her bir bitki örneğinin kendine özgü olduğu söylenebilir. Bununla birlikte bitki türlerinin yaklaşık olarak verimi ve bileşen sayısı bellidir. Kimi bitkinin bileşen sayısı onlarca iken kimininki yüzlercedir. Bu durum uçucu yağları karmaşık yapılı gibi gösterse de belli bileşen sınıflarını içerdiği için basit yapılı oldukları da düşünülebilir [149]–[152]. Çok sayıda izomerik molekül vardır. Bunların bazıları birbirine benzer olduğu için Yunan harfleriyle veya cis-trans şeklinde adlandırılırken çok kullanılan bazıları da özel isimlerle anılır. Örneğin cis-sitral geraniyal, trans-sitral neral olarak bilinir.

Çoğu saydam ile sarı arası açık renklidir. Suyu yakın özgül ağırlıklara sahip olduklarından su buharıyla kolayca sürüklenebilirler. Isı ve nem gibi etkenlerle kolayca kristalleşebilir ve bozulurlar. Kırılma indisleri ve buhar basınçları yüksek, polariteleri ve molekül ağırlıkları düşüktür [149], [150]. Çözünürlük açısından en önemli özelliklerden biri olan polarite, moleküllerin dielektrik sabitleriyle ilişkili olup molekülün fonksiyonel gruplara sahip olması

bu özelliği arttırır [153]. Terpenoidler terpenlere göre aromatik ve terapötik açılardan daha güçlüdür. Antioksidan özellik ise terpenlerde ve fenolik moleküllerde öne çıkar [154].

Uçucu yağların kalitelerinin belirlenmesi önemli bir konudur. Kalite belirlenirken iki önemli nokta vardır: Ürünün bir uçucu yağa özgü temel özelliklere sahip olması ve bileşenlerinin adı ve miktarı. Bileşimin ve bileşen oranlarının belirlenmesinde en sık kullanılan analiz yöntemleri GC ile UV-Vis, IR ve NMR spektroskopileridir. GC analiz koşullarında buharlaşmayacak kadar yüksek kaynama noktasına sahip bileşenlerin tespitinde HPLC kullanılır. Ayrıca özgül ağırlık, kırılma indisi, erime ve kaynama noktası, optik çevirme, renk, koku, çözünürlük, viskozite, toplam asit sayısı, iyodin sayısı, sabunlaşma indisi, alkol, ester, aldehit ve keton içeriği ölçümleri yapılarak fizikokimyasal özellikler belirlenir [155].

Vakslar, pigmentler, kumarinler, psoralenler farklı özelliklerde ve farklı kullanım alanlarına yönelik bileşikler olduğundan uçucu yağın çoğu alanda kullanımında bulanık görünüm ve fototoksikite gibi olumsuz durumlar yaratan bu bileşenlerin bulunması istenmez [156]. Normal koşullarda uçucu olmayan bileşenler olarak uzun zincirli hidrokarbonlar, heterosiklik moleküller, yağ asitleri, steroller ve karotenoidler daha çok görünen maddelerdir.

Ülkemizde üretimi ve ithalatı yapılan uçucu yağların başında gelen ürünler gül, kekik, defne, ardıç, biberiye, mersin, nane, lavanta, adaçayı, hayıt, rezene, kimyon, karabaş otu ve zencefilden elde edilen ürünlerdir. Geçmişten günümüze hem dünyada hem de Türkiye’de uçucu yağların kullanımı azalmadan devam etmektedir.

Uçucu yağ bileşenlerine bakıldığında 2000’den fazla bileşenin %90’ının terpen sınıfına dahil olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca bunların oksijenli türevleri olan terpenoidler, fenilpropanoidler ile azot veya kükürt içeren hidrokarbonlar uçucu yağların kalan kısmını oluşturur. Terpenler ve türevlerinin temelinde izopren adı verilen 2-metil-1,3-bütadien molekülü vardır. 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 8 izopren molekülünden oluşan bileşikler sırasıyla hemi-, mono-, seski-, di-, sester-, tri- ve tetraterpen olarak adlandırılırken 8+ izopren içeren bileşikler politerpen, 100+ izopren içeren bileşikler de kauçuk olarak tanımlanır. Bir uçucu yağda büyük oranda mono-, seski- ve diterpen yapılar bulunur. 4 izoprene kadar olan yapılar izopropil-etil şeklinde bağlanırken daha fazla sayıda izoprenden oluşan yapılar etil-etil şeklinde bağlanır. Terpenler halkalı veya halkasız olabilir. Halkasız yapıdakiler asiklik, tek halkalı olanlar monosiklik, iki halkalı olanlar bisiklik ve üç halkalı olanlar trisiklik sıfatıyla anılır [157].

Doğada bulunan terpen türevlerinin yaklaşık sayıları hemiterpenler için 50, monoterpenler için 1500, seskiterpenler için 10 bin, diterpenler için 5000, sesterterpenler için 150, triterpenler için 5000, tetraterpenler için 200 kadardır. En çok görülen yararları analjezik, antibakteriyel, balgam söktürücü, uyarıcı, antiseptik, ateş düşürücü, antialerjik, antifungal, yatıştırıcı, hormon düzenleyici olmalarıdır.

Alkoller (-OH) uçucu yağlarda tekil, terpen veya ester bağlı şekilde bulunabilir ve daha çok antimikrobiyal etki gösterir. Aldehitler (-C(=O)-H) antimikrobiyal etkisinin yanında ateş düşürücü ve yatıştırıcı etkiye de sahiptir. Az miktarda organik asit (-C(=O)-OH) içeriği ateş düşürücü, alkol ve asidin birleşmesiyle oluşan esterler (-C(=O)-O-) antifungal, antimikrobiyal ve yatıştırıcı etkilidir. Ketonlar (-C(=O)-) solunum yollarını rahatlatıcı, iltihap kurutucu, hücre oluşumunu destekleyici etkiler gösterir fakat birçok uçucu yağda tujon, pulegon, pinokafur gibi zehirli ketonlar da bulunur. Fençon, karvon ve menton ise zararsız ketonlardır. Laktonlar hidroksikarboksilik asitlerin halkalı esterleridir ve ateş düşürücü, iltihap kurutucu, solunum rahatlatıcı özelliğe sahiptir.

Monoterpenlerin bitkilerde birincil görevi sağladıkları kokuyla polen taşıyıcıları çağırmak veya otçulları uzak tutmaktır. Birçok uçucu yağ büyük oranda monoterpenik bileşiklerden oluşur. Çoğunlukla 150-185°C arasında kaynama noktasına sahip olduklarından elde etme yöntemi olarak buhar destilasyonu tercih edilir. Saflaştırılmaları vakum altında fraksiyonlu destilasyon veya kristallendirme ile mümkündür. Monoterpenlere göre daha kararlı yapıda olan seskiterpenlerin ortalama kaynama noktaları 230-300°C'dir. Daha zayıf ama daha kalıcı aromaları vardır [158]. Elde edilmeleri destilasyonun yanı sıra ekstraksiyonla da gerçekleştirilebilir ve saflaştırılmaları için vakum altında fraksiyonlu destilasyon veya gaz kromatografileri kullanılabilir. Bitkilerde büyüme, gelişme ve hücreler arası iletişime katkı gibi görevlerle birlikte otçullardan, mikroorganizmalardan ve mor ötesi ışıklardan korunma konularında da organizmaya fayda sağlar. Seskiterpen ve türevlerinin insan sağlığı açısından ise kanser, sıtma, ülser, migren, enfeksiyon gibi rahatsızlıklara karşı etkileri tespit edilmiştir. Diterpenler bitkilerde büyüme, çiçeklenme, üremede görev alırken insan sağlığı açısından öne çıkan etkileri tümör ve iltihap giderici, kanser hücrelerini öldürücü sitotoksik özellikte olmalarıdır. Kahve çekirdeklerinden elde edilen diterpen alkollerden olan kafestol ve kahveolün felç, diyabet, kadınlarda depresyon ve erkeklerde prostat kanseri riskini azalttığı belirlenmiştir. Bitkiler, hayvanlar ve mantarlarda üretilen triterpenler mevalonik asidin türevleridir. Bitkisel dokulardan elde edilen saponinler sabun benzeri köpük oluşturur ve sindirim sisteminde

temizleyici etkisi vardır. Sınırlı olmakla birlikte triterpenler hakkındaki bilgi kanser, damar sertliği ve virüs sebepli rahatsızlıklara iyi geldiği şeklindedir. Karotenoidler izopren temelli olduklarından tetraterpen olarak da adlandırılırlar. Çoğu büyük oranda doymamış olduklarından elde etmek ve saflaştırmak oldukça zordur. En bilinen tetraterpen β -karotendir.

Uçucu yağların ilk elde edilme şekli anfloraj olarak da bilinen yağda bekletme yöntemidir. Su ve buhar destilasyonu, çözücü ekstraksiyonu, presleme, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu, katı faz mikroekstraksiyonu gibi yöntemler uçucu yağların üretiminde sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Yöntem seçiminde bileşenlerin çözünürlükleri, kaynama noktaları ve bileşimin istenen özellikleri önemlidir.

Isıdan dolayı bozulmanın önüne geçmek için kullanılan yöntemlerden biri bez torbalara konulan bitkilerin soğuk preslenmesidir. Buradan elde edilen ürün dekantasyon, filtrasyon veya santrifüjlemeyle ayrılabilir. Fakat bu ürün dokuların içerdiği suyla birlikte alındığından suda çözünen bileşenlerin kaybedilme olasılığı vardır.

Destilasyon, ısıtmanın yaratacağı bozulma, suda çözünen bileşenlerin kaybı ve sürecin uzun sürmesi gibi dezavantajları olmakla birlikte uçucu yağ üretiminde en çok kullanılan yöntemdir. Clevenger aparatlarıyla veya imbiklerle gerçekleştirilen su destilasyonunda, kaynatma kabına su ve bitki konularak ısıtılır. Buhar destilasyonunda doymuş veya kızgın buhar üst kısımda bir ızgara üzerinde bulunan bitkiden geçirilir.

Mikrodalga ekstraksiyonunda organik bir çözücü olmaksızın bir miktar su içinde mikrodalga enerjisiyle ısıtılan bitkinin buharı elde edilir. Enerji verimliliği, organik çözücü kullanılmaması ve işlemin kısa sürede gerçekleşmesi öne çıkan yanlarıdır. 2,5-75 GHz arasındaki frekanslardaki elektromanyetik dalgalar kullanılarak direkt olarak çözücünün ısınması ve bu sayede daha az çözücünün daha az enerjiyle ısıtılarak yeterli verimin elde edilmesi sağlanır. Çözücü türü ve miktarı, sıcaklık, süre, bitkinin içerdiği su miktarı, ısıtma gücü gibi etkenler mikrodalga ekstraksiyonunun başlıca etkenleridir.

Bitkinin sahip olduğu uçucu bileşenlerin soğuk yağa emdirilmesi anfloraj, sıcak yağa emdirilmesi ise maserasyon olarak adlandırılır. Bu geleneksel yöntemler uzun sürer ve sonuçta ya alkol gibi bir çözücüyle uçucu yağın ayrılması gerekir ya da cilde sürülerek uygulanacak kıvamda bir ürün üretilmiş olur.

Çözücü ekstraksiyonunda genellikle hidrokarbon yapılı bir organik çözücü kullanılır. Alınan ürün filtrasyon veya destilasyon yoluyla çözücünden arındırılır ve kalan vaks türü maddeler alkol gibi bir çözücüyle ayrılır. Alkolün de buharlaştırılmasından sonra uçucu yağ elde edilmiş olur. Çözücü ekstraksiyonunda çoğu zaman Soxhlet aparatı kullanılır. Çözücünün tamamen uzaklaştırılması, yüksek uçuculuğa sahip bileşenlerin buharlaşması gibi olumsuzluklarının yanı sıra ısıdan dolayı bozulmanın önlenmesi ve doğala yakın bir bileşimin sağlanması gibi olumlu yanları da vardır. Çözücünün, bileşenlerin yapısını bozmayan, çözünürlüğü ve seçiciliği yüksek, ucuz, düşük kaynama noktalı, suyla karışmayan ve saf hâlde bulunabilir olması gereklidir [159].

Su içinde kaynatılan bitkinin buharıyla çözücünün buharının temas ettirilmesi, su içinde bulunan bitkiden çözücü buharının geçirilmesi, yüksek sıcaklık ve basınçtaki çözücü kullanılarak ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi ve çözücünün süperkritik fazda kullanılması gibi uygulamalar da vardır [149]. Süperkritik akışkan kullanılarak yapılan ekstraksiyonda verim ve seçicilik basınç ve sıcaklık yoluyla ayarlanabilir. Organik çözücülerin kullanılmaması, çözücünün tekrar kullanılabilmesi, sürecin kısa sürmesi, sıvı çözücülerinki kadar yüksek çözme gücünün gaz çözücülerinki kadar yüksek difüzyon hızıyla birlikte sağlanabilmesi, ısı ve oksidatif bozulmayı önleyecek ortamlarda ekstraksiyonun yürütülebilmesi süperkritik akışkan ekstraksiyonunun olumlu yanlarıdır.

Uçucu yağların içerikleri ve başlıca bileşenleri ile ilgili çok fazla çalışma vardır. Genetik özellikler, kullanılan bitki kısmı, iklim, toprak, mevsim, bitkinin toplanma zamanı ve yöntemi, kurutma yöntemi, analiz yöntemi gibi çok çeşitli faktörlere bağlı olarak değişik içeriklerle karşılaşılabilir [160], [161].

Büyüme aşamasında uçucu yağ verimi en düşük seviyede iken tomurcuklanmanın başlamasıyla en yüksek seviyeye ulaşır. Bu süreçte ana bileşenler aynı kalır fakat bileşenlerin toplam sayısı değişir. Büyüme başladıktan sonra alifatik hidrokarbonların oranı azalır. Bu sırada seskiterpenoidlerin oranı tomurcuklanma sırasında, seskiterpenlerin oranı da çiçeklenme sırasında en yüksek seviyelerine ulaşır. Monoterpen oranı sürekli olarak artar ve %10'u bulur [162]. Smelcerovic ve diğ. (2007) tarafından yapılan çalışmada yapraklarda %74 ile seskiterpenler, çiçeklerde %44 ve gövdede %50 ile terpenik olmayan bileşenler öne çıkmıştır [163].

İklimsel ve jeolojik koşullara göre değişmekle birlikte farklı kesimlerde yetişen bitkilerden elde edilen uçucu yağlarda daha çok monoterpenler ve seskiterpenler bulunduğu anlaşılmıştır [1].

Radusiene ve diğ. (2005) Litvanya’da [164], Schwob ve diğ. (2004) Fransa’da [162], Yüce (2016) Türkiye’de [161] yetişen sarı kantaronlardan uçucu yağ elde etmiştir. Türkiye’de yetişen örneklerin aksine diğer iki çalışmada da β -karyofilen ve karyofilen oksit bileşikleri öne çıkarken Gaziantep ve Tunceli çevresinden toplanan örneklerde başlıca uçucu yağ bileşenleri olarak β -selinen, bisiklogermakren ve 2-tetradekan tespit edilmiştir.

Fransa’dan toplanan 5 farklı örneğin uçucu yağlarında β -karyofilen, karyofilen oksit, ar-kurkumen, germakren D, spatulenol başlıca bileşenler olmuştur [165]. Türkiye’de yapılan bir çalışmada ise β -selinen, bisiklogermakren, 2-tetradeken ve α -amorfen en yüksek orana sahip bileşenler olarak belirlenmiştir [161]. Yunanistan ve Sırbistan’dan toplanan örneklerin karşılaştırıldığı bir çalışmada elde edilen sonuçlar içeriklerin tamamen farklı olduğunu göstermiştir. Buna göre Sırbistan’dan toplanan örneklerin uçucu yağında %22 oranında β -karyofilen bulunurken bu madde Yunanistan’dan toplanan örneklerin uçucu yağında %1’in altında görülmüştür. Bu üründe en yüksek orana sahip bileşenler ise α - ve β -pinen olmuştur. Yunan uçucu yağı ağırlıklı olarak monoterpenlerden oluşurken Sırp uçucu yağı seskiterpenler ve alifatik hidrokarbonlar açısından zengin bulunmuştur [166]. İran’da yapılan bir çalışmada kütlice %0,1-1 arası uçucu yağ elde edilmiştir. Örneklerde seskiterpenler, alkanlar ve monoterpenler öne çıkmıştır. Tüm örneklerin içeriği karşılaştırıldığında yalnız 2,6-dimetilheptan, 1,3-dimetil-benzen, n-nonan, α -pinen, 3-metil-nonan, p-simen, allil hekzanoat, α -humulen, γ -himaçalen, (E)-nerolidol ve dihidro-eudesmol bileşiklerinin ortak varlığına rastlanmıştır [167]. Fitosol ekstraksiyonuyla elde edilen ürünün öne çıkan uçucu bileşenleri 2,6-dimetilheptan, α -pinen, β -karyofilen ve 2-metil-3-büten-2-ol şeklinde olmuştur [168].

Crockett, 2010 yılında bitkinin uçucu yağının içeriği hakkında bir derleme hazırlamıştır [169][169]. Hatami ve diğ. (2012) SK CO₂ ile ekstraksiyona çalışırken bazı varsayımları gerekli görmüştür. Buna göre sıcaklık ve basıncın reaktör içerisinde düzgün dağıldığı, katı parçacıkların tümünün tek bir maddeye ait eşit büyüklükteki yuvarlak şekillerde olduğu, derişimin radyal olarak değişmediği, akışkan ve katı ara yüzeylerinde yerel ve doğrusal denge durumlarının oluştuğu, katı miktarının ve dolayısıyla reaktör hacminin süreç boyunca değişmediği, çözücünün fiziksel özelliklerinin sabit kaldığı ve reaktör içinde piston akış modeline uygun şekilde aktığı varsayımlarına bağlı olarak modelleme çalışmasını gerçekleştirmiştir [170].

Hekzan ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında CO₂ ile yapılan ekstraksiyonun yarı sıcaklık (40°C) ve yarı sürede (1,5 saat) hemen hemen aynı verimi sağladığı görülmüştür [171]. Süperkritik CO₂ yerine sıvı CO₂ kullanıldığında verimin düşük kaldığına yer verilen çalışmada basınçla birlikte verimin bir noktaya kadar arttığı fakat sonrasında sabit kaldığı görülmüştür. Sıvı fazda ana bileşenler n-tricontan, (%16,33), n-heneikosan (%14,41), n-tetrakosan (%13,83), n-nonakosan (%13,26) ve süperkritik fazda n-tetratriakontan (%25,95), 1,2-benzendikarboksilik asit (%13,44), fitol (%7,13) olmuştur [172].

H. perforatum L. uçucu yağının çalışıldığı çalışmalar Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4: Sarı kantaron otu uçucu yağının ana bileşenleri.

Kaynak	Ana bileşenler	Hasat yeri
[168]*	2,6-Dimetilheptan α -Pinen β -Karyofilen 2-Metil-3-büten-2-ol	Izmir, Türkiye
[161]*	β -Selinin Bisiklogermakren 2-Tetradeken α -Amorfen	Gaziantep ve Tunceli, Türkiye
[165]	β -Karyofilen (%14,8) (E)- β -Farnesen (%7,1) α -Kurkumen (%13,0) Germakren D (%17,8)	Val-d'Arc, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	β -Karyofilen (%28,4) Germakren D (%37,3)	Pertuis, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	β -Karyofilen (%26,1) Dodekanol (%7,5) α -Selinin (%15,5) Germakren D (%6,3)	Saint-Cyr, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	β -Karyofilen (%24,1) β -Selinin (%6) Bisiklogermakren (%5,8) Germakren D (%29,1)	Mérindol, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	Spatulenol (%21,1) γ -Muurolen (%7,7) Nerolidol (%6,5) Dallanmış Tetradekanol (%9,1)	Bandol, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	β -Karyofilen (%13,3) γ -Muurolen (%6,9) (E,E)- α -Farnesen (%8,4) Spatulenol (%21,5) Karyofilen oksit (%18,4)	Méailles, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
[173]	n-Triakontan (%16,3) n-Heneikosan (%14,4) n-Tetrakosan (%13,8) n-Nonakosan (%13,3)	Sobina, Sırbistan
[173]	n-Tetratriakontan (%25,96) 1,2-Benzendikarboksilik asit (%13,4) Fitol (%7,1)	Sobina, Sırbistan

Tablo 2.4 (devam)

[174]	α -Pinen (%61,8) 3-Karen (%7,5) β -Karyofilen (%5,5)	Gaziantep, Türkiye
[163]	2-Metil-oktan (%20,5) α -Pinen (%13,7) Spatulenol (%9,8) n-Hekzadekanoik asit (%4,0)	Güneydoğu Sırbistan'ın çeşitli kesimleri
[175]	α -Pinen (%21,0) 2-Metil-oktan (%12,6) γ -Muurolen (%6,9) Spatulenol (%6,4)	Yanya, Yunanistan
[176]	β -Karyofilen (%14,2) 2-Metil-oktan (%13,1) 2-Metil-dekan (%7,9)	Rujan dağı, Sırbistan
[162]	Karyofilen oksit (%15,3) β -Karyofilen (%7,3) 1-Tetradekanol (%7,0)	Büyüme zamanı, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	Karyofilen oksit (%17,0) β -Karyofilen (%16,8) Spatulenol (%12,7)	Tomurcuklanma zamanı, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	β -Karyofilen (%18,3) Karyofilen oksit (%15,9)	Çiçeklenme zamanı, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
	Karyofilen oksit (%18,5) β -Karyofilen (%9,1)	Meyvelenme zamanı, Provence-Alpler-Fransız Rivierası, Fransa
[166]	β -Karyofilen (%22,3) 2-Metil oktan (%17,3) 2-Metil dodekan (%6,0)	Panèvevo, Sırbistan
[166]	α -Pinen (%35,0) β -Pinen (%23,4) 2-Metil oktan (%13,5)	Sedes, Yunanistan
[177]	β -Karyofilen (%11,7) Karyofilen oksit (%6,3) Spatulenol (%6,0) α -Pinen (%5,0)	Taşkent, Özbekistan
[178]	Longifolen (%18,7) γ -Eudesmol (%10,7) Spatulenol (%6,9) Bisiklogermakren (%5,5)	Çiçeklenme öncesi, Meşhed, İran
	α -Kadinen (%27,17) Bisiklogermakren (%16,93) Spatulenol (%6,95) γ -Eudesmol (%6,52)	Çiçeklenme zamanı, Meşhed, İran
	Longifolen (%22) β -Bisabolen (%9) Spatulenol (%8,45) Glubulol (%5,15)	Meyvelenme zamanı, Meşhed, İran
[167]	δ -Kadinen (%11,6) 2,6-Dimetil-heptan (%10,9) (E)-Karyofilen (%9,9) α -Humulen (%7,1)	Gelugah, İran
	δ -Kadinen (%22,6) (E)-Karyofilen (%12,2) α -Humulen (%11,3) α -Pinen (%9,0) 2,6-Dimetil-heptan (%7,4)	Nur, İran

Tablo 2.4 (devam)

	2,6-Dimetil-heptan (%15,0)	Ramser, İran
	n-Nonan (%11,1)	
	δ -Kadinen (%11,0)	
	α -Pinen (%8,7)	
	β -Funebren (%6,7)	
	α -Pinen (%14,4)	Dorud, İran
	δ -Kadinen (%10,6)	
	2,6-Dimetil-heptan (%9,8)	
	3-Metil-nonan (%8,1)	
	α -Pinen (%21,9)	Tonekabun, İran
	n-Nonan (%9,8)	
	2,6-Dimetil-heptan (%9,1)	
	n-Dodekanol (%6,8)	
	γ -Himaşalen (%6,0)	
	α -Pinen (%23,6)	Toskestan köyü, Gürgan, İran
	2,6-Dimetil-heptan (%13,5)	
	γ -Kadinen (%8,7)	
	3-Metil-nonan (%5,7)	
	α -Pinen (%26,0)	Kharv köyü, Güney Horasan, İran
	2,6-Dimetil-heptan (%15,2)	
	β -Pinen (%11,6)	
	δ -Kadinen (%10,2)	
	α -Pinen (%25,7)	Lahican, İran
	2,6-Dimetil-heptan (%15,1)	
	β -Funebren (%12,4)	
	γ -Kadinen (%9,6)	
	γ -Kadinen (%16,9)	Meşhed, İran
	2,6-Dimetil-heptan (%6,3)	
	n-Tetradekanol (%6,3)	
	α -Pinen (%6,2)	
	2,6-Dimetil-heptan (%36,1)	Azadşehr, İran
	α -Pinen (%23,6)	
	3-Metil-nonan (%10,1)	
[179]	Leden oksit II (%8,91)	10 farklı örnek,
	Humulen epoksit II (%7,90)	Vilnius, Litvanya
	<i>cis</i> -Fitol (%7,89)	
	Dokosan (%10,80)	
	Spatulenol (%9,10)	
	Karyofilen oksit (%7,76)	
	Spatulenol (%10,01)	
	Eikosan (%9,01)	
	Karyofilen oksit (%6,92)	
	Dodekanoik asit (%9,63)	
	Karyofilen oksit (%9,27)	
	Hekzadekanoik asit (%7,61)	
	Hekzadekanoik asit (%12,87)	
	Spatulenol (%12,16)	
	Karyofilen oksit (%7,99)	
	Tetradekanol (%6,94)	
	Hekzadekanoik asit (%10,05)	
	Karyofilen oksit (%9,28)	
	Spatulenol (%8,17)	
	Ledol (%9,31)	
	Karyofilen oksit (%8,41)	
	Spatulenol (%6,71)	

Tablo 2.4 (devam)

	Karyofilen oksit (%18,73)	
	Karyofilen oksit (%11,31)	
	Spatulenol (%8,51)	
	Salvial-4(14)-en-1-on (%8,44)	
	Hekzadekanoik asit (%8,13)	
	Tetradekanol (%7,88)	
[180]	Germakren D (%29,5)	Varéna, Litvanya
	β -Eudesma-4(15),7-dien-1-ol (%9,1)	
	α -Kadinol (%6,2)	
	Karyofilen oksit (%6,1)	
	Germakren D (%14,8)	Svencioniai, Litvanya
	β -Eudesma-4(15),7-dien-1-ol (%11,7)	
	Funebrol (%6,7)	
	Germakren D (%23,2)	Ukmerge, Litvanya
	Funebrol (%6,1)	
	Karyofilen oksit (%6,0)	
	α -Kadinol (%5,8)	
	Germakren D (%12,7)	Zarasai, Litvanya
	Karyofilen oksit (%11,9)	
	β -Karyofilen (%9,6)	
	Germakren D (%15,7)	Marijampole, Litvanya
	β -Karyofilen (%8,8)	
	Karyofilen oksit (%7,0)	
	Germakren D (%14,0)	Vilnius, Litvanya
	β -Karyofilen (%7,8)	
	β -Eudesma-4(15),7-dien-1-ol (%6,5)	
[181]	Germakren D (%12,0)	Marijampole Litvanya
	β -Karyofilen (%10,5)	
	Germakren D (%16,1)	Vilnius, Litvanya
	Karyofilen oksit (%13,1)	
	(Z)- β -Farnesen (%8,2)	
	Germakren D (%12,7)	Vilnius, Litvanya
	(Z)- β -Farnesen (%9,0)	
	β -Karyofilen (%8,2)	
	Dodekanol (%6,1)	
	Germakren D (%13,6)	Moletai, Litvanya
	Tetradekanol (%9,4)	
	Tetradekanol (%9,4)	
	Karyofilen oksit (%7,2)	
	β -Karyofilen (%6,8)	
	Karyofilen oksit (%35,8)	Varena, Litvanya
	β -Karyofilen (%11,1)	
	Spatulenol (%8,0)	
	Dimetilheptan (%6,6)	
	Karyofilen oksit (%17,5)	Varena, Litvanya
	Germakren D (%9,8)	
	Spatulenol (%7,5)	
	α -Kadinol (%5,3)	
	β -Karyofilen (%5,2)	
	Karyofilen oksit (%14,2)	Alytus, Litvanya
	β -Karyofilen (%11,4)	
	Germakren D (%10,1)	
	β -Farnesen (%8,0)	
	Spatulenol (%7,1)	

Tablo 2.4 (devam)

	Karyofilen oksit (%13,4) β -Karyofilen (%12,0) Germakren D (%7,8) α -Pinen (%6,9)	Vilnius, Litvanya
	β -Karyofilen (%18,3) Karyofilen oksit (%15,7) Germakren D (%10,1) Spatulenol (%7,1)	Elektrenai, Litvanya
	β -Karyofilen (%19,1) Karyofilen oxide (%12,5) Spatulenol (%8,5) Germakren D (%6,8)	Vilnius, Litvanya
	β -Karyofilen (%13,2) Karyofilen oksit (%11,8) Germakren D (%5,9) Spatulenol (%5,6)	Vilnius, Litvanya
	β -Karyofilen (%10,5) Karyofilen oksit (%7,0) Spatulenol (%6,9) δ -Kadinen (%6,7) β -Farnesen (%6,1)	Rokiskis, Litvanya
	Germakren D (%16,1) Karyofilen oksit (%13,1) β -Farnesen (%8,2) Spatulenol (%5,6)	Vilnius, Litvanya
	Germakren D (%31,5) α -Muurolen-14-hidroksi (%9,1) α -Kadinol (%6,2) Karyofilen oksit (%6,1)	Lazdijai, Litvanya
[166]	Germakren D (%22,8) 2-Metil oktan (%10,8) α -Pinen (%10,1) β -Karyofilen (%6,6)	Yabani örnekler, Vermio dağları, Yunanistan
	Germakren D (%18,9) 2-Metiloktan (%17,8) β -Karyofilen (%10,3) T-Muurolol (%5,6)	Kültür örnekleri, Vermio dağları, Yunanistan
[182]	Karyofilen (%30,0) Germakren D (%19,64) β -Kopaen (%7,09) γ -Amorfen (%6,28)	Külleme hastalığına tutulmuş örnekler, Bolonya, İtalya
	Karyofilen (%25,41) Germakren D (%17,24) β -Kopaen (%5,97)	Sağlıklı örnekler, Bolonya, İtalya
[183]	α -Pinen (%30,92) β -Pinen (%18,32) Karyofilen (%15,26) Germakren D (%9,23) β -cis-Osimen (%7,85)	Arad, Romanya
[184]	Germakren D (%23) β -Karyofilen (%14)	Kırklareli, Türkiye
[99]	α -Pinen (%8,1) n-Nonan (%7,0) Globulol (%5,5)	Güney Estonya

Tablo 2.4 (devam)

(E)- β -Karyofilen (%19,2)	Central Estonia
γ -Muuorulen (%8,7)	
γ -Amorfen (%6,5)	
α -Pinen (%14,3)	Kuzey Estonya
Germakren D (%13,7)	
2-Metil oktan (%11,3)	
β -Pinen (%6,8)	

*İşaretli çalışmalarda bileşenlerin yüzdesi verilmemiştir.

2.1.6. Hiperisinle İlgili Çalışmalar

Hiperisinin hangi kimyasal ve biyolojik yollarla sentezlenebileceği konusunda geniş çaplı bir çalışma 2004 yılında yapılmıştır [185]. Bileşik, 36 *Hypericum* türünün 27'sinde sentezlenmektedir. *H. boissieri* Petr. türünün %0,512 ve *H. barbatum* Jacq. türünün %0,306 hiperisin içerdiği çalışmada *H. perforatum*'da yalnızca %0,125 toplam hiperisin tespit edilmiştir [186]. Ayan ve Çırak Türkiye'de yetişen 9 *Hypericum* türünde hiperisin bulmuştur. Bunlardan en fazla hiperisine sahip olan türler *H. triquetrifolium* (3,092 mg/g kuru madde), *H. montbretii* (2,959 mg/g kuru madde) ve *H. perforatum* (2,91 mg/g kuru madde) olmuştur. Psödohiperisin içerikleri ise sırasıyla 4,166, 4,288 ve 1,8 mg/g kuru madde olarak belirlenmiştir [187].

Kurutma, ışık ve ekstraksiyonun çiçeklenme döneminde mi meyve verme döneminde mi yapıldığı naftodiantron verimini değiştirmez. Doğadan toplanan taze bitkilerin gölgede maserasyonu, bitkinin gelişme aşamasına bakılmaksızın yüksek oranda hiperforin verir [120]. Avustralya'da yapılan bir çalışmada, dar yapraklı örneklerin yıl boyunca geniş yapraklı örneklerle göre daha yüksek hiperisine sahip olduğu belirlenmiştir. Geniş yapraklı biyotipte hiperisin oranının daha hızlı arttığı ve azaldığı, dar yapraklı bitkilerde ise hiperisin oranının ilkbaharda önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [188]–[190]. Farklı morfolojik özelliklere sahip örnekler incelendiğinde, hiperisin oranının yapraklar üzerindeki koyu renkli bezlerin yoğunluğu ile doğru, yaprakların alanı ile ters orantılı olarak değiştiği görülmüştür. Yaprakların uzunluk/genişlik oranı, bitkinin boyu ve içerdiği biyoaktif bileşenler gibi faktörlerin hiperisin oranı ile arasında istatistiksel bir ilişki belirlenmemiştir [191].

HPLC ile yapılan analizde Türkiye'nin kuzeyinden toplanan örneklerde 0,44-2,82 mg/g hiperisin, 0,0-1,86 mg/g klorojenik asit, 0,0-8,77 mg/g rutin, 5,41-22,28 mg/g hiperozit, 1,64-3,98 mg/g kuersitrin ve 1,01-1,76 mg/g kuersetin tayin edilmiştir [191]. Hindistan kökenli 8 adet örneğin LC-MS/MS analizinde ise 1,68-4,62 mg/g psödohiperisin, 1,19-2,68 mg/g hiperisin, 3,84-24,58 mg/g hiperforin, 6,54-23,77 mg/g rutin, 13,74-41,64 mg/g hiperozit, 1,33-

12,85 mg/g kuersitrin ve 0,19-1,54 mg/g kuersetin arasında bulunmuştur. Bu ikincil metabolit miktarları arasındaki çeşitliliğin nedeni yine genetik, çevresel ve iklimsel faktörler olarak belirlenmiştir [192]. Bitkinin ekstreleri genellikle etanol/su veya metanol/su ile hazırlanır. %0,1-0,3 hiperisin ve %0,6-1,1 hiperforin içeren bu ekstraktlar genellikle %4-16 flavonoid, %19-25 şeker, %10 civarı tanen bileşiği, %2-3 sitrik ve malik asit içerir [193].

Ekren ve diğ. (2010) çalışmasında Bornova ekolojik koşullarında sarı kantaron klonları türetilmiş ve en yüksek oran Topaz ticari türünde olmak üzere ortalama %0,208 oranında hiperisin miktarı elde edilmiştir [5]. Psödohiperisin ise hiperisine göre 2-3 kez daha bol bulunur [144].

Lipofilik bileşiklerin ayrılması ters elektro-osmoz akışlı susuz ortam kapiler elektroforez sistemiyle gerçekleştirilebilir. Elektroforez ortamı 50 mM amonyum asetat ve 150 mM sodyum asetat elektrolitler katılmış hacimce 3:2:1 oranındaki metanol/dimetilsülfoksit/N-metilformamid karışımıdır. Akış polikasyon heksadimetrim bromid (%0,001-0,05) eklenerek ters çevrilmiştir. Diyot dizinli dedektörde okumalar hiperforin için 300 nm'de, hiperisin için 590 nm'de, flavonoidler için 350 nm'de yapılmış ve hiperisin 26,5 µg/ml, psödohiperisin 51,0 µg/ml ve hiperforinler 1715,0 µg/ml bulunmuştur [194].

Hiperisin, bis-(2,4,6-triklorofenil) oksalat, H₂O₂ ve imidazol katalizöründen gelen enerji ile bir kemilüminesans sisteminde doğal bir florofor olarak kullanılabilir. Bu sistem ayrıca kuersetin ve β-karotenin antioksidan aktivitesini belirlemek için de uygulanmıştır [195].

HPLC'de 284 nm'de yapılan analize göre, ultrasonik ekstraksiyon sonucu yağ bileşiminde birçok bileşen bulunurken süperkritik ekstraksiyonun çok yüksek seviyede seçici bir işlem olması sayesinde yağ sadece hiperforin ve adhiperforinden oluşmuştur [196].

Aynı koşullarda çalışıldığında n-hekzan, etil asetat, 2-propanol ve SK-CO₂ ekstraksiyonlarının ürünlerinde hiperisin neredeyse hiç görülmezken etanolü ekstrede görülmüştür. Etanolle gerçekleştirilen uygulamalarda, Temmuz ayında toplanan bitkilerin (Soxhlet ekstraksiyonu ile 35 mg/kg ve pilot ölçekli ekstraksiyon ile 60 mg/kg), Eylül'de toplanan bitkilerden daha fazla hiperisin içerdiği anlaşılmıştır (Soxhlet ekstraksiyonu ile 17 mg/kg ve pilot ölçekli ekstraksiyon ile 38 mg/kg). Toplam hiperisin miktarına bakıldığında, 2-propanol (0,57 g/kg) ve etil asetat (0,41 g/kg) verimlerinin etanol veriminin ardında kaldığı görülmüştür (Soxhlet ekstraksiyonu ile 1,15 g/kg ve pilot ölçekli ekstraksiyon ile 0,85 g/kg) [196].

Etanol, kloroform ve yine etanol ile Soxhlet ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve ürünlerin 8.2-8.8 µM toplam hiperisin ve 124-135 µM toplam flavonoid içerdiği gözlenmiştir. Ancak kloroform ile ekstraksiyon aşamasında bu maddelere rastlanmamıştır. Çalışmanın amacı, ışık etkisi altında hiperisinin neden olduğu toksisite ve oksidatif stres olduğundan, 10 µg/ml kloroform ekstraktının hiperisinin sitotoksitesini ortadan kaldırma etkisine sahip olduğu belirlenmiştir [39].

Sıvı ve SK fazlarda CO₂ ekstraksiyonunda etanol yardımcı çözücüsü de kullanılsa hiperisin ve flavonoid bulunmamıştır. Sıvı CO₂ ile sadece oleoresin, SK-CO₂ ile oleoresin ve uçucu yağ fazları ayrılmıştır. Öncesinde sabitken SK faza geçince ekstraksiyon oranı hızla düşmüştür. Etanolün katkısıyla verim artarken (kuru madde olarak %6,69'dan %10,72'ye) hiperforin içeriği azalmıştır (kuru madde olarak %2,56'dan %2,29'a) [197].

Maserasyon bitkilerden aktif bileşenlerin özütlenmesinde çok uzun zamandan beri kullanılan yöntemlerden biridir. Çözücü olarak çoğu zaman bitkisel yağlar kullanılır. Kullanılan çözücünün özelliğine göre, diğer yöntemlerle elde edilen ürünlerden daha yararlı ürünlerin elde edilebilmesi de mümkündür. Bitkisel maddenin çözücü içerisinde bekletilmesi şeklinde yürütülen bu yöntemin en büyük dezavantajı ise uzun zaman almasıdır.

Güneşin altında 40 günde hazırlanan maseratların fotodegradasyon nedeniyle hiperisin veya türevlerini içermediği gözlenmiştir [142]. Bu üç yağın maserasyonda kullanılmasıyla elde edilen ürünlerin hiperisin içeriği ayçiçeği, zeytin ve palm yağı maseratı sırasıyla olmuştur. Bitkinin içerdiği önemli antioksidan maddelerden biri olan kuersetin incelendiğinde ise palm yağının bu açıdan daha verimli bir ürün verdiği görülmüştür. Beklenenin aksine zeytin yağı maseratı antioksidan içeriği en düşük ürün olmuştur [198].

2007'de İtalya'da yapılan bir çalışmada 50°C'lik ortamda zeytinyağı içinde bekletilen bitkiyle elde edilen yağların hiperforin ve adhiperforin oranlarının düşük olduğu ve en yüksek oranların ise taze meyvelerin (90 g) zeytinyağı (512 ml) içinde 28 günlük maserasyonu sonucu (36,90 µg/100 mg hiperforin ve 17,58 µg/100 mg adhiperforin) elde edildiği belirlenmiştir. Ayrıca zeytinyağı maserasyonu ile üretilen tüm yağlarda hiperisin ve türevleri eser miktarda bulunmuştur [1].

Yurt içinden temin edilen ev yapımı ve ticari maseratların (*oleum hyperici*) yağ kalitesine bakılan bir çalışmada yağ asitlerinin, dolayısıyla maserasyonda kullanılan zeytinyağının

kalitesinin merhemin tedavi edici özelliğini geliştirdiği söylenmiştir [102]. Heinrich ve diğ. (2017) maserasyonda kullanılan yağ asitlerinin ürün içeriğine etkisini incelemiştir. Zeytin yağı, yer fıstığı yağı, soya fasulyesi yağı, badem yağı, ayçiçek yağı, mısır tohumu yağı, makademya fıncığı yağı, jojoba yağı ve orta zincirli gliseritler karşılaştırıldığında hiperisin içeriği en yüksek maserat $5,5 \pm 0,21$ mg/100 g ile badem yağı ile üretilen olmuştur [57].

Organik çözücülerin kullanıldığı çözücü ekstraksiyonu istenen ürüne göre çözücü seçimi yapılabildiği için daha kısa sürede daha yüksek verim sağlar. Bazı moleküller polar yapıda olduklarından polar çözücülerde, bazılarıysa apolar olduklarından apolar çözücülerde daha iyi çözünür. Çözücü ekstraksiyonunun sık kullanılan bir metodu Soxhlet ekstraksiyonu şeklinde uygulanmasıdır. Bu yöntemde özel Soxhlet aparatı kullanılarak çözücünün bitkisel maddeyle tekrar tekrar temas etmesi ve çözücünün bu sırada etken maddelere doyurulması sağlanır.

Soxhlet ekstraksiyonunda çeşitli çözücülerin karşılaştırıldığı bir çalışmada ekstraksiyon verimi çözücünün zincir uzunluğu arttıkça azalmıştır. Örneğin Cossuta ve diğ. (2012) çalışmasında etanolün (1,15 g/kg) toplam hiperisin verimi açısından 2-propanol, etil asetat ve n-hekzane karşı üstünlüğü görülmüştür [196]. Bir diğer çalışmadaysa etanol-su karışımının sadece etanol kullanımına göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür [17].

Yanıt yüzey metodu ile hiperisince zengin ürün üretiminin deneysel tasarımını çalışan Liu ve diğ. (2000) etanol, aseton, su, kloroform ve hekzan ile elde edilen en iyi çözücü karışımını %44-69 etanol-aseton karışımı olarak belirlemiştir. Çalışma 5,3-5,9 saat sürede 55°C'lik su banyosunda en iyi sonucu vermiştir [199].

Metanolle yapılan bir ekstraksiyon çalışmasında %3,814 g rutozit eşdeğeri flavonoid, %0,163 g toplam hiperisin içeriği tespit edilmiştir [200].

Sarı kantaron otunun 80:20 etanol/su karışımıyla ekstrakte edilmesiyle üretilen ürün etanolik ekstre olarak adlandırıldıktan sonra bunun bir kısmı sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Hekzanla, butanolle, etil asetat/formik asit/glasiyal asetik asit/su (100:11:11:27), tolüen/kloroform/aseton/formik asit (40:25:35:1) ve tolüen/etil asetat/formik asit (6:4:1) karışımları ile ayrı ayrı elde edilen fazların içerikleri incelenmiştir. Bu ürünler farklı öne çıkan bileşenlere sahip olup bunların dışında etil asetatla hazırlanıp metanolde çözülen ve metanolle Sephadex LH-20 kolondan geçirilen ürün hiperisin ve benzer bileşenler gibi biantrakınonlar açısından zengin bulunmuştur [201].

Soxhlet ve süperkritik akışkan ekstraksiyonlarının karşılaştırılmasında elde edilen ürün miktarı bakımından ürünler etanol (255,78-358,25 g/kg), 2-propanol, etil asetat ve n-hekzan ürünleri şeklinde sıralanmış olup pilot ölçekli sistemde etanolle yapılan işlem sonucu alınan ürün miktarı (158,60-250,00 g/kg) daha düşük bulunmuştur. SK-CO₂ ile 38,43-31,73 g/kg ürün alınmıştır. Elde edilen hiperisin miktarı bakımından ise verimler etanolle Soxhlet ekstraksiyonu için 1,15 g/kg, etanolle pilot ölçekli üretim için 38-60 mg/kg olmuştur [196]. 100-450 bar ve 40-60°C koşullarında SK-CO₂ ekstraksiyonuyla yapılan deneme sonucunda etanolle yapılan Soxhlet ekstraksiyonuna göre 6 kat daha az ürün elde edilmiştir [202].

Sarı kantaron bitkisinin SK-CO₂ ile ekstraksiyonunun en saf yağı verdiği belirtilmiştir [203]. CO₂ düşük polaritesiyle uçucu ve bitkisel yağlar ile yağda çözünen vitaminler gibi lipofilik bileşiklere yüksek seçicilik gösterir. Dolayısıyla SK-CO₂'in yüksek derecede lipofilik olan floroglusinollerle lipofilik olan naftodiantronlara, uçucu yağlara ve biflavonlara seçiciliği yüksektir [204]. Bitkilerdeki birçok biyoaktif bileşik ise görece yüksek polarlıktadır ve bu yüzden saf SK-CO₂ yerine etanol veya metanol gibi polar bir yardımcı çözücüyle daha hidrofilik bitkisel maddeler (flavonoidler, prosiyanidinler ve tanenler gibi) ekstrakte edilebilir. Hiperforin bileşiğinin SK-CO₂ ile kolaylıkla ekstrakte olduğu, hiperisin ve flavonoidlerin etanol yardımcı çözücüsüyle bile pek kazanılamadığı, sıvı CO₂'in de SK-CO₂ kadar etkili olduğu bilgilerine yer verilen çalışmada 300 bar ve 50°C'de 5 kg CO₂/kg bitki ile 60 g ekstre elde edilmiştir [197]. Bir başka çalışmada da yine sıvı ve SK-CO₂'in benzer içerikli ve hemen hemen aynı miktarda ekstre verdiği, ayrıca bitkisel hammaddeyi daha küçük boyutlara öğütmenin daha yüksek verim sağladığı belirtilmiştir [172]. Cui ve Ang (2002), aktardan aldıkları kuru sarı kantaron yaprakları ve çiçekleri ile yaptıkları çalışmada saf SK-CO₂ ile floroglusinollerin ekstraksiyonu için 380 bar basınç ve 50°C sıcaklığı en uygun koşul olarak belirlemiştir [205].

90 bar basınç altında 3 saatlik ve 120 bar basınç altında 1 saatlik işlem sonucu ekstrenin %32-33'ü hiperforine dönüşmüştür. Basınç ve süre arttıkça ekstraksiyon verimi artmış, ekstredeki hiperforin içeriği azalmıştır. Süre ve sıcaklığın etkisiyle hiperforinin ortoformine dönüşümü artmıştır [193]. Devamında yapılan çalışmada ekstreden SK-CO₂ ile yağ çıkarılıp analiz edilmiştir [206]. Yağ hiperforin (%36,5) ve adhiperforin (%4,6) gibi floroglusinollerin yanı sıra alkanlar, yağ asitleri ve vaks esterleri içerirken apolar bileşenler hiperforince zengin fazın üzerinde kalan vaks fazında toplanmıştır. Naftodiantronlar gibi yüksek polariteye sahip bileşikler görülmemiştir. Bir diğer SK-CO₂ ile ekstraksiyon çalışmasında ise 10-20 MPa

aralığında 40 ve 50°C’de çalışılmıştır [203]. Oluşan ekstrenin her gramında 526 mg’a kadar floroglusinol elde edilebilmiş ve bu oran oluşan ekstrenin miktarına göre pek değişmemiştir. 1 gram kuru sarı kantaron için 7-8,5 gram CO₂ harcanarak 313 K ve 10 MPa’da en yüksek hiperforin ve adhiperforin verimi elde edilmiştir. Bununla birlikte toplam ekstre miktarı sıcaklıkla azalmış, basınçla artmıştır. Yüksek CO₂ yoğunluğunda ekstraksiyon gücü de yüksek olduğundan en iyi hiperforin ve adhiperforin içeriğine 600-700 kg/m³ CO₂ yoğunluğunun sağlandığı koşullarda ulaşılmıştır. Ayrıca 50°C ve 10 MPa’da CO₂ beslenmeksizin 2 saat boyunca yapılan ön işlemin ardından metanolle ultrasonik ekstraksiyon yapılmış ve hiperforin ile hiperisin miktarlarının ön işlemsiz ultrasonik ekstraksiyona göre arttığı görülmüştür. Mannila ve diğ. (2002) çalışmasında da en uygun koşul 0,64 g/ml CO₂ yoğunluğunun sağlandığı 30°C ve 60 atm olup bu noktada kuru sarı kantaronun gramından 12 mg hiperforin elde edilmiştir [207].

Sıcaklık veya basınçtan birinin düşürülmesi durumunda diğerinin yükseltilmesi gerekir. Süperkritik akışkanlarla yapılan ekstraksiyonlarda çözücünün yoğunluğu en önemli parametrelerden biri olduğundan SK-CO₂ için en iyi çalışma koşulu 313 K ve 20 MPa olarak belirlenmiştir [170].

Son yıllarda dikkat çeken bir diğer ekstraksiyon yöntemi ise çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonudur. Nem içeriği, mikrodalga gücü ve süre Abdelhadi ve diğ. (2015) tarafından incelenmiştir. Her üç parametre de ekstraksiyon verimini artırır. Süre dışındaki parametreler ekstre içeriği üzerinde de etkilidir. 468 W güçte 33 dakikalık bir işlem gören %43 nem içeriğine sahip maddeden alınan verim 0,365 g/100 g kuru madde olarak ölçülmüştür. Bu yöntemle üretilen ürünlerin verimi yüksek olmakla birlikte C vitaminiyle karşılaştırıldığında antioksidan etkileri düşük bulunmuştur. Ürünün öne çıkan bileşen sınıfı ise fenolik maddeler olmuştur. Aynı çalışmada hidrodestilasyonla yapılan karşılaştırma denemelerine göre hidrodestilasyon ürünü seskiterpenler, çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonu ürünü ise terpenoidler açısından zengin olmuştur. Bunun nedeni de daha polar yapıda olan terpenoidlerin radyasyonu daha fazla absorblaması olarak açıklanmıştır [208], [209].

Punegov ve diğ. (2015) %6 neme sahip 500 mg numuneyi 25 ml’lik kaplara alıp üzerlerine 15 ml kloroform eklemiş, 30 s ultrasonik banyoya koymuş ve 30 dk oda sıcaklığında bekletmiştir. Klorofil ve lipidlerin kloroform ekstresi 3 kez ipek ve kâğıt filtrelerle vakum altında alındıktan sonra yağı alınmış hammadde silindirik polipropilen manifold içinde hava akımıyla

kurutulmuştur. Hacimce %20-90 arası etanol içeren 15 ml çözücü ile karıştırılmış ve 1 litrelik kapta ev tipi mikrodalga fırın kullanılarak $0,0205 \text{ W/cm}^3$ güç yoğunluğuyla, 2450 MHz frekansta 60 saniyede ekstrakte edilmiştir. 60 saniye için 65°C 'ye ısıtılıp ilk ekstre alınmış, 25 ml'lik kap içinde etanolle seyreltilmiştir. İşlem iki kez daha tekrarlanıp alınan üründeki hiperisin ve psödohiperisin 590 nm'de tespit edilmiştir. Etanolle yapılan denemelerde izopropil alkolle yapılanlara göre daha yüksek oranda (%0,09) naftodiantron elde edilmiştir. En iyi sonuç %55 etanolle yapılan denemeden elde edilmiştir [210].

Ekstraksiyonun yürütüldüğü koşullar sonucu doğrudan etkiler. Bitkisel ürünlerle ilgili çalışmalarda içeriğin bozulma olasılığına karşı mümkün olduğunca düşük sıcaklıkta çalışmak gereklidir. Ekstraksiyon öncesi hücre duvarlarının parçalanmasını sağlamak verimi artırır. Örneğin ultrasonik ekstraksiyon öncesi uygulanan yüksek basınç, diğer bileşenlerin miktarını arttırdığı gibi hiperisin ve hiperforin verimini de arttırmıştır [203]. Benzer şekilde maserasyon öncesi ultrasonik banyo kullanılarak hücre duvarlarının parçalanması da süreci 5 saatten 20 dakikaya kadar indirmiştir [211].

Yapılan bir çalışmada ultrasonik banyo ve 55°C 'deki sıcak su banyosu karşılaştırılmıştır. Bileşenlerin oranları değişmekle birlikte sıcak su banyosunun aktif bileşen miktarını genel olarak arttırdığı belirlenmiştir [212].

Direkt sonikasyonun ultrasonik banyo uygulamasına göre daha etkili olup güç arttıkça verim de artar. Sonikasyon, Soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu denemeleriyle başlıca bileşenler arasında bir seçicilik sağlanmazken bunların miktarları toplam ürün verimine bağlı olarak değişir. Yöntemler arasında en düşük verime sahip olan maserasyon olmuştur [213].

600 W güçte çalışan mikrodalga fırınla yapılan çalışmada %55-70 arası derişime sahip etanol çözeltisiyle en iyi ürün alınarak yaklaşık %0,09 toplam hiperisine ulaşılmıştır. Hemen hemen aynı verimi sağlayan izopropil alkol çözeltisi ise %45-60 derişimde ölçülmüştür [210].

Silika, poliamid ve Sephadex LH-20 kolonlarıyla saflaştırma süreçleri maliyetli ve zahmetlidir. Karioti ve diğ. (2009) naftodiantronların ve diğer polar bileşenlerin vakum sıvı kromatografisiyle ayrıldığını bulmuştur. Sephadex LH-20 ve LH-60 kolonlarıyla yapılan boyut dışlama kromatografisinde proantosiyeninler de naftodiantronlarla kolondan geçer. Bu çalışmaya göre dietil eter-etil asetat-metanol ile oluşturulan sıvı-sıvı ekstraksiyon çalışmaları

ve Sephadex LH-20 ve LH-60 kolonlarıyla %98 saflıkta hiperisin-psödohiperisin karışımı elde edilmiştir. En iyi sonucu veren denemede %90'lık metanol/su karışımıyla ekstrakte edilip kurutulmuş ekstrenin 880 mg'ı 30 ml %80'lik metanol ile seyreltilmiştir. Oda sıcaklığında üç kez 30 ml n-hekzan ile muamele edilip yağı giderilmiştir. Sulu faza 10 ml daha su ilave edilip polariteleri artacak şekilde 40'ar ml'lik üç farklı organik çözücüyle (dietil eter, etil asetat ve bütanol) üçer kez ekstrakte edilmiştir. Tüm çözücüler suyla önceden doyurulmuştur. Tüm fazlar tam olarak kuruyana dek döner buharlaştırıcıda kalmıştır. HPLC-DAD ile yapılan analize göre en yüksek naftodiantron içeriği dietil eter ve etil asetat ekstratlarında bulunmuştur [214].

Ramezani ve Zamani (2017) yaptıkları çalışmada hiperisini kolon kromatografisiyle ayırmak üzere çeşitli adsorban ve yıkama çözücüsü karışımlarını denemiştirler. *H. perforatum* L. yapraklarının klorofil benzeri bileşenlerini gidermek için diklorometan, hekzan, dietileter ve petrol eterinden diklorometan daha iyi bir giderim sağlamıştır. Bu aşamadan sonra bitkisel madde, etanol:aseton (2:1) ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktın toplam hiperisin içeriğinin kazanılmasında kullanılan XAD-7, CG-400 ve CG-50 amberlitleri ile aktif karbon ve silika jel arasından en iyi sonucu veren silika jel olmuştur. Kloroform, kloroform:metanol (8:1), asetonitril, etanol:asetonitril (1:1), kloroform:asetonitril (1:1), etanol, diklorometan:aseton:metanol (15:10:75) yıkama çözücüleri denenmiş ve son karışımın en iyi ayrımı verecek şekilde uzun bir iz bıraktığı görülmüştür. Dar ve uzun kolonun geniş ve kısa kolona göre daha iyi iş gördüğü de belirtilmiştir [215].

2.1.7. Kurutma

Tıbbi ve aromatik bitkiler söz konusu olduğunda kurutma süreçleri özel bir öneme sahiptir. İçeriğindeki belli bileşenler nedeniyle kullanılmak istenen bu bitkilerin kurutulması düzgün yapılmazsa bozulmalar görülebilir. Yeterli nem kaybı sağlanamadan paketlenen ürünlerde küf ve aflatoksin oluşabileceği gibi koku ve renk gibi duyuşal özelliklerin bozulması da tüketicinin istemeyeceği durumlardır. Nem giderimi sırasında uygulanan yöntem, sıcaklığa ve süreye bağlı olarak bileşenlerin yan ürünlere dönüşümü de mümkündür. Moleküllerin yüksek sıcaklığa uzun süre maruz kalmaması için süreç iyi tasarlanmalıdır.

Yüksek sıcaklık kurutmayı daha kısa sürede gerçekleştirir. Hava hızı (rüzgâr) buhar basıncını azaltır ve nem daha hızlı buharlaşır. Enerji tüketimi ve hiperisin oranı ise sıcaklıkla azalırken hava hızıyla artar. Tüm bunlar değerlendirildiğinde, Minaei ve diğ. (2014) yaptıkları çalışmada en verimli kurutmanın 0,7 m/s hızla gönderilen 50-60°C sıcaklıktaki havayla sağlandığını

göstermiştir. Kurutucuya koyulan bitkinin yatak yüksekliği ile enerji tüketimi artmasına rağmen, birim kütle başına enerji maliyetinin yatak yüksekliği ile ters orantılı olduğunu tespit etmişlerdir [216].

50°C'ye kadar sıcaklık uygulanması hiperisin içeriğini bozmamaktadır. Dondurarak saklanan ürünlerde ise hiperisin oranı azalmaktadır [217]. Isıya maruziyeti ortadan kaldırmak için yapılan bir diğer çalışmada ise elde edilen ekstratlar dondurarak kurutma yöntemiyle beta siklodekstrin içine enkapsüle edilmiştir [218].

120 kg'lık bir bitkisel maddenin kurutulması için üretilen tepsi tipi kurutucuda 8 saat 0,290 kg LPG/kg bitki kullanılan uygulamada %63 kurutma verimi sağlanmıştır. Kurulumun maliyeti de yılda üç kez yapılan hasat ve 90 günlük çalışma hesabıyla 10 günlük bir çalışmaya denk hesaplanmıştır [219].

Bitkinin ince tabaka kurutulmasında fırın sıcaklığı, sıcak hava hızı ve yatak yüksekliği üzerinden kurutma işleminin modellenmesi ile ilgili bir çalışmada Verma, Yağcıoğlu, İki terimli kurutma modelleri düşük R^2 , Henderson ve Habis, modifiye edilmiş Page kurutma modelleri yüksek X^2 ve Lewis kurutma modeli yüksek ortalama karekök hatası verirken bu sürece en iyi uyan modelin Page kurutma modeli olduğu belirlenmiştir [220].

Mikrodalga cihazıyla yapılan kurutma uygulamalarında 90-1000 W arası hiçbir deneme doğal kurutma (25-30°C, 5 gün) kadar yüksek hiperisin oranı sağlayamamıştır. En yakın sonuçlar 750-850 W arasında yapılan denemeye alınmıştır. 850 W güçte çalışan cihaz kullanılarak yapılan 150 saniyelik deneme en yüksek verimi sağlamıştır [221].

Akışkan yataklı kurutucu kullanılan bir çalışmada sıcaklıkla (40°C) birlikte hava akış hızının (0,3 m/s) düşük, yatak kalınlığının ise yüksek (3 cm) olmasının en iyi sarı kantaron otu ürününü vereceği belirtilmiştir [222].

2.2. BİTKİSEL ÜRÜNLERİN ELDE EDİLME YÖNTEMLERİ

Bitkisel ürünlerin günlük hayatta kullanım alanları oldukça çeşitlidir. Bu ürünler kimi zaman aromalar gibi gıda ya da kozmetik ürünlerine katılırken kimi zaman da bu ürünlerin bazı özel bileşenleri ayrılarak başka kimyasalların elde edilmesinde kullanılır. Gıda ve kozmetik dışında eczacılık, parfümeri, temizlik, tekstil, böcek veya diğer zararlıları uzaklaştırmak veya öldürmek gibi farklı alanlarda bitkilerin çiçekleri, yaprakları, kökleri, tomurcukları, lifleri, reçineleri,

yağları, uçucu yağları veya bunların içerdiği kimi biyoaktif maddeler genellikle kullanılan bitkisel ürünleri oluşturur.

Bitkisel ürünlerin direkt olarak yiyecek-içecek, dokuma, tütsü vb. amaçlar dışında kullanılması onların işlenmesini gerektirir. Bu amaçla, tarihin çok eski zamanlarından itibaren geliştirilen ve kullanılmaya devam eden yöntemler olmakla birlikte günümüzde yeni geliştirilen teknolojiler sayesinde daha saf ürünlerin daha verimli bir şekilde elde edilebilmesi de mümkün hâle gelmiştir.

Bitkisel ürünlerin elde edilme yöntemlerinin uygulama şekillerini, olumlu ve olumsuz yanlarını bilmek, bir ürünün üretiminde en yüksek verimli, en uygun maliyetli yöntemin seçilebilmesine olanak tanır. Bu nedenle, bu bölümde bitkisel ürünlerin üretim şekilleri ele alınacaktır.

2.2.1. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Bitkisel maddelerden uçucu yağların elde edilmesinde tarihsel olarak çok uzun zamandır kullanılan ve öncelikle tercih edilen yöntem hidrodestilasyondur. Bu yöntem bazı kaynaklarda su destilasyonu anlamında da geçer. Yine de her durumda su veya su buharı kullanıldığından hidrodestilasyon genel bir yöntem olarak kabul edilebilir. Bu yöntem direkt olarak su içinde kaynatma, su buharının veya kızgın buharın bitki parçası içinden geçirilmesi şeklinde uygulanabilir. Bu uygulamanın oturduğu temelin yarattığı bazı sonuçlar vardır: Uçucu yağın bulunduğu hücrelerin parçalanması ve su moleküllerinin hücre içine difüzyonu ilk sonuçtur. Buhar kullanılarak gerçekleştirilen uygulamalarda sağlanamayan etki, su içinde ıslanan hücrelerin suyun difüzyonuyla artan iç basınçlarının etkisiyle parçalanması ve uçucu yağların hücre dışına hareketidir. Böylece normal şartlarda uçucu yağı geçirmeyen dokuların deforme olması sayesinde uçucu yağ bileşenlerinin suya geçişi sağlanır. Bu durumda uçucu yağ bileşenlerinin suda çözünürlüğü, bileşenlerin uçuculuğunun önüne geçer ve yüksek kaynama noktasına sahip fakat suda iyi çözünebilen bileşenler düşük kaynama noktasına sahip fakat suda iyi çözünemeyen bileşenlerden daha önce kazanılmış olur. Uçucu yağ bileşenlerinden bazılarını oluşturabilen esterlerin suyla reaksiyona girerek asit ve alkollerini oluşturması ikinci sonuçtur. Su miktarının fazla olması bu dönüşümü artırarak uçucu yağ verimini etkileyebilir. Hidrodestilasyonun uygulandığı sürede uçucu yağ ve su ne kadar uzun süre temasa girerse bu dönüşüm o kadar artar. Üçüncü sonuç sıcaklığa maruziyettir. Çoğu uçucu yağ bileşeninin sıcaklıkla bozulduğu ve daha kararsız bileşenlere dönüştüğü bilinen bir gerçektir. Bu yüzden uygulamanın mümkün olduğunca düşük sıcaklıkta gerçekleştirilmesi önerilir. Buhar

destilasyonunda sıcaklık etkisi basıncın yükseltilmesiyle azaltılabilir fakat su destilasyonu genellikle atmosferik basınçta gerçekleştirilir. Sıcaklıkla difüzyon artarken hidroliz ve bozulma da artar. Yukarıda sayılan üç durum dikkate alındığında işlem öncesi fiziksel yöntemlerle parçalanmış ve su içine düzgün bir şekilde dağıtılan bitkinin düşük sıcaklıkta ve düşük su oranıyla destilasyonu en yüksek verim ve kaliteyi verir.

2.2.1.1. Su destilasyonu

Bu yöntemde bitkisel madde suyla aynı kapta bulunur. Kap bir ısı kaynağıyla ısıtılır. Diğer yöntemlerden farkı, burada bitkisel dokuların kaynayan suyla direkt temasıdır. Düşük maliyeti, buhara göre suyun verimi artırması, büyük boyutlu uygulamalara uygun olması ve uygulama kolaylığı başlıca olumlu yanlarıdır. Isıtma yöntemine bağlı olarak bitkisel madde yanıp zarar görebilir. Bu nedenle mümkünse bir karıştırıcı ile katı maddenin kabın dibine birikmesi önlenmelidir. Maddenin küçük boyutlara parçalanması su içine dağılımını daha iyi sağlar. Ancak köpük oluşumu ve bitkisel tozun yukarı doğru sürüklenmesi tehlikesi de oluşabilir. Kaptaki suyun kaynayıp bitmesi de dikkat edilmesi gereken bir diğer durumdur. Bunun önüne geçilebilmesi için laboratuvar uygulamalarında Clevenger aparatı kullanılır. Bu aparat sayesinde su buharı ve birlikte sürüklenen uçucu yağ üst kısma yerleştirilmiş bir geri soğutucunun etkisiyle yoğunlaşır ve aparatın birikme borusunda birikir. Alt fazda su, üst fazda uçucu yağ bulunur ve aparatın bu boruya bağlı bir yan borusu aracılığıyla suyun fazlası balona geri döner. Bazı bileşenlerin suya geçişinin ve uçucu yağ veriminin düşmesinin önlenmesi için fazların daha güçlü bir şekilde ayrılması gerekebilir ve bunun için hekzan veya ksilen gibi bir çözücü kullanılarak uçucu yağ bileşenlerinin su yerine üst fazdaki çözücüye karşıması sağlanır. Yukarıda verildiği gibi suyun ve sıcaklığın etkisiyle hidroliz ve polimerizasyon reaksiyonları da son olarak göz önünde bulundurulmalıdır.

2.2.1.2. Su-buhar destilasyonu

Su destilasyonuna benzer ekipmanlarla birlikte bu yöntemde bir de ızgara gibi bir parça kullanılır. Bitkisel madde suya değil suyun üstüne yerleştirilen ızgaraya yerleştirilir. Bu sayede suyun ve ısıнын etkisiyle gerçekleşmesi muhtemel olumsuzluklar önlenmiş, daha saf ve kararlı bir ürün elde edilmiş olur. Ancak kaynayan suyun hücre parçalayıcı etkisi de kullanılamamış olur. İşlemden kullanılan suyun tükenmemesi için yoğunlaşmış su uçucu yağdan ayrıldıktan sonra kaba geri eklenebilir. Buna kohobasyon denir. Kohobasyon, destilasyondan alınan suyun yeniden sisteme beslenmesidir. Suyun devamlılığıyla birlikte suyun kendisinde çözünmüş bileşenlere doyması da sağlanır ve bu bileşenlerin, bir zamandan sonra bitkisel maddeden geçen

buhara artık karışmayacağı düşünülür. Diğer yandan, bu bileşenler su veya ısıнын etkisiyle reaksiyona girebilir. Bu yüzden çözünebilen bileşenlerin 100°C'nin altındaki sıcaklıklarda bozulması mümkünse bu yöntemin kullanılması önerilmez. Uygulamada görülen bir sorun da bitkisel maddenin su buharının etkisiyle ıslanmasıyla destilasyonun olumsuz etkilenmesidir. Çünkü bitki üzerinde yoğunlaşan su yukarı çıkan buharı da yoğunlaştırır. Bunun önüne geçilmesi için de bitkinin biraz daha yukarı yerleştirilmesi veya suyun hafif şiddetli bir şekilde kaynamasının sağlanmasıdır. Sonuç olarak daha kararlı ürünler, polar bileşenlerin daha düşük seviyede kaybı, hidroliz ve polimerizasyonun önlenmesinin yanında daha yüksek enerji maliyeti, daha yüksek kaynama noktasına sahip bileşenlerin elde edilememesi veya bunları elde edebilmek için daha uzun süre uygulama, bitkinin ıslanmasının veya bitki üzerinde yoğunlaşan suyun geri akmasını önleyecek bir parça ve kohobasyon ünitesi gibi ekstra ekipmanların gerekliliği ile karşılaşılabilir.

2.2.1.3. Buhar destilasyonu

Bu uygulamada bitkisel madde bir buhar jeneratöründen alınan buharın geçtiği sisteme yerleştirilir. Bu sistemde, su-buhar destilasyonunda yapılamayan kontrollü buhar geçişi sağlanmış olur. Basıncın ayarlanmasıyla düşük sıcaklıklarda yüksek kalitede ürün elde edilebilir. Büyük boyutlarda üretime uygun, kirlenmenin ve ısıl bozulmanın görülmediği bir yöntemdir. Sıcaklığa karşı hassas bitkilerin işlenmesinde kullanımı tercih edilen sistemin kurulum ve işletme maliyetinin yüksekliği nedeniyle bu yöntemle üretilen uçucu yağların fiyatı da yüksektir.

2.2.2. Yağ Elde Etme Yöntemleri

Bitkilerin sabit yağlarının elde edilmesinde tarihin eski zamanlarından itibaren kullanılagelen yöntemler oldukça çeşitlidir. Bu yöntemler uygulanarak alınan ürünlerde uçucu yağ bileşenleri de bulunabilir. Ancak prensip olarak üründe uçucu yağ bileşenleri dışında sabit yağ, pigment, vaks veya diğer uçucu olmayan bileşenler de bulunuyorsa buna bitkisel yağ adı verilir. Kullanılan bitkiye, bitkinin hangi bölümünün işlendiğine, uygulanan yönteme ve yöntemin özelliklerine bağlı olarak yağ içeriği çok çeşitli olabilir. Bu yüzden bir bitkiden elde edilmek istenen ürüne göre uygulanacak yöntem iyi seçilmelidir.

2.2.2.1. Soğuk sıkım

Baskılama veya soğuk sıkım turunçgil kabuklarından yağ elde edilmesinde kullanılır. Uygulamaları çeşitlidir. Etli kısmı alındıktan kabuk parçalar hâlinde veya kıyılmış şekilde işlenebilir. Bez torbalara yerleştirilerek üstten uygulanan basınçla yağın dışarı akması

sağlanabilir. Geleneksel veya modernize edilmiş bazı uygulamalarda meyveler dönen silindirler arasında ovalanarak veya üzerlerine çizikler atılarak yağ üretilir. Örneğin İtalya’da yapılan geleneksel üretim yöntemine pelatrice veya sfumatrice adı verilir. Bu yöntemde meyveler dönen silindirler üzerinde hırpalanırken havaya fişkıran yağ üstten püskürtülen suyla yakalanır ve karışımındaki uçucu yağ santrifüj gibi bir ayırma işlemiyle sudan ayrılır. Tüm bu uygulamalar bileşenlerin sıcaklıktan etkilenmesini önler ve doğala yakın, kaliteli fakat pahalı ürünler verir.

2.2.2.2. Anfloraj

Bitkilerin özellikle koku bileşenlerinin kazanılması için uygulanan en eski yöntemlerden biri hayvansal yağların absorban olarak kullanılmasıdır. Taze çiçekler bir süre ısıdan uzakta tutulan hayvansal yağa yatırılır. Bitkinin kokusu yağa geçtiğinde aynı yağa yeni bitki yatırılır. Sonunda doygunluğa erişildiğinde uçucu yağ alkolle yıkanarak alınır. Kullanılan hayvansal yağın kokusuz ve uygun kıvamlı olması gerekir. Sert yağ iyi bir absorban olarak davranmaz ve yumuşak yağdan çiçeklerin ayrılması zorluk yaratır. İç yağı ve domuz yağının kullanımı yaygındır. Bu yöntemi kullanan parfüm üreticileri, yağa istedikleri çeşitli bitkileri yatırarak farklı koku notalarının öne çıkmasını sağlamaktadır. Koku bileşenleri genellikle bitkilerin uçucu yağına ait olsa da bu yöntemle elde edilen ürünlerde içerik kesin olarak belirlenemeyeceğinden anfloraj uçucu yağ değil yağ üretim yöntemi olarak kabul edilir.

2.2.2.3. Maserasyon

Bazı bitkilerin sıcak suda bekletilmesi glikozidik bağların çözünmesini sağlayarak yağ bileşenlerinin kazanılmasını kolaylaştırır. Keklik üzümünün primeveroz, sarımsağın alliin, kahverengi hardalın sinigrin ve acıbademin amigdalin bileşenlerini elde edebilmek için bu bileşenlerin üretimini sağlayan enzimlerin sıcak suyla etkinleştirilmesi gerekir. Diğer bir maserasyon uygulaması ise sıcak hayvansal yağların veya organik çözücülerin kullanılmasıdır. Anflorajın 1-2 gün yerine 1-2 saat gibi daha kısa sürede gerçekleşebilmesi için 45-60°C sıcaklıkta uygulanması şeklinde düşünülebilir. Fakat literatüre bakıldığında, 20-25°C’deki uygulamaların da anfloraj yerine maserasyon olarak adlandırıldığı görülmektedir.

2.2.2.4. Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu bitkisel kaynaklardan yağ üretimi için kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir ve çoğu zaman çözücü ekstraksiyonu anlamında kullanılır. Alman kimyacı Franz Ritter von Soxhlet’in 1879’da icadından sonra birçok yeni teknoloji geliştirilse de Soxhlet ekstraksiyonu en çok kullanılan ve en verimli yöntemlerden biridir. Bir ısıtıcıyla ısıtılan kaynatma balonu, Soxhlet aparatı ve bir geri soğutucudan oluşur. Madde selülozik bir kartuş

içinde aparata yerleştirilir ve bunun altındaki balon kısmında ısıtılıp buharlaşması sağlanan çözücü en üstte yer alan geri soğutucu kısmında yoğunlaşarak bitkisel maddenin üzerine damlar. Madde yeterli miktarda çözücüyle ıslandığında, burada biriken çözücü aparatın sifon boynunu aştığında balona geri akar. Etanol, metanol, aseton, petrol eteri, kloroform, n-hekzan ve etil asetat sıklıkla kullanılan çözücüler olmakla birlikte uygun çözücü seçicilik, çözücülük, kaynama noktası, buhar basıncı, maliyet, geri kazanılabilirlik ve güvenlik faktörleri dikkate alınarak seçilir [223]. Çözücünün kaynama sıcaklığı bileşenlerden çok daha düşük olduğundan biyoaktif maddeler balonda birikirken çözücü aynı süreci tekrar gerçekleştirir. Sürecin uzunluğu çözücünün miktarına ve kaynama sıcaklığına, maddenin özelliğine, aparatın alabileceği hacme ve istenen sifon sayısına göre belirlenir. Çoğu zaman aparata dolan çözücünün artık renk almadığı zamana kadar sürdürülürken bazen de süre sifon sayısına bağlı olarak belirlenir.

Soxhlet aparatı kullanılmasa da süreç benzer şekilde ilerler. Seri bağlı ekstraktörler kullanıldığında, bir kademedeki biyoaktif bileşenler yüklenen çözücü bir sonraki kademedeki taze bitkiye gönderilir ve sonunda zenginleşmiş çözücü tek kademeli bir işlemde olduğu gibi çözücü giderme aşamasına geçer. Bitki yağı ile zenginleşen çözücü vakumlu döner buharlaştırıcı gibi bir sisteme alınır ve yağın ayrılması sağlanır. Yöntemin dezavantajları sürecin saatler sürmesi, bu süreçte etken maddelerin sıcaklıkla bozulma ihtimali, çoğu uygulamada karıştırıcı kullanılamaması ve çözücü maliyetidir. Balon içerisine kaynama taşı atılması veya ısıtıcı olarak karıştırmalı bir sistemin kullanılması durumunda ısıtma işlemi daha iyi gerçekleştirilebilir. Organik çözücü kullanıldığında, çözücü giderme ve saflaştırma sürecinin daha dikkatli yürütülmesi çok önemlidir. Bu da sürenin uzamasına ve maliyetin artmasına yol açar. Çalışılan sıcaklığa ve diğer çözünürlük etkenlerine bağlı olarak üründe hem uçucu hem de uçucu olmayan bileşenler bulunabilir.

2.2.2.5. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Percy Spencer'in radyo dalgalarıyla çalışırken keşfettiği mikrodalga kullanarak ısıtma yönteminin patenti 1947'de alınmıştır. Boyu 1 metre ile 1 milimetre arasındaki elektromanyetik dalgalar 300 MHz ile 300 GHz arasındaki frekanslarda yayılır. Laboratuvarlarda bitkisel ürün maddeler üzerinde çalışılırken ise daha çok 2,5-75 GHz frekansı kullanılır. Bu frekanslarda, magnetron adlı parçanın ortama yaydığı iyonlar iyonik moleküler yapılarda gitme-gelme, dipolar yapılarda ise dönme hareketine neden olur. Bu hareketler de moleküllerin ısınmalarını sağlar. Yapılan çalışmalarda, moleküllerin mikrodalga etkisiyle ısınmalarının dielektrik

sabitleriyle, kayıp açılarıyla, kayıp faktörleriyle, magnetrona olan uzaklıklarıyla ilişkili olduğu, polar moleküllerin bulunduğu ortamların ısıtılmasında tercih edilebileceği belirtilmiştir [224]. Organik çözücüler de kullanılabilir olmasına rağmen, bitkilerin ekstraksiyonunda daha çok su kullanılır ve ekstraktöre gönderilen mikrodalgalar sayesinde hem bitkinin içindeki sıvı bileşim hem de çözücü molekülleri moleküler olarak ısınır. Böylece ısıl bozunma yaratmayan, daha hızlı ve daha homojen bir ısıtma ile kontrollü bir şekilde ve daha düşük miktarda çözücü kullanılarak gerçekleştirilebilir. İşlemler genellikle dakikalar içinde tamamlanır. Atmosfer basıncında çalışıldığı gibi basınç kontrollü sistemler de mevcuttur. Yöntem çözücüyle yağların elde edilmesinde veya çözücüsüz uçucu yağ elde edilmesinde kullanılabilir. Bu anlamda bir destilasyon sistemi olarak da tanımlanabilir. Su kullanıldığında mikrodalga destekli hidrodestilasyon, çözücü kullanılmadığında ise çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonu olarak adlandırılan yöntemler günümüzde kullanım alanı genişleyen bitkisel ürün üretim yöntemleri arasında yer almaktadır [225].

2.2.2.6. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu

Maddelerin sıcaklık-basınç faz diyagramlarında üçlü noktalarının dışında sahip oldukları bir nokta da kritik noktalarıdır. Bu noktanın üzerindeki sıcaklık ve basınç koşullarında maddeler sıvı ile gaz arası özelliklere sahiptir. Çözücülük bakımından sıvı çözücülere, difüzyon hızı bakımından gazlara yakın davranış gösteren süperkritik çözücüler ayrıca ekstraksiyon sonrası kolay bir şekilde çözeltiden ayrılıp yüksek saflıkta geri kazanılabilir. Bitkisel maddelerin ekstraksiyonunda en sık kullanılan akışkan CO₂'dir fakat su da kullanılabilir. Sıcaklık ve basıncın ayarlanmasıyla seçiciliği de değiştirilebilen süperkritik çözücü oksidatif bozunmayı ortadan kaldırır. CO₂ kullanıldığında ortam sıcaklığı kadar düşük bir sıcaklıkta, ısıl bozunma olmaksızın, hızlı ve verimli bir işlem gerçekleştirilebilir ve üründe hiçbir safsızlık bulunmaz. Gerekliliklere göre birden fazla madde de çözücü karışımı olarak sisteme beslenebilir. Olumsuz yanları olarak ise maliyetinin yüksek olması ve bazen bir avantaj olsa da çözücü özelliklerinin sıcaklık ve basınçtaki küçük değişikliklerle büyük oranda değişebilmesi nedeniyle kararsız durumlar yaratabilmesidir [226].

2.2.2.7. Basınçlandırılmış sıvı ekstraksiyonu

Sıkıştırılmış veya hızlandırılmış sıvı ekstraksiyonu olarak da adlandırılan yöntemin temel prensibi, yüksek sıcaklıkta çalışarak çözücü maddenin çözme gücünün ve seçiciliğinin artırılmasıdır. Isının etkisiyle bitkisel yapıdaki moleküler bağların çözülmesi, verimin yükselmesi ve işlem süresinin kısılması amaçlanır. Çözücünün sıvı hâlde kalabilmesi için bu

işlem yüksek basınçta gerçekleştirilir. Isının bozucu etkisi karşılaşılması muhtemel sorunlardan biridir. Ayrıca çalışılacak maddenin kuru olması önemlidir. Parça büyüklüğü de verimi etkileyen bir diğer noktadır. Dinamik uygulamada basınçlandırılan çözücü bitkisel maddenin bulunduğu kabın içinden geçirilirken statik uygulama kapalı bir kap içinde kesikli olarak gerçekleştirilir [227].

2.2.2.8. Ultrasonik destekli ekstraksiyon

20 kHz'in üzerinde frekansa sahip dalgalar insan tarafından duyulamadığından ultrasonik dalgalar olarak adlandırılır. Bu dalgalar katı maddelere çarptıklarında geri yansırken sıvı maddelerin içinden geçtiklerinde kavitasyon denen hava kabarcıkları yaratır. Çözücü içerisinde oluşup kaybolan çok sayıda kabarcık şiddetli bir titreşime, ortam içinde hidrostatik basıncın artmasına ve bitkisel dokuların parçalanmasına yol açar. Bu yolla çözücü maddenin difüzyonu, çözme gücü ve elde edilen verim artırılır. Uygulanması iki şekilde olabilir. Dolaylı uygulamada ultrasonik banyo uygulamasında bir su banyosu içerisine yerleştirilmiş bir veya daha fazla kabın içine çözücü ve bitki konulur. Doğrudan uygulamada ise bir kaptaki bitki ve çözücü içerisine prob adı verilen bir parça daldırılır ve cihazın ürettiği titreşimler ortama bu proba iletilir. İlk uygulamada bir kerede birden fazla örnek işlenebilirken ikinci uygulamada işlenemez. Fakat genellikle doğrudan uygulama daha etkili sonuç verir. Ultrasonik dalgalardan, çözücü ekstraksiyonunu geliştirmez için de yararlanılabilir. Sonuç olarak daha hızlı ve daha düşük çözücü gerektiren bir süreç sağlanabilir. Dikkat edilmesi gereken en önemli nokta ise sonikasyon genliği adı verilen ve oluşan titreşimlerin şiddetini belirleyen etmendir. Bunun dışında çözücünün özelliği, işlenen bitkisel maddenin boyutu ve prob kullanılıyorsa bunun fiziksel yapısı da süreci etkileyen diğer etmenlerdir [227], [228].

2.2.2.9. Fitosol ekstraksiyonu

R-134a kısa adıyla da bilinen 1,1,1,2-tetrafloroetan gazı soğutma sistemlerinde kullanım geçmişine sahip bir hidroflorokarbon bileşiğidir. Klorlu florokarbonların ozon tabakasına zararlı etkileri tespit edildikten sonra soğutucu akışkan amacıyla kullanımı önem kazanmıştır. Bununla birlikte ekstraksiyon ortamlarında ilk kez CO₂ ile veya tek başına süperkritik akışkan olarak kullanılmıştır. Kaynama sıcaklığı -26°C olan bu gaz yüksek saflıkta bulunabilmesi, ozona zarar vermemesinin yanı sıra bir organik çözücü işlevi görmektedir. Düşük viskozitesi ve yüzey gerilimine sahip olması işlenecek maddelere daha iyi nüfuz edebilmesine olanak tanır. İşlem, çözücünün sıvı hâlde olduğu herhangi bir sıcaklıkta yürütülebilir fakat daha çok ortam

sıcaklığının biraz altında çalışılır. Üründen ayrılması düşük sıcaklıkta sağlanabildiğinden bitkiden özellikle koku bileşenlerinin elde edilmesinde çok kaliteli ürünler verir [229].

2.2.2.10. Katı-faz mikroekstraksiyonu

Bitkisel ürün üretimine yönelik olmasa da bileşenlerin analizinde kullanılan yeni yöntemlerden biri de katı faz mikroekstraksiyonudur. Kaynaklarda sıvı-katı ekstraksiyonu veya sorbent ekstraksiyonu olarak da geçer. Gıda sanayii için önemli bitkisel girdilerden olan koku ve tat bileşenlerinin analizinin yapılması için 70'li yıllardan itibaren geliştirilen bir tekniktir. Başlıca yararı, çözücü kirliliği yaratabilen, zaman ve maliyet gerektiren bitkiden ilgili bileşenlerin ayrılması, saflaştırılması ve analiz için örnek hazırlanması aşamalarının basitleştirilerek kısaltılmasıdır. Üstelik bu bileşenlerin analizi için gerekli kromatografi yöntemlerinin de kolaylaştırılmasını sağlar. Doğrudan bitkiden alınan 50-100 µl gibi küçük hacimler, bu teknikle çok az miktarda çözücü kullanılarak yüksek saflıkta analiz edilebilir. Temel prensibi ortamda bulunan bileşenlerin özel bir katı adsorban madde tarafından emiliminin sağlanması ve sonra bu maddeden yıkanarak alınıp analizine dayanır. Bitkisel örneklerle ilgili çalışmalarda uygulanan teknikte ise fiber yapılı bir adsorban kullanılır ve bu tekniğin geliştirilmesi 90'lı yıllarda olmuştur. Adsorban olarak sık kullanılan polimer yapılar polidimetilsiloksan (PDMS), divinilbenzen (DVB), poliakrilat (PA), karboksen (CAR), karbovaks (CW) veya bunların karışımlarının silika üzerine kaplanması ile elde edilirler. Özel bir şırıngaya yerleştirilen adsorban fiber yapı doğrudan daldırma uygulamasında işlenecek maddeye daldırılır, tepe boşluklu uygulamada ise maddenin buharıyla temas eder ve ekstraksiyon bu şekilde gerçekleştirilmiş olur. Daha sonra şırınga sıvı kromatografisinde bir çözücü mobil faz veya gaz kromatografisinde ısı kullanılarak desorbe edilir. Olumsuz yanları gaz kromatografisinde 150-280°C gibi düşük sıcaklıklarda çalışma gerekliliği, sıvı kromatografisinde organik çözücülerle yapılarının bozulabilme ihtimali, fiber yapıların fiziksel olarak kolay zarar görebilmesi, alternatifi az ve pahalı, işlemin tekrarlanabilirlik ve seçicilik özelliklerinin düşük oluşudur. Mikroekstraksiyon yönteminde manyetik karıştırıcıdan da yararlanılması mümkündür. Cam üzerine 1 mm'ye kadar PDMS kaplanmış manyetik balık çözelti içerisine atılarak yürütülen yöntemin özellikle karmaşık yapılı maddelerin analizinde şırınga kullanılarak yapılarına göre daha iyi sonuç verdiği düşünülür. Desorpsiyon işlemi yine benzer şekilde yapılır [230]–[232].

2.2.2.11. Sıvı faz mikroekstraksiyonu

Katı faz mikroekstraksiyonuna benzer şekilde, ürün üretimi için olmasa da bileşen analizi için kullanılan, mikrolitreler seviyesindeki hacimlerde yürütüldüğünden düşük kirlilik ve yüksek

saflık sağlayan bir yöntem de sıvı faz mikroekstraksiyonudur. Bu işlem için bitkisel maddenin biyoaktif bileşenlerinin sulu faz içinde bulunması gerekir ve alıcı faz suyla karışmayan organik bir çözücüdür. Asılı damla ekstraksiyonunda örnek içerisinde çözünmeyecek 10 µl kadar bir çözücü şırınga ucunda asılıdır. Olumsuz yanları damla yüzeyinin sınırlı olması, damlanın şırınga ucunda kararsızlığı ve ekstraksiyon kinetiğinin uzun sürmesidir. Analiz edilecek bileşenlerin polariteleriyle buhar basınçlarına ve ekipman gerekliliklerine göre farklı şekillerde uygulanabilir. Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyonunda çözelti içerisine bir dağıtıcı akışkan ve çözücü püskürtülür. Hidrofobik bileşenler küçük damlacıklar şeklinde ortama dağılan organik çözücüye geçer ve santrifüj sonrası ortamdan alınır. Çözücü olarak sudan büyük yoğunluğa sahip klorobenzen, karbon tetraklorür veya tetrakloroetilen, dağıtıcı olarak suyla karışabilen aseton, etanol, metanol veya asetonitril gibi maddeler kullanılır. Yüzen katı organik damla mikroekstraksiyonu, çözelti içerisine gönderilen organik çözücü damlasının mikroşırıngayla tam olarak alınmasının mümkün olmaması nedeniyle geliştirilmiştir. Bu teknikte 10-30°C gibi oda sıcaklığı dolaylarında erime noktasına sahip organik çözücüler kullanılır. Çözelti manyetik olarak bir süre karıştırıldıktan sonra soğutulup biyoaktif maddeleri kazanmış organik çözücünün donması sağlanır. Ortamdan ayrılan katı faz eritilerek analize gönderilir. Oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyonunda boru şeklindeki fiber yapının içi kapiler olarak organik çözücü ile doyurulduktan sonra şırınga sulu çözeltiye daldırılır. Fiber yapı şırınga ucu gibi davranarak karıştırılmalı ortamlarda organik çözücünün kaybolmasını, büyük boyutlu bileşenlerin organik faza geçişini önler. Diğer yandan bu gözenekli yapı ekstraksiyon kinetiğini yavaşlatır ve gerçek ortamlardaki büyük boyutlu moleküller nedeniyle tıkanabilir [232].

3. YÖNTEM

3.1. MALZEME

3.1.1. Sarı Kantaron Otu (*Hypericum perforatum* L.)

Bitki, her yılın Haziran-Ağustos ayları arasında İstanbul'un Şile ilçesi Sofular Köyü Mevkii'nden toplanmıştır. Sabah-öğle saatleri arasında bitkinin toprak üstü kısımları toplanıp hemen çiçek, yaprak ve gövde kısımlarına ayrılmış ve oda sıcaklığında bir hafta boyunca kurutulmuştur. Mutfak robotuyla 1 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülen malzeme kurutma kağıdına sarılarak ışıktan, ısıdan ve nemden uzak bir dolapta saklanmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda bitkinin gövdesinde ve toprak altı kısımlarında yağ bulunmadığı bilindiğinden toplanan bitkilerin sadece çiçeklerinden ve yapraklarından yararlanılmıştır. Yapılan boyut analizinde, çalışılmak üzere kurutulup öğütülen yaprak ve çiçeklerin tane büyüklükleri Tablo 3.1'teki gibi çıkmıştır:

Tablo 3.1: *H. perforatum* L. çiçek ve yapraklarının boyut analizi.

Tane büyüklüğü	Yaprak	Çiçek
...>2 mm	%1,21	%2,92
2 mm>...>1 mm	%31,72	%52,94
1 mm>...>710 µm	%21,77	%29,98
710 µm>...>500 µm	%27,55	%8,49
500 µm>...>355 µm	%10,45	%3,02
355 µm>...>250 µm	%5,01	%1,77
250 µm>...	%2,29	%0,88

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

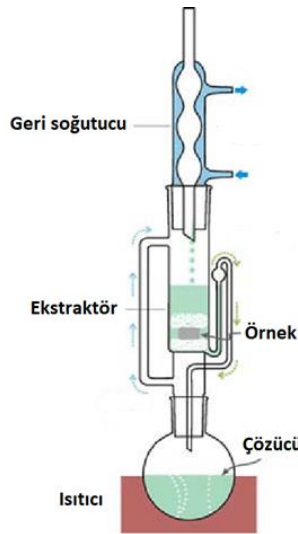
Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerden metil alkol, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, bakır (II) klorür dihidrat, amonyum asetat, amonyum asetat, neokuproin, Folin-Ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat, C vitamini, bütıl hidroksi anisol, bütıl hidroksi tolüen, piridin ve silika jel 60 Merck/Sigma Aldrich ürünü olup analitik saflıktadır. Teknik kalitedeki etil alkol, aseton, diklorometan, kloroform ve asetonitril destillendikten sonra kullanılmıştır.

3.2. EKİPMANLAR

3.2.1. Soxhlet Aparatı

Soxhlet ekstraksiyonu sistemi bir ısıtıcıya yerleştirilmiş ve içinde çözücü bulunan bir balon, içine bir kartuşa konulmuş bitkisel madde bulunan Soxhlet aparatı ve bir geri soğutucudan oluşur (Şekil 3.1). Selülozik kartuşlar bulunmakla birlikte bunun yerine süzgeç kâğıdı gibi bir kâğıt da kullanılabilir. Önemli olan çözücünün etkisiyle parçalanmayacak ve işlenen madde parçalarının geçişine izin vermeyecek olmasıdır. Eğer uygun bir kâğıt kullanılmazsa veya kartuşa fazla madde konulursa bitki parçaları aparatın sifon kısmını tıkayabilir. Hücrede çözücü birikirse hem ekstraksiyon süreci bozulur hem de balonda sıvı tükenmesi gibi bir durumda can ve mal güvenliği tehlikeye düşebilir.

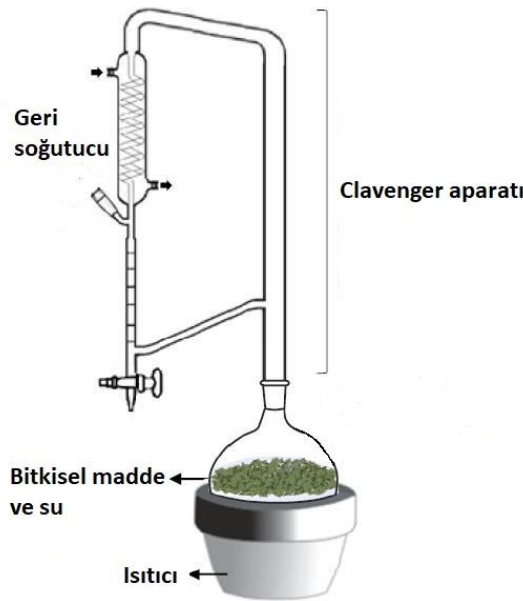
Çözücünün kaynama sıcaklığı bileşenlerden çok daha düşük olduğundan biyoaktif maddeler balonda birikirken çözücü aynı süreci tekrar gerçekleştirir. Sürecin uzunluğu çözücünün miktarına ve kaynama sıcaklığına, maddenin özelliğine, aparatın alabileceği hacme ve istenen sifon sayısına göre belirlenir. Çoğu zaman aparata dolan çözücünün artık renk almadığı zamana kadar sürdürülürken bazen de süre sifon sayısına bağlı olarak belirlenir. Sonunda, bitki yağı ile zenginleşen çözücü vakumlu döner buharlaştırıcı gibi bir sisteme alınır ve yağın ayrılması sağlanır. Yöntemin dezavantajları sürecin saatler sürmesi, bu süreçte etken maddelerin sıcaklıkla bozulma ihtimali, çoğu uygulamada karıştırıcı kullanılamaması ve çözücü maliyetidir. Balon içerisine kaynama taşı atılması veya ısıtıcı olarak karıştırmalı bir sistemin kullanılması durumunda ısıtma işlemi daha iyi gerçekleştirilebilir.



Şekil 3.1: Soxhlet aparatı.

3.2.2. Clevenger Aparatı

Genel olarak bitkilerden uçucu yağın destilasyonunda farklı çözücülerin kullanımı mümkündür. Fakat çözünürlük, uçucu yağ-çözücü karışımının ayrılması, maliyet ve güvenlik gibi açılardan suyun kullanımı öne çıkmaktadır. Bu yüzden uçucu yağ üretimi konusunda çok uzun zamandır kullanılan yöntemlerden biri hidrodestilasyondur. Bu yöntemde Clevenger aparatı kullanılarak uçucu yağ kazanılmaktadır (Şekil 3.2). Bir balon içerisine yeterli miktarda suyla birlikte yerleştirilen bitkisel madde yavaş yavaş ısıtılır. Su ısındıkça buharlaşma hızı artar. Bu sırada sıcaklığın etkisiyle uçucu yağın bitki dokularından dışarıya sızması da arttığından zaman geçtikçe buharlaşan sıvıda daha fazla uçucu yağ bileşeni görülür. Aparatın geri soğutucu kısmında yeniden sıvı hâle dönen karışım aparatta birikir. Aparatın birikme borusunda su alt fazı oluştururken, uçucu yağ fazı bunun üstündedir. Farklı tasarımlarda aparatlar bulunmaktadır. Toplama kısmındaki su miktarının seviyesi arttıkça bir yan boru vasıtasıyla balona geri beslenir. Böylece ürünlerdeki uçucu yağ oranı artar. Sürecin ne kadar süreceği işlenen bitkisel yapıya bağlıdır. Kök, gövde, dal gibi sert parçalar daha uzun, yaprak, çiçek, tomurcuk gibi kısımlar ise daha kısa işlemler görür. Uygulamalar genellikle yarım saat ile birkaç saat arasında sürer. Süreçte dikkat edilmesi gereken noktalar, balonda taşma olmaması, bitkisel maddenin yanmaması ve balona yapışmamasıdır. Uçucu yağın daha iyi ayrılabilmesi için toplama kısmındaki suyun üzerinde faz ayrımı sağlayacak ksilen veya hekzan gibi bir madde koyulabilmektedir.



Şekil 3.2: Hidrodestilasyon için kullanılan bir Clevenger aparatı.

3.2.3. Çalkalamalı Su Banyosu

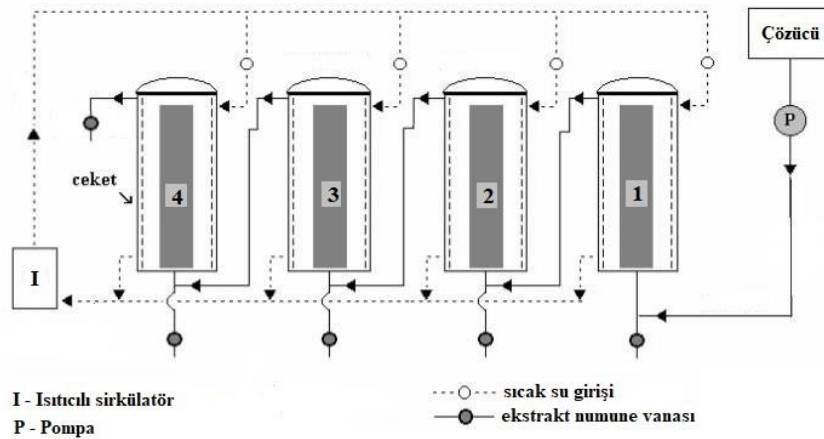
Isıtmalı bir sisteme sahip olan su banyosu aynı zamanda mekanik bir düzencele hareket ettirilen yuvalara sahiptir (Şekil 3.3). Yuvalara yerleştirilen erlenler içindeki çözücü-bitki karışımları bu mekanik hareket sayesinde çalkalanarak daha hızlı bir şekilde etkileşime geçer. Yuvaların boyutu nedeniyle en fazla 100 ml’lik erlenler kullanılabilir olsa da cihazın büyüklüğüne göre aynı anda 12-15 ekstre hazırlanabilir. Soxhlet ekstraksiyonuna göre avantajı çözücü sıcaklığının sabit tutulabilmesi, çeşitli sıcaklıkların ve aynı anda birden fazla çözücünün denenebilmesidir. Sıcaklığın çözünürlüğü ve ekstraksiyon verimini artırmasının yanı sıra ısıl bozulmaya da sebep olabileceğinden ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi oldukça önemlidir.



Şekil 3.3: Çalkalamalı su banyosu.

3.2.4. Batarya Tipi Ekstraktör

Batarya tipi ekstraktörler çok sayıda ekstraksiyon ünitesinden oluşur ve kademe sayısı isteğe bağlı olarak belirlenebilir. Çalışmada kullanılan sistem pirinç alaşımdan yapılmış kolonlara sahiptir. Şekil 3.4’te batarya tipi ekstraksiyon sisteminin şeması görölmektedir.



Şekil 3.4: Batarya tipi ekstraksiyon sistemi.

Ceketten (i kolon ile dış kolon arasından) çalışma sıcaklığını sağlayan su geçirilmiştir. Suyun dolaşımını sağlayan ısıtıcı sirkülatör ve cam yünü ile kaplı kolonlar sayesinde çalışma

sıcaklığı ayarlanan sıcaklıktan sapmamaktadır. Kolonların yapıldığı malzeme çalışma koşullarına uygundur. Her bir kolonun altında bulunan vana sayesinde her kademedan numune alınabilir ve kolon sayısı ile ekstraksiyon verimi arasındaki ilişki belirlenebilir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Batarya tipi ekstraktör.

İlk kolona beslenen taze çözücü bitkinin içerdiği etken maddelerle yüklenerek belirlenen sayıda kolondan geçer ve dışarı alınır. Bu aşamada çözücünün geri kazanılması hem ürünün saflığı hem maliyet hem de çevrenin korunması açısından önemlidir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi vakumlu döner buharlaştırıcıda çözücü yağdan ayrılır ve destillenip tekrar kullanılabilir.



Şekil 3.6: Vakumlu döner buharlaştırıcı.

3.2.5. UV-Vis Spektrofotometresi

Toplam hiperisin oranının belirlenebilmesi için UV-Vis spektrofotometresi cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.7). Kuartz küvetlere alınan numunelerin absorbansı kendi çözücülerinin şahitliğinde 590 nm’de ölçülmüştür.



Şekil 3.7: UV-Vis spektrofotometresi.

3.2.6. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

GC-MS analizinin yapıldığı cihaz Thermo Finnigan LSQ modelidir (Şekil 3.8). Kullanılan kolon ZB-5MS 0,25 μ m film kalınlığıyla %5 fenil arilen-%95 dimetil polisiloksan sabit faza sahip ve 30 m $\times$ 0,25 mm, boyutundadır. Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dk helyum kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C, split akış hızı 10 ml/dk, elektron iyonizasyon kaynağı 70 eV, m/z oranı 35-425’tir. Fırın sıcaklığı 2 dk 70°C’de bekleme, 10°C/dk ile 150°C’ye çıkış, 150°C’de 15 dk bekleme, 5°C/dk ile 240 °C’ye çıkış şeklinde programlanmıştır.



Şekil 3.8: GC-MS cihazı.

3.2.7. İnce Tabaka Kromatografisi

Hiperisin saflaştırma işleminde kullanılan kolon kromatografisinde kullanılacak çözücü karışımının seçilmesi için önce ince tabaka kromatografisi işlemi uygulanarak karışımların etkinliği incelenmiştir. Bunun için kullanılan tabakalar Merck marka 200 µm kalınlığa sahip alüminyum destekli silika jel 60 kaplı TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ ürünüdür. Tabakada oluşan izler mor ötesi ışık altında incelenmiştir.

3.2.8. Kolon Kromatografisi

Hiperisin saflaştırma işleminde kullanılan kromatografi kolonu Borucam marka 3 cm iç çapa ve 40 cm uzunluğa sahip teflon musluklu üründür. Musluğun kolon maddesiyle tıkanmaması için en alta pamuk, bunun üzerine akvaryum kumu ve silika jel 60 kolon dolgu malzemesi yerleştirilmiştir.

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. Uçucu Yağ Eldesi

Bitkinin uçucu yağının elde edilmesinde hidrodestilasyon yöntemi kullanılmıştır. Su buharı veya buhar destilasyonu yöntemlerine göre daha yüksek verim elde edilebilen bu yöntem, çalışmalarda, çiçekleri oldukça hassas olan bitkinin taze hâli yerine daha dayanıklı ve aktarlarda satılan ürünlere daha benzer olduğundan kuru hâlinin kullanımına da uygundur. Clevenger aparatı kullanılan yöntemde, 1 litrelik cam balona 500 ml saf su, 20 g kuru ve öğütülmüş bitkisel madde konmuştur (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Hidrodestilasyon işlemi (sağda) ve uçucu yağ (solda).

Isıdan dolayı oluşabilecek zararı en aza indirmek için balon ısıtıcı düşük kademede çalıştırılmış ve ısının daha homojen dağılımı için balona birkaç adet porselen kaynama taşı eklenmiş ve cam balonun üzeri alüminyum folyoyla kapatılmıştır. Geri soğutucuya bağlı sirkülatörün sıcaklığı 10°C'ye ayarlanmıştır. Aynı şekilde gerçekleştirilen birkaç denemede çok az uçucu yağ elde edilebilmiş, bunlar da ya suyla karışmış ya da alınırken Clevenger aparatının iç cidarında kaybolmuştur. Bu yüzden son deneme, aparatın ürün toplama borusundaki suya 1 ml n-hekzan damlatılarak çalışılmıştır. Suyun üzerinde kalan n-hekzan fazı, uçucu yağın suda dağılmasını engellemiştir. 3 saatlik işlem sonunda, ürünün buharlaşıp uçmaması için yarım saat kadar bekledikten sonra soğumuş borudan bir miktar suyla birlikte bir tüpe alınan ürün 4500 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve üst faz şırıngayla alınıp cam bir örnek kabına aktarılmıştır. Kaba birkaç mg kadar Na₂SO₄ eklenip GC-MS analizine gönderilene kadar streç filme sarılı hâlde buzdolabında bekletilmiştir.

3.3.2. Toplam Hiperisin Ölçümü

Bitkinin toplam hiperisin içeriğinin ölçümünde UV-Vis spektrofotometresinden yararlanılmıştır. Alman İlaç Kodeksi'nin 1986'da yayımlanan versiyonunda *H. perforatum* L. bitkisinin toplam hiperisin içeriğinin 590 nm'de yapılan spektrofotometrik ölçümle belirlenebileceği belirtilmiştir [186]. Bu dalga boyunda hiperisinin spesifik absorbens değeri olarak 780 değeri belirlendiğinden hiperisin içeriği formülü şu şekilde verilmiştir:

$$\%g \text{ Hiperisin} = \frac{\text{Abs} \cdot 100}{780 \cdot m} \quad (3.1)$$

Burada Abs örneğin 590 nm'de ölçülen absorbens, m ise 100 ml ekstredeki bitki miktarıdır.

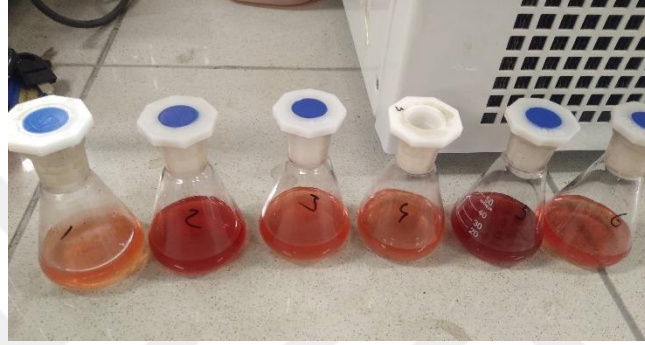
Bazı çalışmalarda ise aynı formül için absorbens ölçümü 587 nm'de yapılmıştır [198], [200].

Naït-Si ve Fourneron (2004) ise UV-Vis spektrometresinde 220-740 nm arasındaki dalga boylarında ölçüm yaparak sarı kantaron otunun hiperisin ve psödohiperisin içeriğinin en iyi pik verdiği nokta olarak 588 nm'yi belirlemiştir [233]. Tatsis ve diğ. (2008) de benzer şekilde 588 nm'deki absorbens üzerinden çalışmıştır [234]. Smelcerovic ve diğ. (2002) [211], Cossuta ve diğ. (2012) [196] ve Heinrich ve diğ. (2017) [57] hesaplamada farklı formüller kullanmasına rağmen 590 nm'deki dalga boyunda çalışmışlardır.

Çalışmamızda ürünlerin absorbens 590 nm'de ölçülmüş ve üstte verilen formül kullanılmıştır.

3.3.3. Çalkalamalı Su Banyosunda Ekstraksiyon

Bu yöntemde çalkalamalı su banyosu kullanılarak hem sıcaklığın ekstraksiyon süreci üzerine etkisi incelenmiş hem de çözücülerle bitkisel maddenin daha yüksek oranda temas etmesi sağlanarak verimin artırılması sağlanmıştır. 25 ml'lik erlenlerde 20 ml çözücü ile 1 g kurutulup öğütülmüş bitkisel madde kullanılmıştır. Etanol, metanol, aseton ile su karışımları kullanılarak elde edilen ürünler toplam hiperisin içerikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma, ekstrelerin süzöntüsünden alınan örneklerin toplam hiperisin ölçümü yapılmıştır. Şekil 3.10'da bazı ekstreler görülmektedir.



Şekil 3.10: Çalkalamalı su banyosunda ekstraksiyon ürünleri.

3.3.4. Soxhlet Ekstraksiyonu

Çalkalamalı su banyosunda yapılan denemelerde küçük miktarda çalışıldığından, antioksidan ölçümleri için gerekli ürünü sağlamak için Soxhlet ekstraksiyonu yapılmıştır. 250 ml'lik Soxhlet aparatının altına yerleştirilen 1 litrelik balona 500 ml çözücü konmuş, aparata kartuş içinde 5 g kuru ve öğütülmüş madde yerleştirilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Soxhlet ekstraksiyon işlemi.

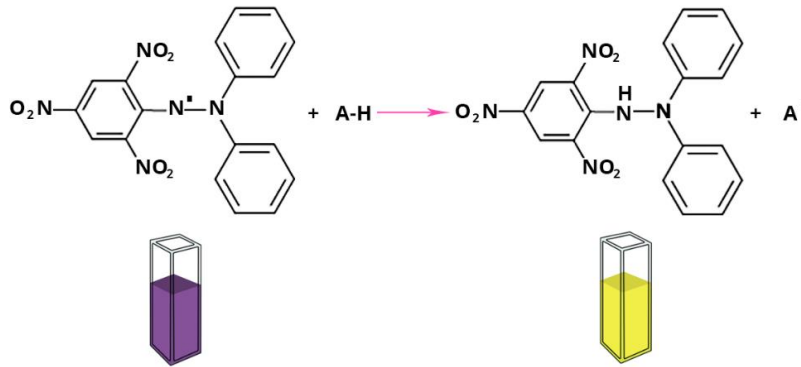
Çözücü olarak antioksidan ölçümlerine uygun olacak şekilde su, etanol ve su-etanol karışımı (hac. %50) kullanılmıştır. Ortalama 4 saat kadar süren işlem, aparatta biriken çözücünün rengi açılana kadar devam ettirilmiştir. Alınan ekstrelerin çözücüsü vakum altında buharlaştırıldıktan sonra ürünler vakum etüvünde kurutulmuştur. Kuru maddelerin kendi çözücülerinde 1 g/ml derişime seyreltilmesiyle elde edilen çözeltilerin toplam hiperisin ölçümü yapılmıştır.

3.3.5. Batarya Tipi Ekstraktörde Ekstraksiyon

Çalkalamalı sistemden elde edilen verilere ve literatüre bakılarak maliyet de göz önüne alındığında hacimce %50'lik etil alkol-su karışımının çözücü olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Sistemin kolonları, sirkülasyon cihazı yardımıyla ceketlerinden 55°C'de su geçirilmesiyle çalışma sıcaklığına ısıtılmıştır. Isı kaybını önlemek amacıyla, çözücü karışımı da sisteme beslenmeden önce bu cihazın su banyosundan geçirilmiştir. Çözücü akış hızının, çalışma sıcaklığının ve kolon sayısının hiperisin verimine etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Sistemin dinamiğinin anlaşılması için her kolondan periyodik olarak alınan örneklerin absorbensı UV-Vis spektrofotometresinde ölçülmüştür.

3.3.6. DPPH Radikalı Süpürme Kapasitesi

Kurutulmuş Soxhlet ekstraksiyonu ürünleri 50 ml hacimde ve 1 mg/ml derişime sahip olacak şekilde kendi çözücülerinde çözülerek stok çözeltiler elde edilmiştir. 1 mM derişimdeki DPPH çözeltisi, metanol içinde 0,03942 g DPPH'ın çözünmesi ve hacmin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Standart olarak kullanılan BHA, BHT ve C vitamini stok çözeltileri de 1 mg/ml olacak şekilde etanolla 100 ml hacimde hazırlanmıştır. Örnek ve standart çözeltileri 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml derişimlerine seyreltilmiştir. Cam tüplere 3'er ml DPPH çözeltisi alınıp üzerlerine her bir çözeltiden 1,5 ml eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk beklendikten sonra 517 nm'de ölçülen absorbenslar metanole karşılık okunmuştur. Bu sırada çözeltilerin mor rengi açılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: DPPH radikalının reaksiyonu [221].

3 ml DPPH çözeltisi+1,5 ml metanol ile hazırlanan çözelti ise antioksidansız baz çözelti olarak kullanılmış ve aşağıdaki formüle göre % DPPH süpürme gücü hesaplanmıştır:

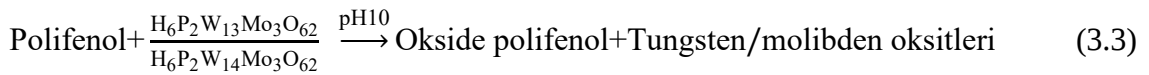
$$\%DPPH \text{ süpürme gücü} = \frac{Abs_{baz} - Abs_{örnek}}{Abs_{baz}} \quad (3.2)$$

3.3.7. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi

DPPH inhibisyon ölçümünde kullanılan seyreltik örnek ve standart madde çözeltileri kullanılmıştır. Bu yöntemde standart madde olarak BHT kullanılmamıştır. Reaktanların hazırlanışı şu şekildedir: 10 mM CuCl₂ çözeltisi 0,17048 g CuCl₂•2H₂O suyla 100 ml'ye, 1M amonyum asetat çözeltisi 7,708 g amonyum asetat suyla 100 ml'ye, 7,5 mM neokuproin çözeltisi 0,156 g neokuproin %96'lık etanolle 100 ml'ye tamamlanmıştır. Sırasıyla 1'er ml CuCl₂, neokuproin, NH₄Ac ve örnek/standart madde cam tüplere eklendikten sonra hacimler saf su ile 4,1 ml'ye tamamlanmıştır. Karışımlar çalkalandıktan sonra 30 dk boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilmiş ve 450 nm'de absorbanslar saf suya karşı ölçülmüştür.

3.3.8. Toplam Fenolik Madde İçeriği

Hidroksil grupları sayesinde antioksidan etki gösteren fenoller hayvansal dokularda üretilemedikleri için bitkisel destek ürünlerinin vazgeçilmez bileşenlerindendir. Birçok bitkinin antioksidan aktivitesinin başlıca sağlayıcısı da fenolik maddelerdir. Antienflamatuvar ve antikarsinojenik özellikleri sayesinde de metabolizmaya yararlıdırlar. Antosiyaninler, flavonoidler, fenolik asitler gibi farklı bileşik türleri ayrı ayrı değil tümü birlikte ölçülür ve farklı standart maddelerin eşdeğeri olarak verilir. Bu standart maddelerden en çok kullanılanları kuersetin, kuersitrin, siyanidin, klorojenik asit, p-kumarik asit, gallik asit, pirokateşol gibi maddelerdir. Bir polifenol maddenin Folin-Ciocalteu reaktifiyle girdiği reaksiyon şöyledir:



Soxhlet ürünlerinin toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle hesaplanmıştır. Standart madde olarak kullanılan pirokateşolün çözeltileri saf suyla 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml derişimlerde, örnekler ise 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml derişimlerde hazırlanmıştır. Kütlece %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi 0,1 N NaOH çözeltisi içinde 100 ml hacimde hazırlanmıştır. Folin reaktifi saf suyla 3 katı hacme seyreltilmiş ve 4,5 ml çözelti elde edilmiştir. Cam tüplere alınan 0,1 ml örnekler/pirokateşol üzerine 4,5 ml saf su ve 0,1 ml seyreltik Folin reaktifi eklenmiştir. 3 dk beklendikten sonra tüplere 0,3 ml Na₂CO₃ de eklenerek çalkalanmış ve 2 saat

oda sıcaklığındaki karanlık ortamda bekletilmiştir. Absorbanslar 760 nm’de saf suya karşı okunmuştur. Örneklerin toplam fenolik madde içeriği pirokateşol eşdeğeri olarak tespit edilmiştir.

3.3.9. İnce Tabaka Kromatografisi

Literatürde görülen farklı çözücü karışımları Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen etanol-su ekstresinin kuru maddesinden hiperisinin saflaştırılmasında denenmiştir. Karışımların etkinliğini gözlemek için 200 µm kalınlığa sahip alüminyum destekli silika jel 60 tabakalar kullanılmıştır. Kloroform-metanol (8:1), kloroform-asetonitril (1:1), etanol-asetonitril (1:1) ve metanol-aseton-diklorometan (75:10:15) çözücü karışımları kullanılarak Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen etanol-su ekstresinin kuru maddesi ince tabaka üzerinde yürütülmüştür. Tabaka üzerinde oluşan izler mor ötesi ışık altında incelenmiştir.

3.3.10. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisinde mobil faz olarak, ince tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü karışımları arasından hiperisin ayırımında gösterdiği etkinlik nedeniyle metanol-aseton-diklorometan (75:10:15) seçilmiştir. Sabit faz olarak silika jel 60 kullanılmıştır. Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen etanol-su ekstresinin kuru maddesi kolonda yürütülerek hiperisin içeren faz toplanmış ve çözücüsü buharlaştırılmıştır. Elde edilen son ürün tartılarak verim, bu ürün etanol-su içinde çözülüp spektrofotometrik olarak ölçülerek saflaştırma etkinliği hesaplanmıştır.

3.3.11. Kristallendirme

Hiperisinin saflaştırılmasında kullanılan diğer yöntem piridinle kristalizasyon yöntemidir. Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen etanol-su ekstresinin kuru maddesi metanol içinde çözüldükten sonra metanol-HCl karışımıyla hacmen %5 oranında asitlendirilmiştir. Bir gün boyunca buzdolabında kristallerin oluşması için bekletilen karışım süzüldükten sonra elde edilen katı madde kurutulmuştur. Kurutulan ürün piridinle yıkanıp oluşan kristallerin saf olarak elde edilebilmesi için piridin buharlaştırılmıştır. Elde edilen son ürün tartılarak verim, bu ürün etanol-su içinde çözülüp spektrofotometrik olarak ölçülerek saflaştırma etkinliği hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. UÇUCU YAĞ

Hidrodestilasyonla elde edilen yaprak uçucu yağı %0,58 (g/g) çiçek uçucu yağı %0,27 (g/g) verimle elde edilmiştir. Yaprakların uçucu yağının %92'sinde 52 bileşen (Tablo 4.1) bulunurken çiçeklerin uçucu yağında aynı oran 54 bileşen (Tablo 4.2) içermiştir.

Tablo 4.1: *H. perforatum* L. yaprak uçucu yağının bileşenleri.

No	Bileşik	[%]	No	Bileşik	[%]
1	2-Metil-oktan	34,93	27	γ -Muurolen	0,26
2	Nonan	3,00	28	β -Selinen	0,95
3	α -Pinen	5,55	29	α -Selinen	0,42
4	13-Heptadesin-1-ol	0,39	30	<i>trans</i> -Muurola-4(14),5-dien	0,34
5	3-Metil-nonan	5,58	31	γ -Kadinen	0,39
6	β -Pinen	0,25	32	δ -Kadinen	0,20
7	2,6-Dimetil-2-heptanol	0,48	33	α -Kalakoren	0,26
8	<i>p</i> -Simen	0,21	34	Isopaçulen	0,82
9	Limonen	7,24	35	(<i>E</i>)-Veltonal	0,40
10	2-Metil-dekan	3,03	36	Laurik asit	0,48
11	<i>cis</i> -Linalool oksit	0,15	37	Spatulenol	2,07
12	1-Oktanöl	0,19	38	Karyofilen oksit	1,12
13	<i>trans</i> -Linalool oksit	0,27	39	Dodekanoik asit etil ester	0,34
14	Undekan	1,36	40	α -Sedrol	1,64
15	2,4,6-Trimetil dekan	0,24	41	β -Eudesmol	0,29
16	Isopulegol	0,11	42	Siklotetradekan	9,12
17	2-Isononenal	0,10	43	1-Tetradekanöl	3,15
18	α -Terpineöl	0,13	44	Guaiazulen	0,66
19	D-Verbenon	0,15	45	Tetradekanoik asit etil ester	0,40
20	β -Siklositral	0,15	46	Hekzahidrofarnesil aseton	0,64
21	L-Mentilasetat	0,19	47	(5 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)-Farnesil aseton	0,13
22	β -Burbonen	0,13	48	Hekzadekanoik asit metil ester	0,32
23	Longifolen	0,18	49	n-Hekzadekanoik asit	0,75
24	<i>trans</i> - β -Karyofilen	0,26	50	Fitöl	0,65
25	(+)- α -Himaşalen	0,15	51	Linoleik asit etil ester	0,70
26	1-Dodekanöl	0,61	52	1-Eikosanöl	0,47
Toplam					92,00

Yaprak uçucu yağının başlıca bileşenleri 2-metil oktan (%34,93), siklotetradekan (%9,12), limonen (%7,24), 3-metil nonan (%5,58), α -pinen (%5,55), 1-tetradekanöl (%3,15), 2-metil dekan (%3,03), nonan (%3,0) ve spatulenol (%2,07) olmuştur. *H. perforatum* L. yapraklarında

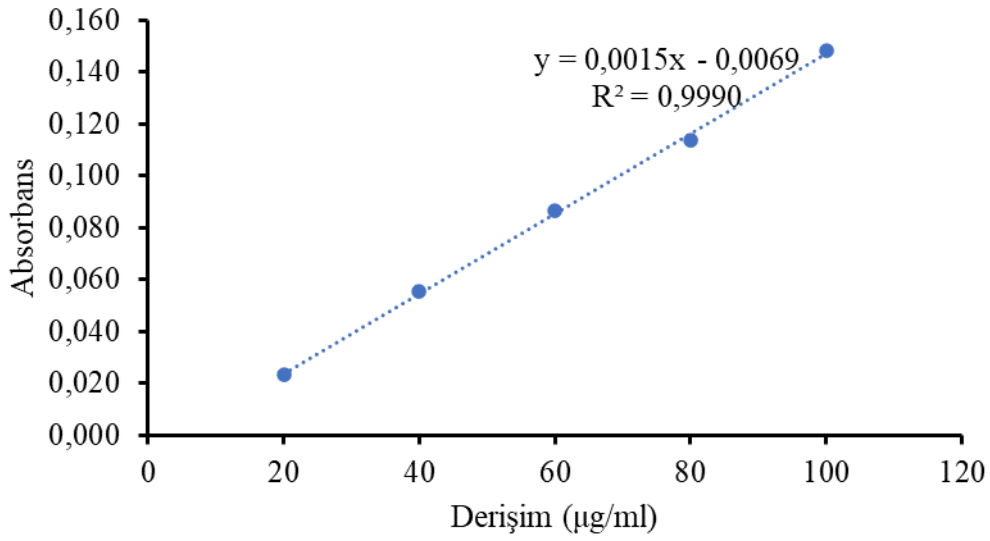
görülen bileşenlerin 20'si non-terpen (%65,64), 13'ü monoterpen (%15,45) ve 19'u seskiterpen (%10,71) olmuştur. Terpenik olmayan hacimde ağırlıklı olarak bulunan bileşik sınıfları izoalkanlar (%0,10), alkanlar (%48,14), sikloalkanlar (%9,12), alkoller (%5,29) ve yağ asitleriyle bunların esterleridir (%2,99). Çiçek uçucu yağında öne çıkan bileşenler ise şunlardır: 2-Metil oktan (%52,81), α -pinen (%4,65), 1-hekzadekanol (%4,47), miristil alkol (%2,99), verbenon (%2,28), 2,6-dimetil heptanol (%2,17). Terpenik bileşenlerin 4'ü monoterpen (%7,36), 11'i seskiterpen (%4,25) ve 9'u terpenoid (%3,88) iken non-terpen bileşenler alkanlar (%58,37), alkoller (%4,25), yağ asitleri (%5,22) ve aldehitlerdir (%1,61).

Tablo 4.2: *H. perforatum* L. çiçek uçucu yağının bileşenleri.

No	Bileşik	[%]	No	Bileşik	[%]
1	2-Metil-oktan	52,81	28	γ -Kadinen	0,21
2	Nonan	1,85	29	1-Dodekanol	1,12
3	α -Pinen	4,65	30	β -Selenin	1,14
4	3-Metil-nonan	1,89	31	α -Selenin	0,42
5	β -Pinen	0,12	32	δ -Kadinen	0,28
6	Limonen	0,11	33	Etil dekanolat	0,41
7	2,6-Dimetil-2-heptanol	2,17	34	Isopaçulen	0,30
8	2,2-Dimetil-3-heptanol	0,13	35	γ -Himaşalen	0,32
9	4-Nonanol	0,17	36	Farnesil bromid	0,41
10	2-Metil-dekan	0,99	37	Miristil alkol	2,99
11	2-Nonanol	0,15	38	α -Sedrol	1,12
12	Undekan	0,30	39	Guayazulen	0,84
13	Kemferol	0,2	40	1-Hekzadekanol	4,04
14	1-Nonanol	0,13	41	Khusinol	0,33
15	Verbenol	0,64	42	Etil miristat	0,30
16	2-Isononenal	0,25	43	Isokurkumenol	0,13
17	p-Mentha-1,5-dien-8-ol	0,49	44	Oktadekanal	1,36
18	Verbenon	2,28	45	1-Tetradekanol	0,43
19	3-Dodekanol	0,29	46	2-Metil-1-hekzadekanol	0,17
20	2-Metil dodekan	0,35	47	Metil palmitat	0,39
21	Isotimol	0,12	48	Hekzadekanoik asit	0,20
22	Timol	0,24	49	Etil palmitat	1,63
23	Isolongifolene	0,11	50	7,10-Oktadekadienoik asit metil ester	0,16
24	Sedren	0,18	51	Dokosan	0,18
25	<i>Trans</i> -Karyofilen	0,43	52	Fitol	0,51
26	Zingiberen	0,16	53	Oleik asit	0,12
27	1-Undekanol	0,14	54	Etil linoleat	1,57
28	β -Karyofilen	0,16			
Toplam					92,29

4.2. TOPLAM FENOLİK MADDE İÇERİĞİ

Folin-Ciocalteu yöntemiyle yapılan toplam fenolik madde içeriği tayininde standart madde olarak pirokateşol kullanılıp çizilen kalibrasyon eğrisine göre bu madde eşdeğerliğinde toplam fenolik madde içeriği tespit edilmiştir. Bitkinin fenolik madde içeriği pirokateşole göre oldukça düşüktür. Bu yüzden 200-1000 µg/ml derişim aralığındaki ekstrelerin pirokateşol eşdeğerliği, standart maddenin 20-100 µg/ml derişim aralığı için kurulmuştur. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1’de verilmiştir.

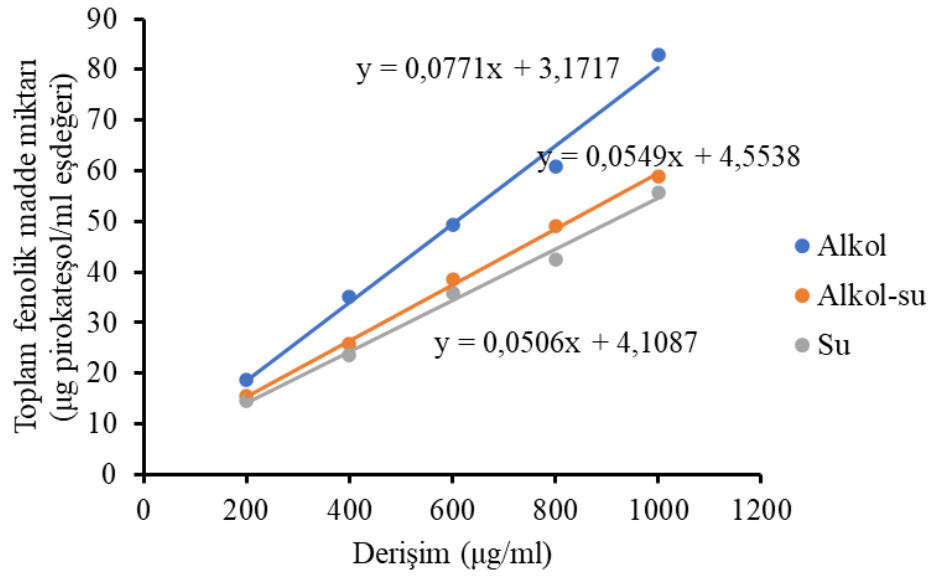


Şekil 4.1: Toplam fenolik madde içeriği için çizilen pirokateşol kalibrasyon eğrisi.

Yaprakların Soxhlet ekstrelerinin toplam fenolik madde içeriği Tablo 4.3’te ve Şekil 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.3: *H. perforatum* L. yapraklarının toplam fenolik madde içeriği

Derişim (µg/mL)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (µg pirokateşol/mg ekstre)*		
	EtOH/Su (1:1)	EtOH	Su
1000	58,83	82,96	55,78
800	48,99	60,94	42,43
600	38,45	49,22	35,87
400	25,80	35,17	23,69
200	15,49	18,77	14,56

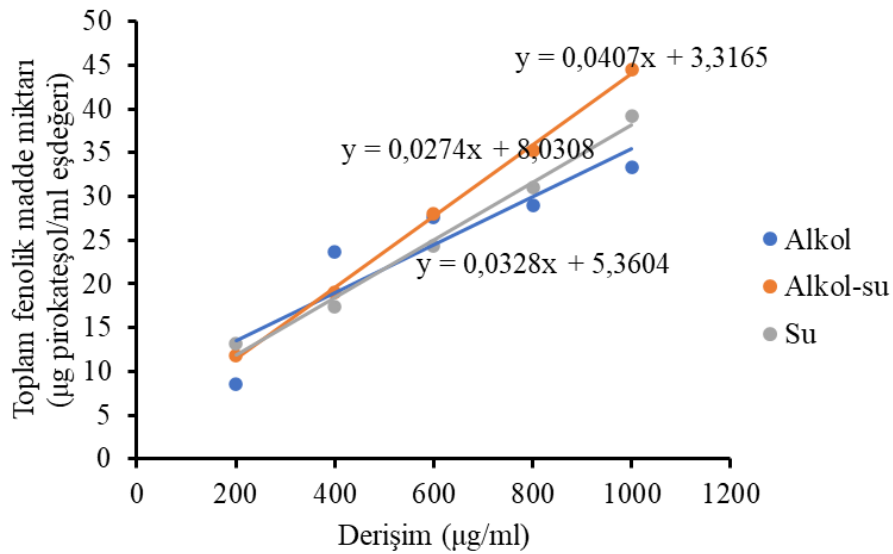


Şekil 4.2: *H. perforatum* L. yapraklarının pirokateşol eşdeğeri toplam fenolik madde içeriği.

Bitkinin çiçeklerinin Soxhlet ekstralarının toplam fenolik içerikleri Tablo 4.4'te ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.4: *H. perforatum* L. çiçeklerinin toplam fenolik madde içeriği.

Derişim (µg/mL)	Toplam Fenolik Madde İçeriği (µg pirokateşol/mg ekstre)*		
	EtOH/Su (1:1)	EtOH	Su
1000	44,52	30,93	39,24
800	35,29	29,02	31,00
600	28,04	27,71	24,41
400	19,13	23,75	17,49
200	11,88	8,58	13,20



Şekil 4.3: *H. perforatum* L. çiçeklerinin pirokateşol eşdeğeri toplam fenolik madde içeriği.

4.3. ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ

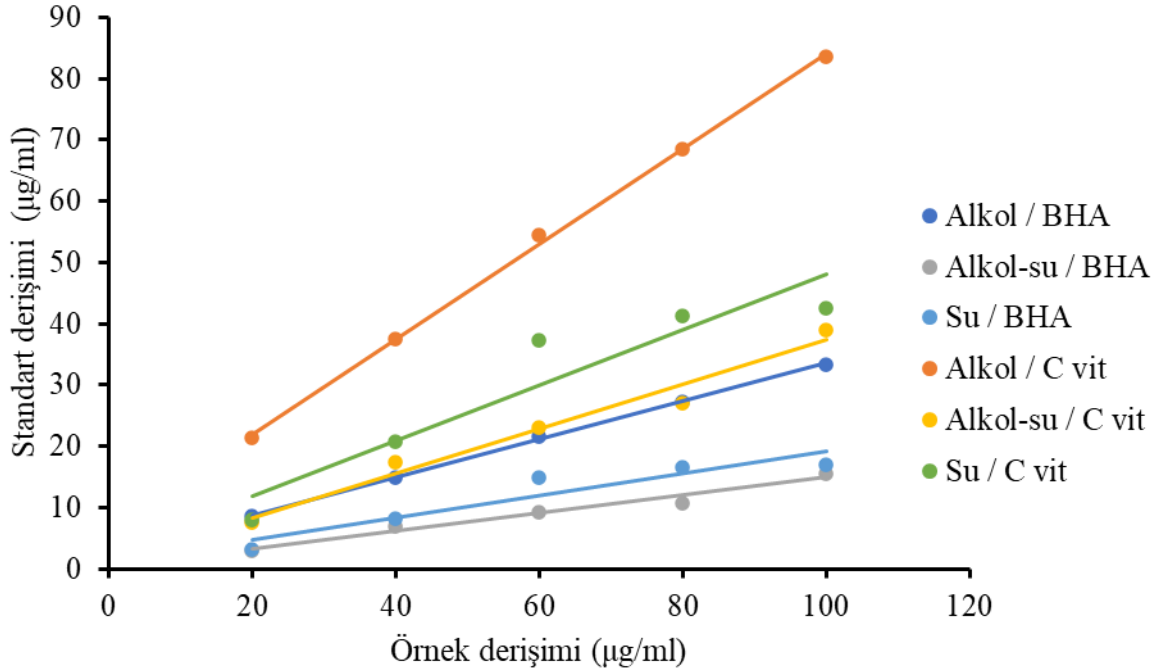
4.3.1. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi

CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasitelerine bakıldığında sarı kantaron otunun yaprakları için etanolle ekstraksiyon, çiçekleri için ise etanol-su ile ekstraksiyon verimli olmuştur. Yaprakların antioksidan aktivitesi BHA'dan oldukça düşük olmuştur. C vitamini ise düşük derişimlerde önünde olduğu ekstrelerin derişimi yükseldikçe geride kalmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: CUPRAC yöntemine göre *H. perforatum* L. yaprak ekstreleriyle standart maddelerin absorbanları.

Derişim (µg/ml)	450 nm'de ölçülen absorbanlar				
	EtOH	EtOH-Su	Su	BHA	C Vitamini
100	0,486	0,227	0,248	1,220	0,829
80	0,398	0,158	0,241	1,113	0,618
60	0,317	0,135	0,217	0,919	0,168
40	0,219	0,101	0,121	0,716	0,095
20	0,124	0,044	0,046	0,400	0,035

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi, yaprak ekstreleri BHA'ya göre 3-5 kat, C vitamini göre yaklaşık 1-3 kat daha düşük aktivite göstermiştir. Özellikle etanollü ekstre C vitamini göre %83 (100 µg/ml) ile %105 (20 µg/ml) oranında bir aktiviteye sahiptir.



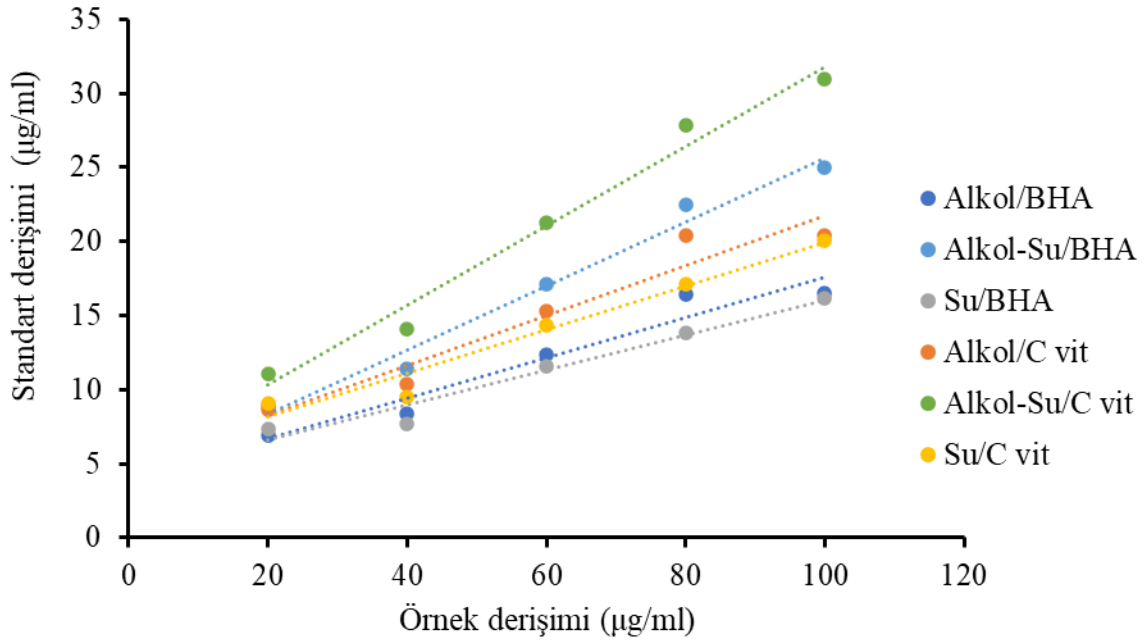
Şekil 4.4: *H. perforatum* L. yapraklarının CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasiteleri.

H. perforatum L. çiçeklerinin etanol-su karışımıyla hazırlanan ekstreleri diğer ekstrelerle göre daha yüksek absorbans göstermiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: CUPRAC yöntemine göre *H. perforatum* L. çiçek ekstreleriyle standart maddelerin absorbansları.

Derişim (µg/ml)	450 nm'de ölçülen absorbanslar				
	EtOH	EtOH-Su	Su	BHA	C Vitamini
100	0,406	0,615	0,397	1,888	1,759
80	0,404	0,553	0,340	1,835	1,451
60	0,304	0,421	0,284	1,634	1,330
40	0,206	0,280	0,189	1,239	0,872
20	0,171	0,219	0,181	0,776	0,541

Yapraklara göre daha düşük aktivite gösteren çiçekler düşük derişimlerde standart maddelere daha yakın aktiviteye sahipken en yüksek derişimde standartların %16-30 oranında etkinlik göstermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: *H. perforatum* L. çiçeklerinin CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasiteleri.

En yüksek kapasitelere bakıldığında, yaprakların etanolü ekstresinin 4605 µmol BHA/g ekstre ve 1893,6 µmol C vitamini/g ekstre eşdeğeri kapasiteye sahip olduğu tespit edilirken çiçeklerin etanol-su ile elde edilen ekstresinde 1664 µmol BHA/g ekstre ve 1164 µmol C vitamini/g ekstre eşdeğeri kadar kapasite gösterdiği belirlenmiştir.

4.3.2. DPPH Radikali Süpürme Kapasitesi

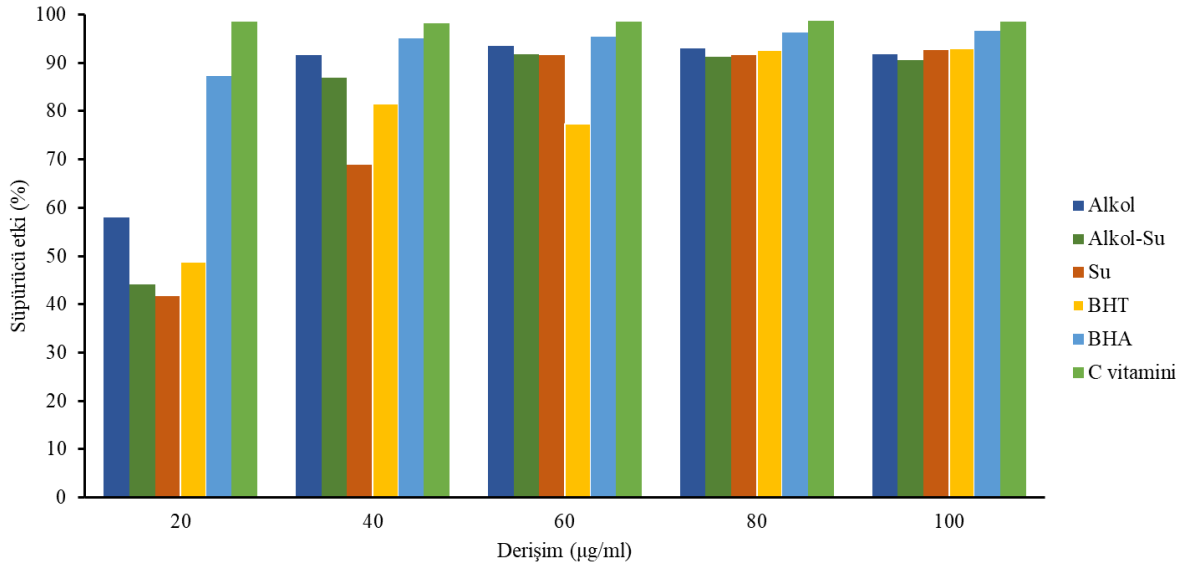
DPPH radikalini süpürme gücü en yüksek standart madde C vitamini olup bu bileşiğe ve ardından gelen BHA'ya göre tüm ekstreler daha düşük etkinlik göstermiştir. BHT'ye göre ise

özellikle yaprak ekstraları oldukça yakın bir aktiviteye sahip bulunmuştur. Hem yapraklar hem de çiçekler için düşük derişimlerde etanol-su karışımı ile DPPH süpürme gücü yüksek olurken sadece 100 µg/ml derişimde su ile elde edilen ekstralar daha güçlü olmuştur (Tablo 4.7).

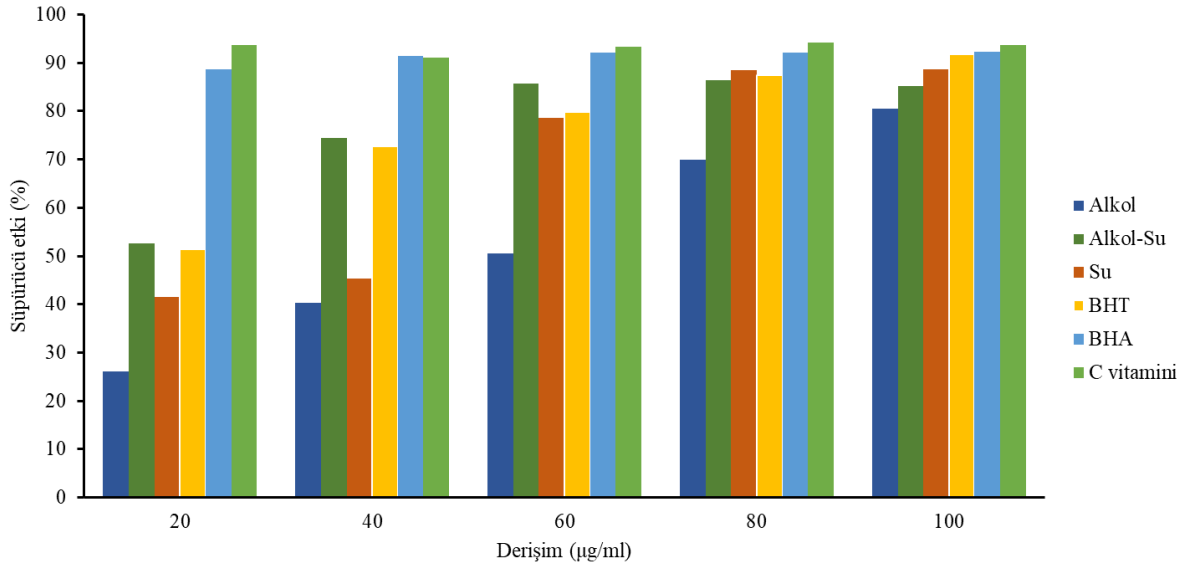
Tablo 4.7: Standart antioksidanlar, *H. perforatum* L. yaprakları ve çiçeklerinin DPPH radikali süpürme kapasiteleri.

% DPPH radikali süpürücü etki	Derişim (µg/ml)				
	20	40	60	80	100
BHA	87,322	94,967	95,442	96,201	96,581
BHT	48,718	81,481	92,114	92,688	92,972
C vitamini	98,481	98,196	98,575	98,765	98,575
EtOH (Yaprak)	57,977	91,548	93,447	92,972	91,738
EtOH-Su (Yaprak)	44,160	86,895	91,833	91,168	90,503
Su (Yaprak)	41,738	68,851	91,643	91,643	92,593
EtOH (Çiçek)	26,025	40,221	50,473	69,874	80,442
EtOH-Su (Çiçek)	52,681	74,448	85,647	86,435	85,174
Su (Çiçek)	41,483	45,268	78,549	88,486	88,644

Şekil 4.6'de *H. perforatum* L. yapraklarının DPPH süpürme kapasiteleri standart maddelerle karşılaştırılmıştır. 60 µg/ml'den itibaren yeterli etkinliğe sahip olduğu görülen ekstralar arasından öne çıkan az farkla da olsa etanolle üretilen olmuştur.



Şekil 4.6: *H. perforatum* L. yapraklarının ve standart antioksidanların DPPH süpürme kapasiteleri.



Şekil 4.7: *H. perforatum* L. çiçeklerinin ve standart antioksidanların DPPH süpürme kapasiteleri.

Bitkinin çiçekleri yapraklara göre daha düşük aktivite göstermiştir. Etanolle elde edilen ekstre dışında 80 µg/ml derişimden itibaren yeterli süpürücülüğe sahip olan ekstrelerden etanol-su ürünü düşük derişimlerde, su ürünü yüksek derişimlerde öne çıkmıştır (Şekil 4.7).

4.4. ÇALKALAMALI SİSTEMDE EKSTRAKSİYON

H. perforatum L. yaprakları ve çiçekleri kullanılarak elde edilen ekstrelerdeki toplam hiperisin içeriğinin çözücü, sıcaklık ve süreyle değişimi incelenmiştir. Çalkalamalı su banyosunda yürütülen çalışmalarda sürenin etkisi 15, 30, 60 ve 120 dk süren denemelerde izlenmiştir. Sıcaklık olarak oda sıcaklığından başlanıp çözücüye göre 45°C, 55°C veya 80°C'ye kadar çıkılmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığı belirlenirken sadece hiperisinin değil diğer fonksiyonel bileşiklerin de bozulmamasına dikkat edilmelidir.

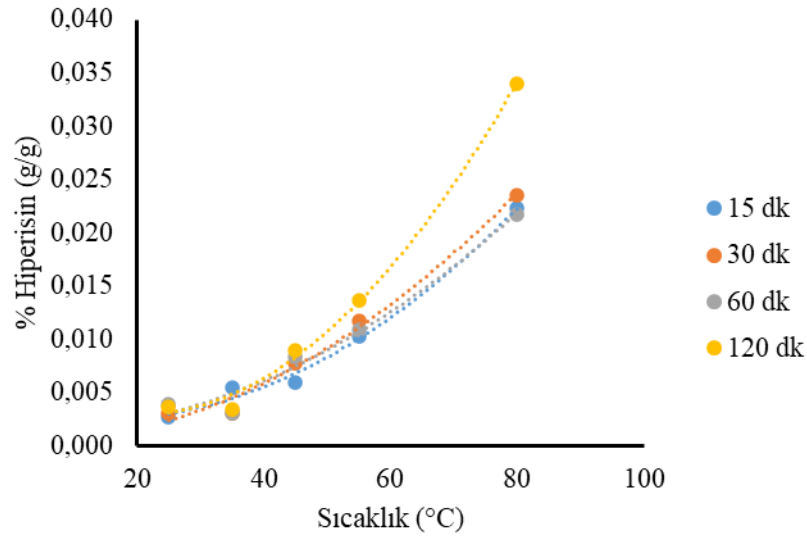
4.4.1. Suyla Ekstraksiyon

Sarı kantaron çiçeklerinin suyla yapılan ekstraksiyon sürecinde sıcaklık ve sürenin toplam hiperisin verimi üzerindeki etkisi Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8: *H. perforatum* L. çiçeklerinin sulu ekstrelerinde toplam hiperisin (%g/g) içeriği.

Ekstraksiyon süresi (dk)	Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)				
	25	35	45	55	80
15	0,0027	0,0055	0,0059	0,0103	0,0224
30	0,0031	0,0031	0,0078	0,0117	0,0236
60	0,0039	0,0031	0,0084	0,0109	0,0217
120	0,0037	0,0035	0,0090	0,0137	0,0341

Alınan sonuçlara göre suyla yapılan ekstraksiyonu sürecinde sürenin düşük sıcaklıklarda önemli bir değişim yaratmadığı görülmüştür. Sıcaklık arttıkça sürenin 60 dk'dan 120 dk'ya çıkması ekstredeki toplam hiperisin içeriğini 1,5 katına çıkarmıştır (Şekil 4.8). Fakat bu derecede yüksek sıcaklıkta bu kadar uzun süre süren bir ekstraksiyon sonunda özellikle antioksidan etkili bileşenlerin bozulması muhtemeldir. Ayrıca elde edilen en yüksek hiperisin içeriği literatürle karşılaştırıldığında, hiperisinin tıbbi etkisinden yararlanabilmek için düşük kalmaktadır.



Şekil 4.8: Suyla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.

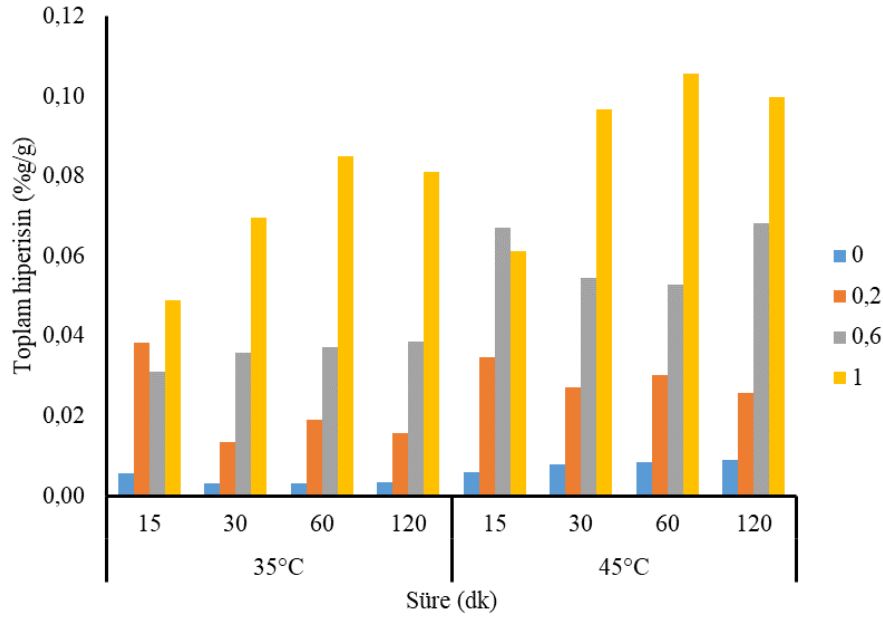
4.4.2. Metanol-Su Karışımıyla Ekstraksiyon

Hiperisinin kazanılmasında kullanılan çözücülerden biri olan metanolün suyla farklı oranlardaki karışımlarıyla elde edilen sarı kantaron çiçeği ekstrelerinde toplam hiperisin oranı %0,1'e kadar çıkmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: *H. perforatum* L. çiçeklerinin metanol-su ekstrelerinde toplam hiperisin (%g/g) içeriği.

Ekstraksiyon süresi (dk)		Metanol/su bileşimi (hacmen %)			
		0	40	60	100
35°C	15	0,0055	0,0384	0,0310	0,0490
	30	0,0031	0,0133	0,0357	0,0697
	60	0,0031	0,0191	0,0373	0,0849
	120	0,0035	0,0156	0,0386	0,0810
45°C	15	0,0059	0,0347	0,0671	0,0611
	30	0,0078	0,0273	0,0546	0,0968
	60	0,0084	0,0302	0,0529	0,1056
	120	0,0090	0,0256	0,0683	0,0999

Metanolün tek başına kullanımı suyla karışımına göre önemli derecede daha verimli bir süreç sağlamıştır. Suyla yapılan ekstraksiyonların veriminin 55°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda arttığı bilinmekle birlikte metanolün 64,7°C'deki kaynama noktasına yaklaşmamak adına yüksek sıcaklıklara çıkılmamıştır. Yine de sıcaklığın 35°C'den 45°C'ye çıkmasıyla bile düşük oranlardaki metanol varlığı hiperisin verimini arttırmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Metanol-suyla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.

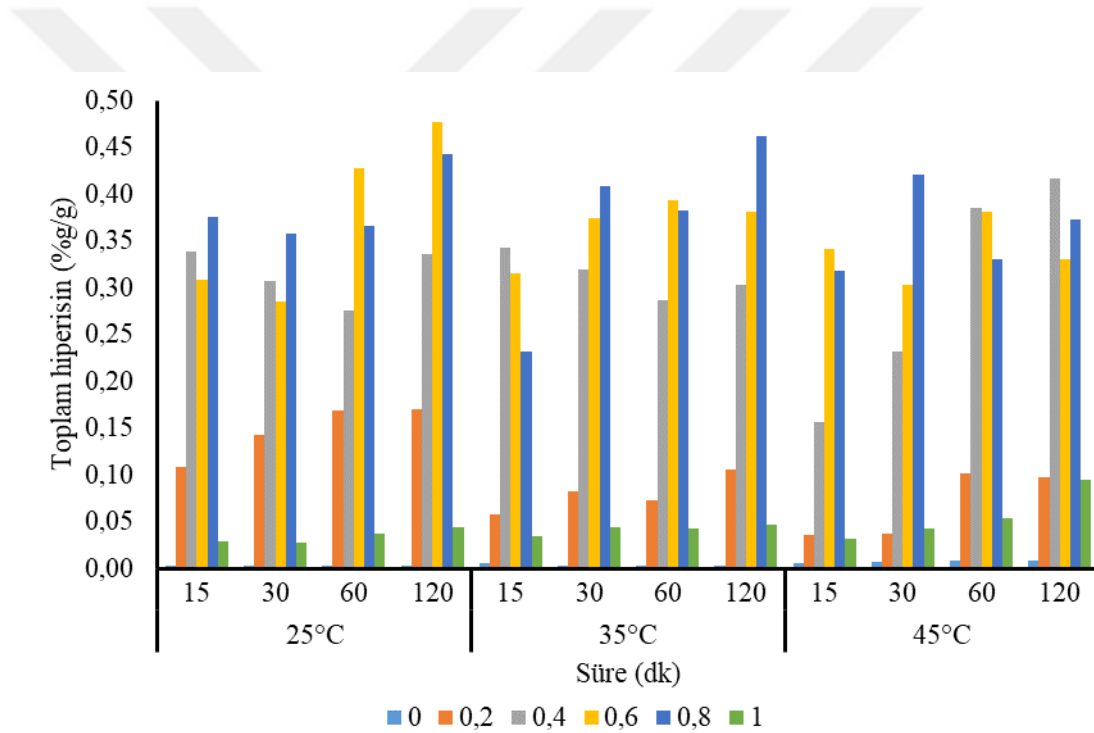
4.4.3. Aseton-Su Karışımıyla Ekstraksiyon

Asetonun suyla karışımı, toplam hiperisin veriminin en yüksek olduğu ekstraksiyon süreçlerini sağlamıştır. Tek başına metanolden daha yüksek verim sağlayan aseton özellikle suyla %40-80 oranlarındaki karışımlarında toplam hiperisin oranını ekstrenin %0,3-0,4 kadarına kadar çıkarmıştır (Tablo 4.10).

Sıcaklığın artması, genel olarak toplam hiperisin veriminin bir miktar düşmesine sebep olmuştur. Sıcaklığın düşük olması, ısıl bozunmaları önleyerek toplam içeriğin doğala daha yakın olmasını sağlar. En yüksek verimin görüldüğü 25°C'de hacmen %60'lık aseton-su karışımı düşük enerji ve kimyasal maliyetiyle tüm tez çalışmasındaki en iyi çalışma koşulu olarak belirlenmiştir. Aynı sıcaklık ve karışım oranında sürenin 120 dk olması 60 dk olmasına göre verimi %0,05 arttırmıştır (Şekil 4.10).

Tablo 4.10: *H. perforatum* L. çiçeklerinin aseton-su ekstraktlarında toplam hiperisin (%g/g) içeriği.

Ekstraksiyon süresi (dk)		Aseton/su bileşimi (hacmen %)					
		0	20	40	60	80	100
25°C	15	0,003	0,109	0,338	0,309	0,375	0,030
	30	0,003	0,144	0,308	0,286	0,358	0,028
	60	0,004	0,169	0,276	0,427	0,367	0,037
	120	0,004	0,170	0,337	0,477	0,443	0,044
35°C	15	0,006	0,058	0,343	0,316	0,232	0,034
	30	0,003	0,083	0,320	0,375	0,409	0,044
	60	0,003	0,073	0,287	0,394	0,382	0,043
	120	0,003	0,106	0,304	0,382	0,462	0,047
45°C	15	0,006	0,036	0,157	0,342	0,318	0,032
	30	0,008	0,038	0,233	0,304	0,421	0,043
	60	0,008	0,102	0,386	0,381	0,331	0,054
	120	0,009	0,098	0,417	0,331	0,374	0,095

**Şekil 4.10:** Aseton-suyla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.

4.4.4. Etanol-Aseton Karışımıyla Ekstraksiyon

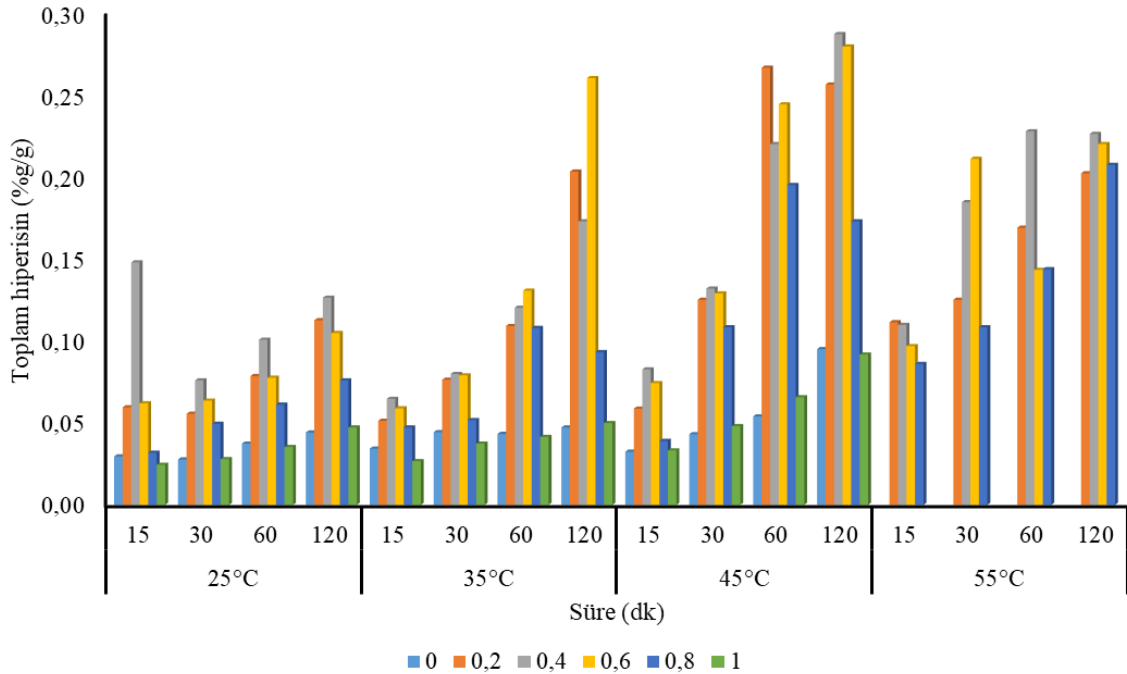
Toplam hiperisin açısından en yüksek verimi suyla karıştırılarak kullanıldığında sağlayan aseton, etanolle karıştırıldığında aynı etkiyi göstermemiştir. Yaklaşık yarı yarıya karışımlarında verim daha yüksek bulunup sürenin olumlu etkisinin en iyi gözlemlendiği sonuçlarla da etanol-aseton karışımı kullanıldığında karşılaşılmıştır (Tablo 4.11).

Toplam hiperisin içeriğinin en az %0,2 (g/g) olması istendiğinde sürenin arttırılması gerektiği görülmüştür. Bununla birlikte sıcaklık 45°C'ye çıktığında süre süre 60 dk'ya indirilebilirken

55°C'ye çıkan sıcaklık uzun sürelerde verimi düşürmüştür (Şekil 4.11). Etanol-aseton kullanıldığında en iyi toplam hiperisin içeriği hacmen %60'luk karışımla 45°C'de 120 dk'da elde edilebilmiştir.

Tablo 4.11: *H. perforatum* L. çiçeklerinin etanol-aseton ekstraktlarında toplam hiperisin (%g/g) içeriği.

Ekstraksiyon süresi (dk)		Etanol/aseton bileşimi (hacmen %)					
		0	20	40	60	80	100
25°C	15	0,030	0,059	0,048	0,062	0,032	0,024
	30	0,028	0,056	0,076	0,064	0,049	0,028
	60	0,037	0,079	0,101	0,078	0,061	0,035
	120	0,044	0,113	0,126	0,105	0,076	0,047
35°C	15	0,034	0,051	0,065	0,059	0,047	0,027
	30	0,044	0,076	0,080	0,079	0,052	0,037
	60	0,043	0,109	0,120	0,131	0,108	0,041
	120	0,047	0,203	0,173	0,260	0,093	0,050
45°C	15	0,032	0,059	0,083	0,074	0,039	0,033
	30	0,043	0,125	0,132	0,129	0,108	0,048
	60	0,054	0,267	0,220	0,244	0,195	0,066
	120	0,095	0,256	0,287	0,280	0,173	0,092
55°C	15		0,111	0,110	0,097	0,086	
	30		0,125	0,185	0,211	0,108	
	60		0,169	0,228	0,143	0,144	
	120		0,202	0,226	0,220	0,207	



Şekil 4.11: Etanol-asetonla yapılan ekstraksiyonda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.

4.4.5. Etanol-Su Karışımıyla Ekstraksiyon

H. perforatum L. bitkisinin literatürde en çok karşılaşılan ekstreleri etanol kullanılarak üretilenleridir. Antioksidan denemeleri ve maliyet de dikkate alındığında toplam hiperisin veriminin yüksek olduğu etanol-su derişimi, süre ve sıcaklık koşullarının tespiti önem arz eder.

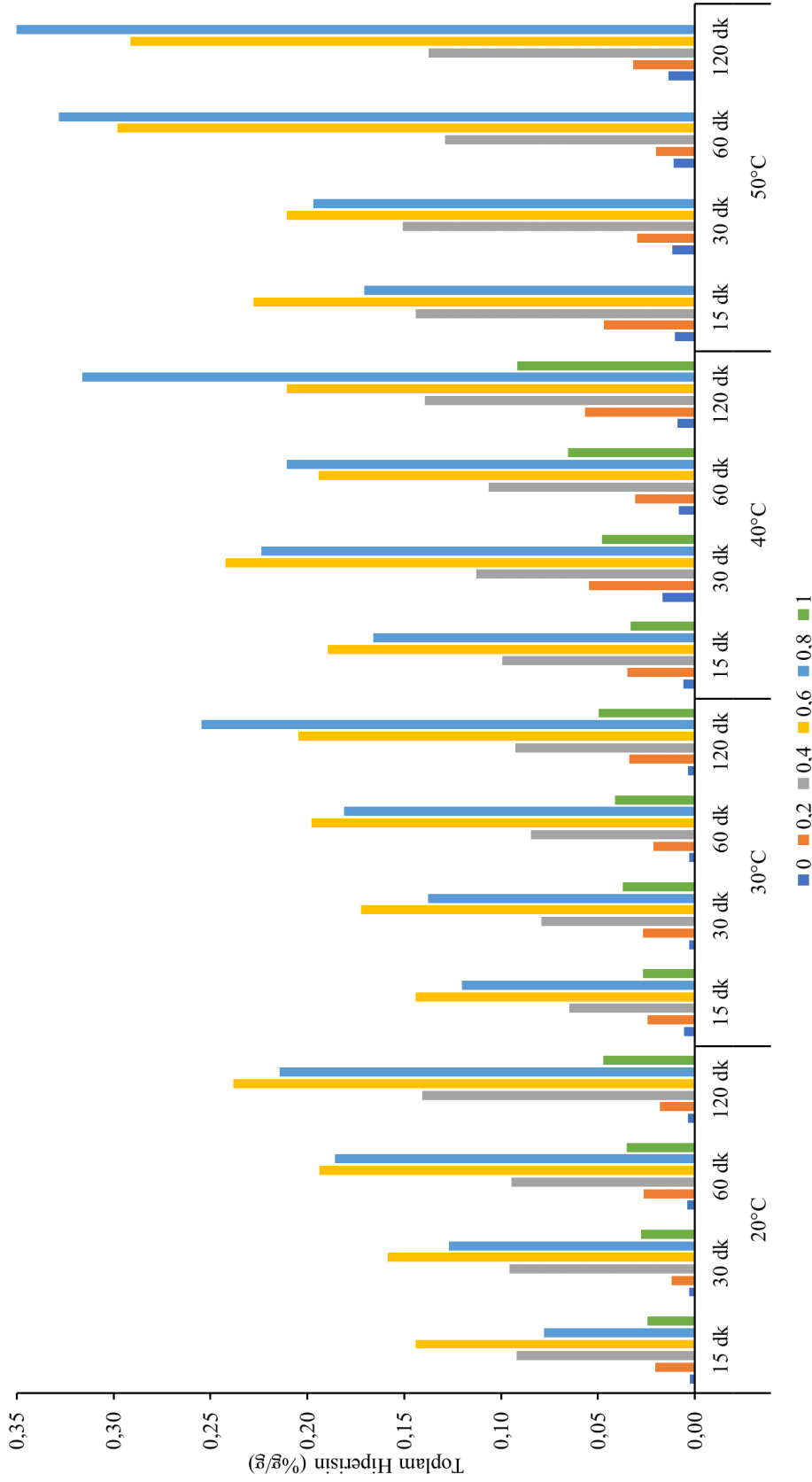
Bitkinin çiçekleri ve yapraklarının 25-55°C sıcaklık ve 15-120 dk süre aralıklarında farklı oranlarda etanol-su karışımları kullanılarak yürütülen ekstraksiyon denemelerinin sonuçları Tablo 4.12’de ve Tablo 4.13’te verilmiştir.

Tablo 4.12: *H. perforatum* L. çiçeklerinin etanol-su ekstrelerinde % hiperisin (g/g) içeriği.

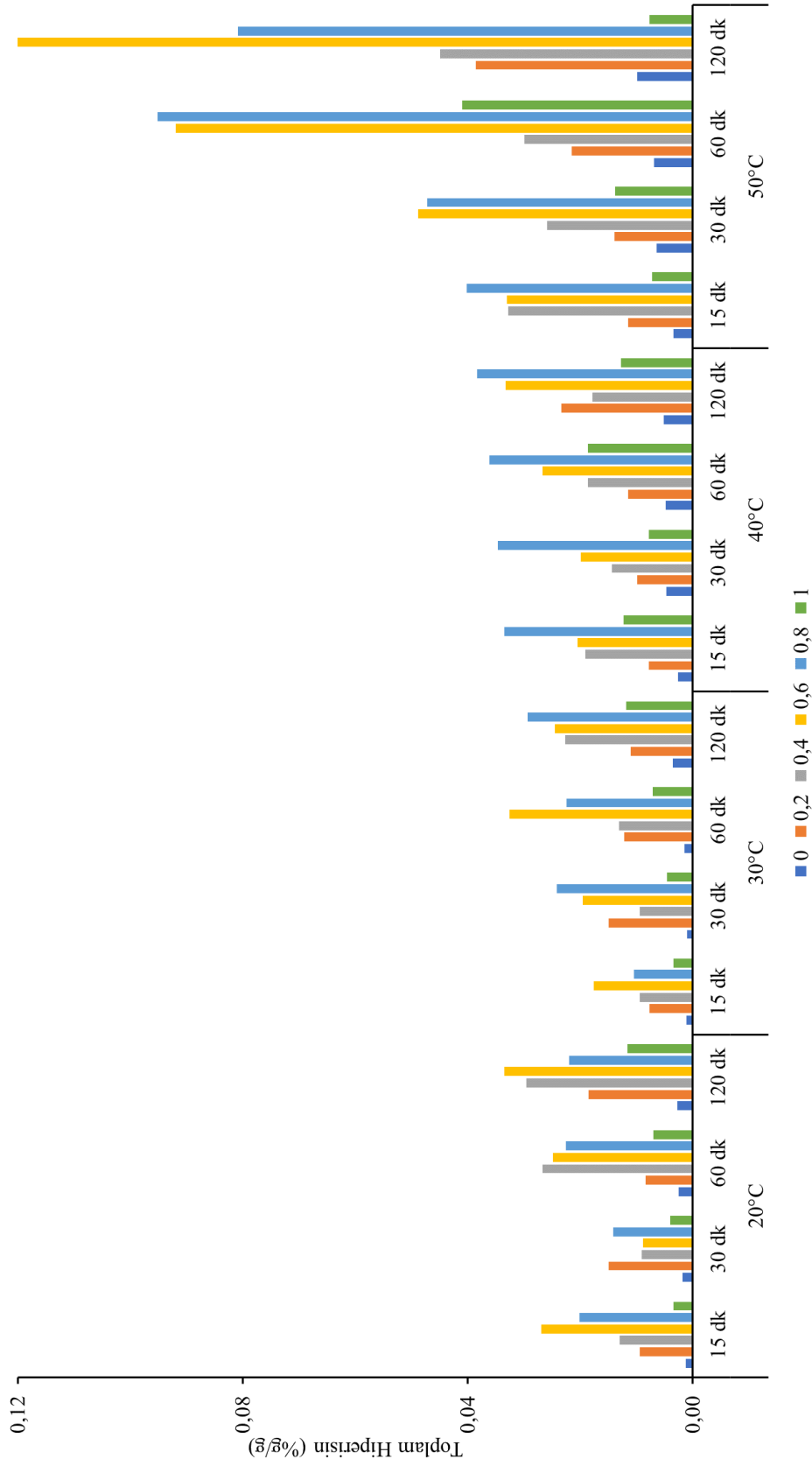
Ekstraksiyon süresi (dk)		Etanol/su bileşimi (hacmen %)					
		0	20	40	60	80	100
25°C	15	0,003	0,021	0,092	0,144	0,078	0,024
	30	0,003	0,012	0,096	0,158	0,127	0,028
	60	0,004	0,026	0,095	0,194	0,186	0,035
	120	0,004	0,018	0,141	0,238	0,214	0,047
35°C	15	0,006	0,025	0,065	0,144	0,120	0,027
	30	0,003	0,027	0,079	0,172	0,138	0,037
	60	0,003	0,021	0,085	0,198	0,181	0,041
	120	0,004	0,034	0,093	0,205	0,255	0,050
45°C	15	0,006	0,035	0,099	0,190	0,166	0,033
	30	0,017	0,055	0,113	0,242	0,224	0,048
	60	0,008	0,031	0,107	0,194	0,211	0,066
	120	0,009	0,057	0,140	0,211	0,316	0,092
55°C	15	0,010	0,047	0,144	0,228	0,171	
	30	0,012	0,030	0,151	0,211	0,197	
	60	0,011	0,020	0,129	0,298	0,328	
	120	0,014	0,032	0,137	0,291	0,360	

Tablo 4.13: *H. perforatum* L. yapraklarının etanol-su ekstrelerinde % hiperisin (g/g) içeriği.

Ekstraksiyon süresi (dk)		Etanol/su bileşimi (hacmen %)					
		0	20	40	60	80	100
25°C	15	0,001	0,009	0,013	0,027	0,020	0,003
	30	0,002	0,015	0,009	0,009	0,014	0,004
	60	0,002	0,008	0,027	0,025	0,023	0,007
	120	0,003	0,018	0,030	0,033	0,022	0,012
35°C	15	0,001	0,008	0,009	0,018	0,010	0,003
	30	0,001	0,015	0,009	0,019	0,024	0,005
	60	0,001	0,012	0,013	0,033	0,022	0,007
	120	0,004	0,011	0,023	0,025	0,029	0,012
45°C	15	0,003	0,008	0,019	0,021	0,033	0,012
	30	0,005	0,010	0,014	0,020	0,035	0,008
	60	0,005	0,011	0,019	0,027	0,036	0,019
	120	0,005	0,023	0,018	0,033	0,038	0,013
55°C	15	0,003	0,011	0,033	0,033	0,040	0,007
	30	0,006	0,014	0,026	0,049	0,047	0,014
	60	0,007	0,022	0,030	0,092	0,095	0,041
	120	0,010	0,039	0,045	0,122	0,081	0,008



Şekil 4.12: *H. perforatum* L. çiçeklerinin etanol-suyla yapılan ekstraksiyonunda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.



Şekil 4.13: *H. perforatum* L. yapraklarının etanol-suyla yapılan ekstraksiyonunda süre ve sıcaklıkla toplam hiperisin değişimi.

Şekil 4.12’de bitkinin çiçeklerinin etanol-su ile yapılan ekstraksiyonunun sonuçları görülmektedir. Genel olarak hacmen %60’lık etanol-su kullanıldığında en yüksek toplam hiperisin içeriği elde edilebilirken sıcaklık ve süre arttıkça %80’lik etanol-su karışımının etkinliği öne çıkmıştır. %80’lik karışımla 40°C’de 120 dk’da görülen hiperisin veriminin biraz daha fazlası sıcaklığın 50°C’ye çıkmasıyla 60 dk’da sağlanabilmiştir. 120 dk’da ise en yüksek toplam hiperisin içeriği olarak %0,360 g/g değeri tespit edilmiştir.

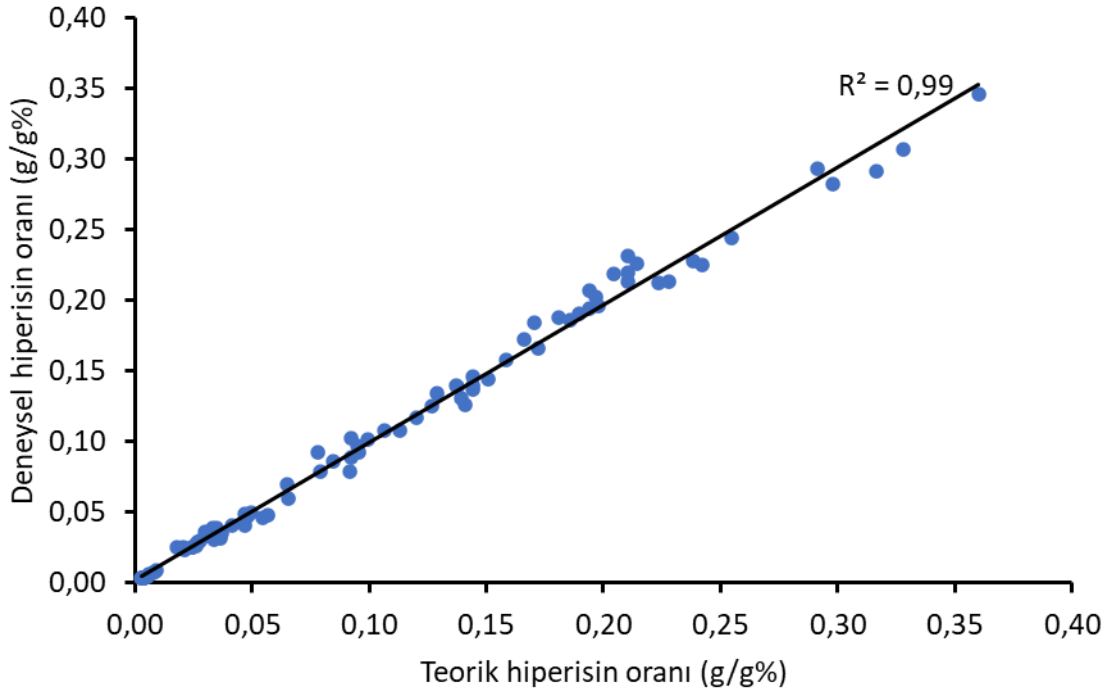
H. perforatum L. yapraklarından alınan verilerle oluşturulan Şekil 4.13 incelendiğinde hacmen %60’lık ve %80’lik etanol-su karışımlarının yüksek verim sağladığı görülmektedir. Ekstrelerde toplam hiperisin oranının %0,04’ün üzerine çıkabilmesi için ise sıcaklığın 50°C’ye kadar artırılması gerekmiştir. Yalnız bu da yeterli olmamış, ancak ekstraksiyon işleminin 30 dk’nın üzerinde sürdürülmesiyle bu verim sağlanabilmiştir. %0,12 g/g ile en yüksek toplam hiperisin içeriği 50°C’de %60’lık etanol-su karışımıyla 120 dk süren bir işlemle elde edilebilmiştir.

4.5. HİPERİSİN İÇERİĞİ TAHMİNİ

Çalkalamalı sistemden alınan verilerden yararlanılarak, ekstraksiyon koşullarına bağlı toplam hiperisin içeriğinin tahmin edilmesine yönelik bir program Python dilinde yazılmıştır (EK-1). Programda Scikit-Learn makine öğrenmesi yöntemlerinden Lineer Regresyon metodu uygulanmış ve üzerinde Random Forest Regresyon (Rastgele Karar Ormanları Sınıflandırması) ile düzeltme yapılmıştır.

Son durumda tahmin edilen değerler arasında yapılan istatistik hesabında ortalama hata karesi (MSE) 0,0005, ortalama hata karelerinin kökü (RMSE) 0,0222, regresyon katsayısı (R^2) ise 0,92 olarak hesaplanmıştır. MSE ve RMSE değerlerinin 0’a yakın olması hata payının düşük olduğunu gösterirken R^2 değerinin 100’e yakın olması da veri setinin tutarlılığını ifade eder.

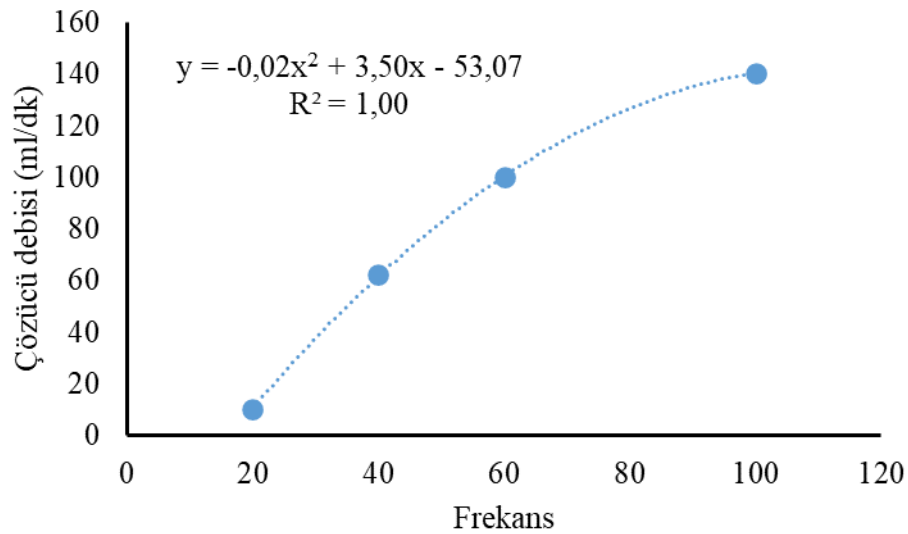
Deneyisel veriler ile programla hesaplanan veriler ve bunların hata yüzdeleri EK-2’de verilmiştir. Veri setleri arasında çizilen korelasyon grafiği Şekil 4.14’te verilmiştir. Buna göre regresyon katsayısı (R^2) 0,993 olmuştur.



Şekil 4.14: Toplam hiperisin içeriği tahmin programının sonuçlarıyla deneysel verilerin karşılaştırılması.

4.6. BATARYA TİPİ EKSTRAKTÖRDE EKSTRAKSİYON

Çalkalamalı sistemden alınan verilere göre, batarya tipi sistemde *H. perforatum* L. çiçeklerinin ekstraksiyonunda hacmen %50'lik etanol-su karışımı kullanılmıştır. Çözücü debisi, kolon sayısı ve sıcaklık parametrelerine bağlı olarak hiperisin verimi incelenmiştir. Pompa frekansının çözücü debisini nasıl değiştirdiği Şekil 4.15'te görülmektedir.



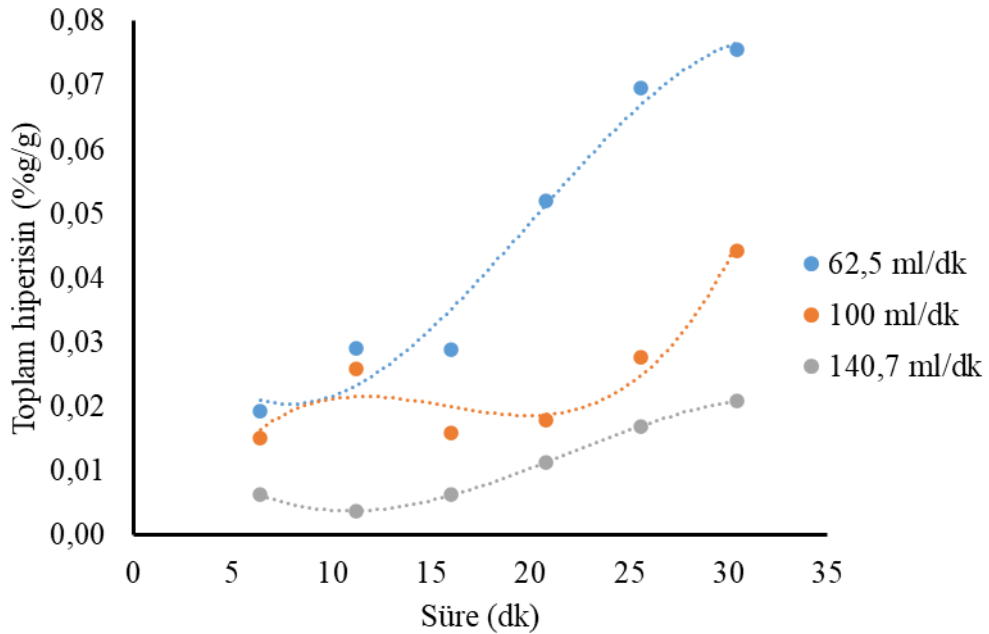
Şekil 4.15: Batarya tipi sistemde çözücü debisinin pompa frekansı ile değişimi.

35°C’de tek kolonda çalışılarak çözücü debisinin ürün hacmindeki toplam hiperisin içeriğine etkisi incelenmiştir. Debi arttıkça kolondan hızlı bir şekilde akan çözücü bitkisel madde yüklü kolonda daha kısa süre kalarak doygunluğa ulaşmadan ürün olarak alınır. Tablo 4.14’e bakıldığında debinin 62,5 ml’ye ayarlanması ürünündeki toplam hiperisin içeriğini önemli derecede arttırdığı görülmektedir. Pompa frekansının 20 gibi daha düşük bir değere ayarlanmasıyla 10,33 ml/dk akış hızına sahip çözücüyle ürün alınması uzun sürdüğünden en uygun çözücü debisi için pompa frekansı 40 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.14: Farklı çözücü debileri ile tek kolondan alınan ürünlerin toplam hiperisin içeriği (%g/g).

Süre (dk)	Çözücü debisi (ml/dk)		
	62,5	100	140,7
6,4	0,0193	0,0152	0,0064
11,2	0,0292	0,0259	0,0038
16	0,0290	0,0160	0,0063
20,8	0,0520	0,0180	0,0113
25,6	0,0695	0,0277	0,0170
30,4	0,0755	0,0443	0,0209

Şekil 4.16’te ürün hacmindeki toplam hiperisin miktarının çözücü besleme debisiyle değişimi görülmektedir.



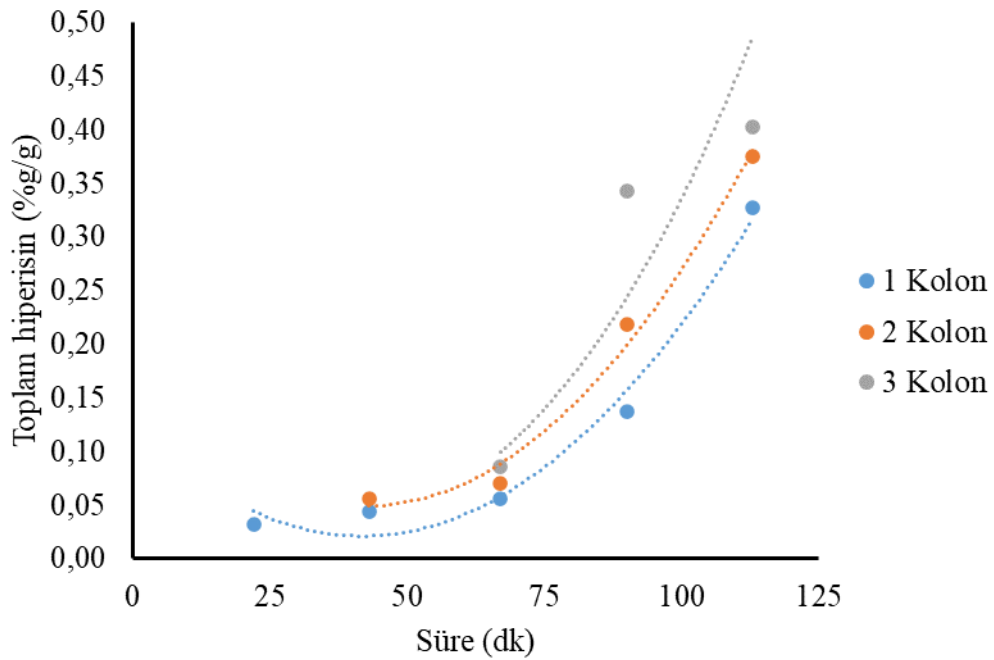
Şekil 4.16: Tek kolondan alınan ürünlerdeki toplam hiperisin içeriğinin çözücü debisiyle değişimi.

En uygun çözücü debisi 62,5 ml/dk seçildikten sonra 3 kolonlu sistemden alınan ürünlerin toplam hiperisin içeriğinin zamana göre değişimi izlenmiştir. Kolon sayısı arttırıldığında sıcaklığın düşürülmesinin verim üzerindeki etkisi incelenmiştir. 25°C’de 90. dakikada ilk

kolondan alınan verimin yükselmesiyle sonraki kolonlarda da hızlı bir artış görülmüştür. 113. dakikaya gelindiğinde 3. kolondan alınan toplam hiperisin içeriği %0,40 g/g'a ulaşsa da ilk iki kolonda hâlâ önemli miktarda hiperisin içeriği olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: 3 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi (%g/g).

Süre (dk)	Kolon sayısı		
	1	2	3
22	0,0324		
43	0,0438	0,0555	
67	0,0564	0,0698	0,0854
90	0,1377	0,2185	0,3425
113	0,3269	0,3749	0,4020



Şekil 4.17: 3 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi.

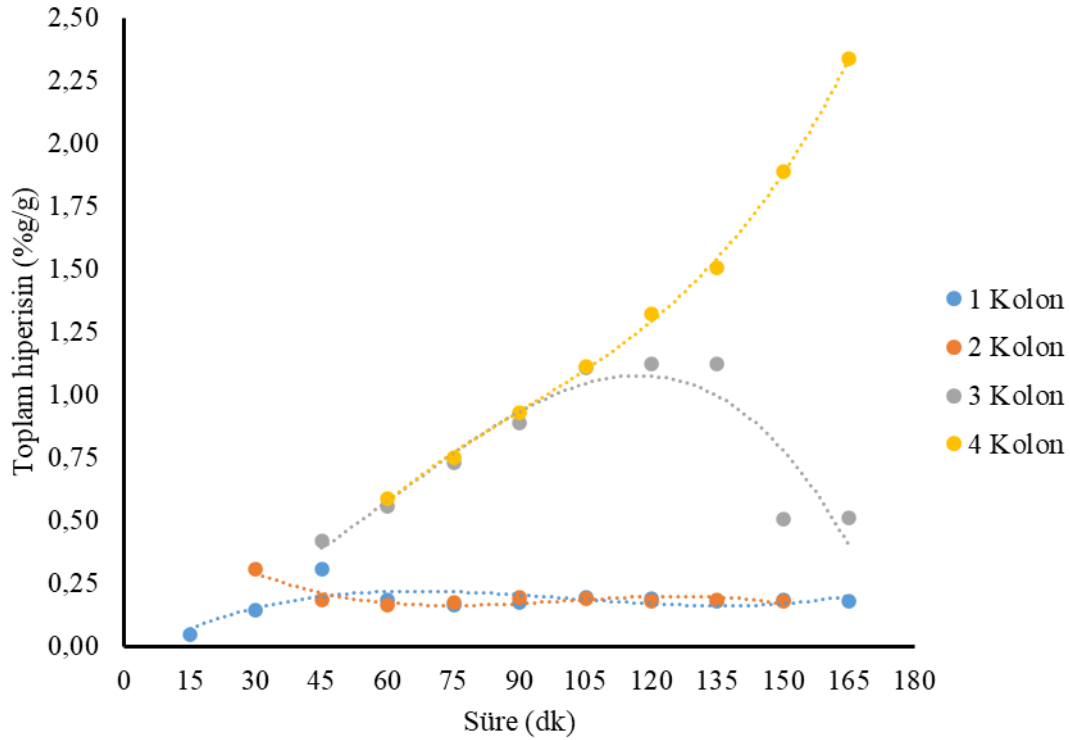
Pilot ölçekli ekstraksiyon çalışmasında son olarak kolon sayısı dörde ve sıcaklık 55°C'ye çıkarılarak her kolondan alınan ürünün toplam hiperisin içeriği daha uzun bir süre boyunca izlenmiştir (Tablo 4.16).

Buna göre, 1., 2. ve 3. kolondan alınan ürünlerdeki toplam hiperisin içeriği sırasıyla 45., 75. ve 120. dakika civarlarında en yüksek seviyesine ulaştıktan sonra düşmekte, bununla birlikte 4. kolondan alınan ürünlerdeki miktar giderek artmaktadır. 165. dakikaya gelindiğinde son kolondan alınan ürünlerdeki toplam hiperisin içeriği %2,34 g/g'a ulaşmıştır. Bu sırada 3. kolondan alınan ürünün hiperisin içeriği %0,5 g/g'a kadar düşmüştür (Şekil 4.18). Yeterli süre boyunca sisteme

çözücü beslenmeye devam edilirse 4 kolonlu bu sistemden alınabilecek en yüksek toplam hiperisin içeriğinin %3,37 g/g olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.16: 4 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi (%g/g).

Süre (dk)	Kolon sayısı			
	1	2	3	4
15	0,0453			
30	0,1452	0,1627		
45	0,3087	0,3505	0,4190	
60	0,1851	0,5063	0,5591	0,5870
75	0,1617	0,6989	0,7302	0,7518
90	0,1745	0,5863	0,8885	0,9325
105	0,1952	0,3290	1,1089	1,1123
120	0,1894	0,3385	1,1221	1,3221
135	0,1796	0,3148	1,1218	1,5069
150	0,1827	0,3425	0,5072	1,8918
165	0,1811	0,3332	0,5117	2,3401



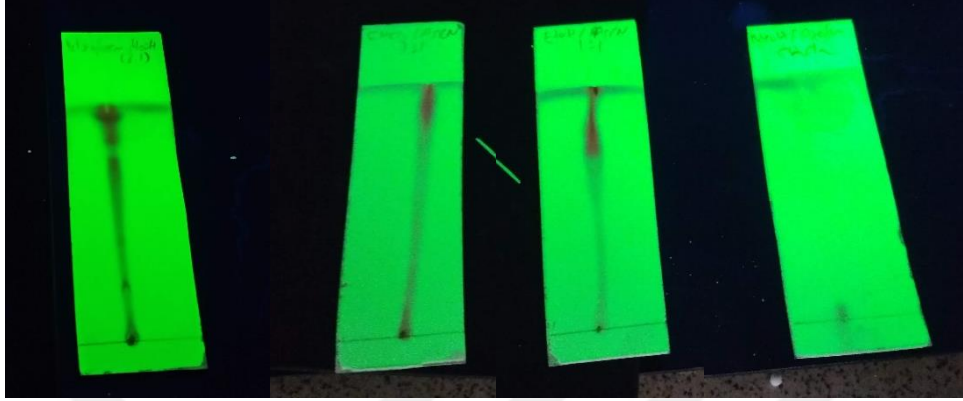
Şekil 4.18: 4 kolonlu sistemde toplam hiperisin içeriğinin zamanla değişimi.

4.7. SAFLAŞTIRMA

4.7.1. Kolon Kromatografisi

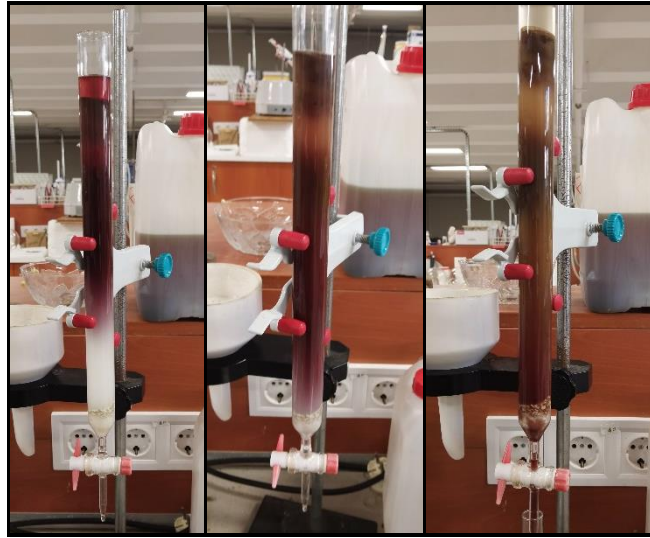
Öncelikle ince tabaka kromatografisi yönteminde çeşitli çözücü karışımları denenmiştir. Kloroform-metanol (8:1), kloroform-asetonitril (1:1), etanol-asetonitril (1:1) ve metanol-aseton-diklorometan (75:10:15) karışımları kullanılarak etanol-su ile Soxhlet ekstraksiyonunda

elde edilen ekstrenin kuru maddesi ince tabaka üzerinde yürütülmüştür. Şekil 4.19'da görüldüğü gibi ilk üç çözücü karışımı farklı bileşenleri çözerek tabaka boyunca iz oluşmasını sağlamıştır. Son karışımla ise hızlı ilerleyen bir faz ile yavaş ilerleyen bir faz ayrılmıştır.



Şekil 4.19: İnce tabaka kromatografisi: Soldan sağa kloroform:metanol (8:1); kloroform:asetonitril (1:1); etanol:asetonitril (1:1); metanol:aseton:diklorometan (75:10:15).

İnce tabaka kromatografisinde elde edilen görüntülere bakılarak kolon kromatografisinde metanol-aseton-diklorometan (75:10:15) karışımı kullanılmasına karar verilmiştir. Kromatografi kolonu, silika jel 60 ile doldurulmuştur. Hiperisin içeren faz hızlı bir şekilde ilerlemiş ve ardından gelen kahverengi fazdan ayrılmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Metanol:aseton:diklorometan (75:10:15) ile yapılan kolon kromatografisi.

Kolondan alınan ürünün çözücüsü buharlaştırılmış ve Şekil 4.21'deki kuru madde elde edilmiştir. 5 g bitkinin etanol-su (1:1) karışımı kullanılarak Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulmasıyla elde edilen kuru maddenin saflaştırılması sonrası 0,2127 g ürün elde edilerek %4,2 verim alınmıştır. UV-Vis spektrofotometresinde yapılan ölçüme göre, %0,0657 g/g toplam hiperisin içeriği kolon kromatografisiyle %0,0683 (g/g)'a çıkmıştır.



Şekil 4.21: Kolon kromatografisinden alınıp kurutulan ürün.

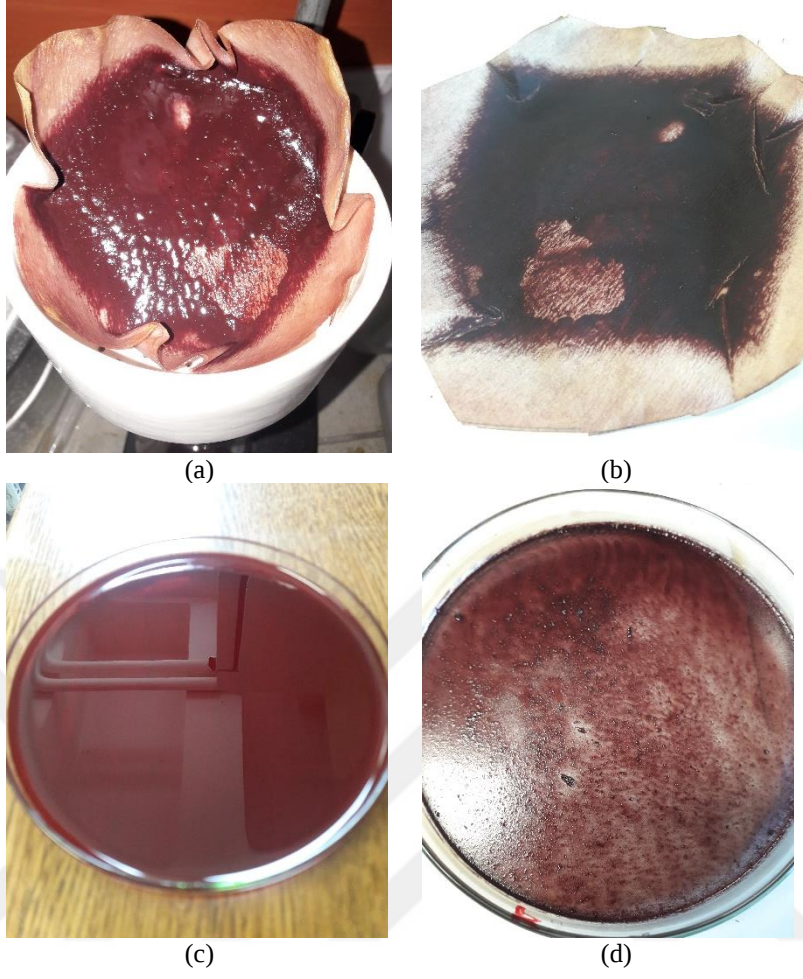
4.7.2. Piridinle Kristallendirme

Piridin ile hiperisin kristalizasyonu yönteminde öncelikle hac. %5'lik HCl-metanol karışımı hazırlanmıştır. Etanol-su (1:1) karışımı kullanılarak gerçekleştirilen Soxhlet ekstraksiyonu ürününün kuru maddesi metanolde çözülmüş ve aynı hacimdeki HCl-metanol karışımıyla karıştırılmıştır. 24 saat buzdolabında bekletilen karışımında oluşan çökeltiler Şekil 4.22'de görülmektedir.



Şekil 4.22: HCl ile asitlendirilmiş metanolla bekletilen üründe çökelti oluşumu.

Asidik-metanolik karışım süzülerek oluşan katı ürün ayrılmıştır. Kurutulan ürün piridinle yıkanarak çözülmüştür. Piridin buharlaştırılmasına kadar geçen süreç Şekil 4.23'de verilmiştir. 5 g bitkinin etanol-su (1:1) karışımı kullanılarak Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulmasıyla elde edilen kuru maddenin saflaştırılmasıyla 0,1148 g ürün elde edilmiş, verim %2,3 olmuştur. UV-Vis spektrofotometresinde yapılan ölçüme göre, %0,0657 g/g toplam hiperisin içeriği kristallendirme yöntemiyle %0,1481 (g/g)'a çıkmıştır.



Şekil 4.23: a) HCl-metanol karışımının süzülmesiyle elde edilen çökelti; b) Çökeltinin çözücüsü buharlaştırılmış hâli; c) Çözücüsü buharlaştırılan maddenin piridinle yıkanmasıyla elde edilen ürün; d) Piridinin buharlaştırılmasıyla elde edilen ürün.

5. TARTIŞMA

5.1. UÇUCU YAĞ

Clevenger aparatıyla elde edilen uçucu yağ verimi yapraklarda %0,58 (g/g), çiçeklerde ise %0,27 (g/g) bulunmuştur. Elde edilen uçucu yağlardaki bileşen sayısı yapraklarda 52, çiçeklerde ise 54'tür. Çiçeklerden ve yapraklardan elde edilen uçucu yağlardaki bileşik sayısı aynı olmakla birlikte, çiçeklerden elde edilen uçucu yağdaki terpenik bileşik yüzdesinin yapraklardan elde edilen uçucu yağdakine kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür.

Bitkilerden elde edilen uçucu yağ miktarı ve bileşimi; jeolojik ve meteorolojik koşullar, bitkinin toplama koşulları, bitkinin kök, sap, yaprak ve çiçek kısmının kullanılması ve ekstraksiyon yöntemine göre değişiklikler göstermektedir. Örneğin güneydoğu Sırbistan'dan toplanan iki farklı örnekten birinde germakren D (%18,6) öne çıkarken diğerinde β -karyofilen (%14,2) öne çıkmıştır [30], [32][30], [33]. Bir diğer örnek de Litvanya'dan toplanan bitkilerde seskiterpenler ağırlıktayken [32] Yunanistan'dan toplanan bitkilerde monoterpenlerin dikkat çekmesidir [42].

Dünyanın çeşitli yerlerinden toplanan *H. perforatum* L. örneklerinde olduğu gibi ülkemizde yapılan çalışmalarda da monoterpenler ve seskiterpenler uçucu yağda en yüksek orana sahip bileşen sınıflarıdır. Uşak yöresinden toplanan örneklerde α -pinen oranı %51,2 olarak tespit edilmiştir. Ardından gelen bileşenlerin oranı ise %10'un altında olup çalışılan örnek oldukça özgün bir bileşime sahiptir [43]. Güneydoğu Anadolu'dan toplanan örneklerin uçucu yağı β -selinen (%19,4) ve bisiklogermakren (%15,3) bakımından zenginlik gösterirken [37], kuzeyde kalan kesimlerden toplanan örneklerin uçucu yağının β -selinen (%19,6)'ın yanında karyofilen oksit (%12,2) ve α -selinen (%10,4) de içerdiği görülmüştür [44].

Çalışmamızda elde edilen uçucu yağlardaki 2-metil oktan bileşimi yapraklarda %34,93, çiçeklerde %52,81 olarak bulunmuştur. Literatüre göre en yüksek 2-metil oktan oranı %20,5'tir.

İran'dan %0,7 [167], Fransa'dan %0,1 [165], Arnavutluk'tan %0,4 [171], Yunanistan'dan %0,23 [166], Antep'ten %0,17 uçucu yağ verim elde edilirken çalışmamızda yapraklar ve çiçekler için sırasıyla %0,58 ve %0,27 verim alınmıştır.

Çalışmada elde edilen *H. perforatum* L. uçucu yağlarının Türkiye ve komşu ülkelerden bazı örneklerle karşılaştırıldığı Tablo 5.1 aşağıdadır.

Tablo 5.1. Elde edilen uçucu yağların başlıca bileşenlerinin bazı örneklerle karşılaştırılması.

Başlıca bileşenler (%)	Bu çalışma		Çakır ve diğ. [235]	Alan ve diğ. [184]	Başer ve diğ. [177]	Yüce [161]	Radusiene ve diğ. [164]		Gudzic ve diğ. [176]
	(Ç)	(Y)	(Ç+Y)	(Ç+Y)	(Ç+Y)	(Ç+Y)	(Ç)	(Y)	(Ç+Y)
2-Metil oktan	52,81	34,93					2,3	2,3	13,1
Limonen	0,11	7,24							
Siklotetradekan		9,12							
α -Pinen	4,65	5,55	61,7	4	5,0	0,4	2,6	1,5	
α -Selinen		0,42							
β -Selinen	1,14	0,95				19,4			
3-Metil nonan	1,89	5,58							
Longifolen		0,18							
β -Karyofilen	0,16	0,26	5,5	14,4	11,7		1,6-14,2		14,2
1-Tetradekanol	0,43	3,15						0,5-24,5	
1-Dodekanol	1,12	0,61							
Nonan	1,85	3,00							
Spathulenol		2,07		3,9	6,0	3,9	4,5-11		4,5
Karyofilen oksit		1,12			6,3		7,7-34	9,3-25,9	
Undekan		1,36							
2,6-Dimetil-2-heptanol	2,17	0,48							
Miristol alkol	2,99								
α -Sedrol	1,12	1,64							
1-Hekzadekanol	4,04			0,7					0,4
Oktadekanal	1,36								
Verbenon	2,28	0,15							
Etil linoleat	1,57								
Etil palmitat	1,63								
3-Karen			7,5						
Mirisen			3,6						
Germakren D				22,9	18,9-22,8		0,1-3,1		
2-Tetradeken						8,2			
Bisiklogerakren						15,3			
Manool								0-13,8	

Ç: Çiçek, Y: Yaprak

5.2. TOPLAM FENOLİK MADDE İÇERİĞİ

Çalışmamızda kullanılan yaprakların en yüksek toplam fenolik madde içeriği 1000 µg/ml derişimindeki etanol ekstralarında 82,96 µg pirokateşol/g kuru madde eşdeğeri olurken

çiçeklerde en yüksek değer hacimce %50'lik etanol-su ekstralarında 44,52 µg pirokateşol/g kuru madde eşdeğeri olmuştur.

Literatüre bakıldığında bu konuda daha çok gallik asit eşdeğeri kullanıldığı görülmektedir. Bunun nedeni olarak da karşılaştırmaların daha iyi yapılabilmesi, gallik asidin suda iyi çözünen ve ucuz bir madde olması yatar. Bunun dışında rutin ile de sık kullanılan bir standart madde olarak karşılaşılr. Metanolle elde ettikleri ekstraların Skerget ve diğ. (2005) 191 mg [135], Spiridon ve diğ (2011) 50 mg [76], Maltaş Çağır ve diğ. (2013) 10,01 mg gallik asit eşdeğeri/g [124], Necip ve Işık (2019) 16-21 mg [236] toplam fenolik madde içerdiğini tespit etmiştir.

Abdelhadi ve diğ. (2015) çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonuyla 21,32 mg gallik asit/g ekstre ve hidrodestilasyonla 4,44 mg gallik asit/g ekstre fenolik içerik tespit ederek ekstraların uçucu yağdan daha kaliteli ürün verdiğini ifade etmiştir [208].

Chimshirova ve diğ. (2019) Bulgaristan'da hacimce %50'lik etil alkol-su çözücüsüyle yaptığı çalışmasının sonucunda buzdolabında 9 ay boyunca bekleyen ekstraların fenolik madde içeriğinin arttığını görmüştür. Taze ürünün fenolik madde içeriği 50,98 mg gallik asit/g kuru madde iken saklama süresi sonunda bu değer 56,69 mg gallik asit/g kuru maddeye ulaşmıştır. Ayrıca doğadan toplanan bitkilerin içeriğinin ticari üründen daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bunun nedeni olarak da ticari üründe yağ bezesi bulunmayan gövde kısımlarının oranının yüksek olması gösterilmiştir [136].

Parzhanova ve diğ. (2018) su, %50 etil alkol-su ve %70 etil alkol-su ile yapılan üç farklı ekstraksiyon işleminin ürünlerini değerlendirdiği çalışmasında 210-220 mg gallik asit/g ekstre aralığında olmak üzere birbirine yakın fenolik içerik değerleri belirlemiştir [70].

Sterbova ve diğ. (2004) *H. perforatum* L'nin içerdiği fenolik asitlerin analizini yapmıştır. Kuru maddenin gramında 83,12 µg protokateşik asit, 41,39 µg vanilik asit, 18,09 µg benzoik asit, 15,18 µg p-hidroksibenzoik asit, 13,35 µg ferulik asit, 12,09 µg gallik asit ve 10 µg'dan az miktarda 3,4-dihidroksibenzaldehit, klorojenik asit, p-hidroksibenzaldehit, kafeik asit, sirinjik asit, vanillin ve p-kumarik asit bulunmuştur [237].

Sıcak ve ışığı bol alan ortamlarda biyoaktif bileşenlerin oranı yüksektir. Fenolik bileşenlerin ve flavonoidlerin oranının büyüme ve çiçeklenme aşamalarında arttığı ve en yüksek değerlerine

tam çiçeklenme döneminde ulaştığı bilinmektedir [118], [119]. Çalışmada kullanılan bitkilerin toplama zamanı da bu döneme denk gelmiştir.

Standart maddenin farklı olması nedeniyle karşılaştırmak güç olsa da elde edilen ekstraktların fenolik madde içeriğinin yeterli seviyede olduğu söylenebilir. Metanole göre daha güvenli bir ekstraksiyon süreci sağlayan etanol ve su ile yaptığımız çalışmalarda yaprakların ve çiçeklerin en iyi sonuçları farklı çözücülerle elde edilmiştir. Bu da literatüre katkı açısından önemli bulunmuştur.

5.3. ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ

5.3.1. CUPRAC Antioksidan Kapasitesi

Çalışmada yürütülen CUPRAC tayininde, fenolik madde içeriği ölçümüne benzer şekilde yapraklar için etanol, çiçekler için etanol-su ürününün antioksidan kapasitesi yüksek bulunmuştur.

En yüksek antioksidan kapasiteleri incelendiğinde, yaprakların 4605 $\mu\text{mol BHA/g}$ kuru madde ve 1893,6 $\mu\text{mol C vitamini/g}$ kuru madde eşdeğeri kapasiteye sahip olduğu tespit edilirken çiçeklerin 1664 $\mu\text{mol BHA/g}$ kuru madde ve 1164 $\mu\text{mol C vitamini/g}$ kuru madde eşdeğeri kadar kapasite gösterdiği belirlenmiştir.

Balkanlardan toplanan *H. perforatum* L. örneklerinin testlerinde antioksidan kapasitesi 73100 $\mu\text{mol } \alpha\text{-tokoferol/ g}$ kuru ekstre olmuştur [113]. Maltaş Çağıl ve diğ. (2013) ise çalışmasında troloks eşdeğeri olarak 19,67 mg/g ekstre antioksidan kapasitesi tespit etmiştir [124]. Adıyaman'dan hasat edilen örneklerin ~1,5 mM troloks eşdeğeri kapasitesi belirlenmiştir [238].

Sentkowska ve diğ (2016) demledikleri ve kaynatıkları *H. perforatum* L. bitkilerinin antioksidan kapasitelerini karşılaştırdıklarında kaynatılarak alınan ürünün biyoaktif bileşenlerce daha zengin olduğunu görmüştür. Bu ürünün CUPRAC tayininde ~3 mM troloks eşdeğeri kapasite belirlenirken demleme ürününde ~1,25 mM troloks eşdeğerliği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak 4,6 mM BHA ve 1,89 mM C vitamini eşdeğeri kapasitesi görülen yaprakların etanollü ekstraktlarının oldukça iyi bir antioksidan etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır.

5.3.2. DPPH Radikalı Süpürme Kapasitesi

DPPH süpürme gücünü ifade etmede en çok kullanılan yöntem radikalın derişiminin yarıya düşmesini sağlayan (IC₅₀) ekstre derişimini vermektir.

Makedonya ve Sırbistan'dan, Bulgaristan'dan, Cezayir'den, Yunanistan'dan, Fransa'dan, Slovakya'dan toplanan örneklerin IC₅₀ değerleri sırasıyla 3,48-5,68  g/ml [29], 242  g/ml [136], 462,36  g/ml [208], 180-230  g/ml [239], 430  g/ml [240], 12,51  g/ml [241] olarak bulunmuştur. Orcic ve diğ. (2011) metanolik ekstrenin Sephadex LH-20 kromatografi kolonuyla ayırdığı fazlarını analiz ettiği çalışmasında flavonoid glikozitlerin yüksek ve biflavonoidlerin düşük seviyelerde olduğu faz en yüksek DPPH süpürücü etkiyi göstermiştir. IC₅₀ değerleri 8 ayrı faz için 0,520-32,8  g/ml aralığında değişirken BHT ve BHA için 8,28 ve 12,4  g/ml olmuştur [134].

Altun ve diğ. (2013) İzmir'den hasat ettikleri bitkilerin etil asetat, metanol ve suyla ardışık ekstraksiyonu ile aldığı ürünün 500  g/ml derişiminde %65,22 süpürücü etki ölçerken [34] Konya'dan toplanan bitkilerin metanollü ekstrelerde 200  g/ml derişimden itibaren DPPH radikalının %80 kadarı [124], şanlıurfa örneklerinin 200  g/ml derişimi ile %25-48'i [236], Adıyaman  rneklerinin 20  g/ml derişimindeki ekstresi ile %20 kadarı giderilmiştir [238]. İtalyan bitkisinde 12  g/ml derişimde %33'l k bir süpürücü etki gözlenmiştir [123].

Çalışmamızda kullanılan yaprakların en yüksek DPPH s p r c l ğ  etanolik ekstresinin 20  g/ml derişiminde (%58), çiçeklerin etanol-su ekstresinin 20  g/ml derişiminde (%52,7) g r lm ştir. Buradan yola çıkılarak verilen çözücüler kullanıldığında IC₅₀ değerinin 20  g/ml'nin altında olacağı anlaşılmaktadır. En etkili DPPH süpürücü ekstre olarak yaprakların etanollü çözeltisi bulunmuş, 40  g/ml derişimde ortamdaki radikalın %90'ından fazlasını uzaklaştırdığı hesaplanmıştır.

Parzhanova ve diğ. (2018) sulu *H. perforatum* L. ekstresinde etil alkol oranının %0'dan %50'ye ve %70'e çıkmasıyla DPPH süpürücü etkisinin az da olsa düştüğünü belirtmiştir [70]. Bizim  alışmamızda da her iki bitki kısmı için de etanolün antioksidan etkiyi arttırdığı belirlenmiştir.

Elde edilen ürünlerin iyi birer DPPH süpürücü etki gösterdiği, dolayısıyla hidroksil grubuna sahip serbest radikallerin nötralize edilmesinde faydalı olabileceği g r lm ştir. Etki değerlerinin birbirinden farklı olması, diğer konularda olduğu gibi bitkinin yetişme yeri, hasat zamanı, ekstraksiyon yöntemi ve çözücüsü gibi nedenlere bağlıdır.

5.4. ÇALKALAMALI SİSTEMDE EKSTRAKSİYON

Literatürde *H. perforatum* L. bitkisinin hiperisin içeriği %0,03-0,3 olarak verilmektedir [125], [139], [214]. Nait-Si ve diğ. (2004) ise ham ekstrenin genellikle yaklaşık %1 toplam hiperisin içerdiğini fakat yapılan çalışmaların çok büyük bir kısmında bu değerin %0,5'in altında kaldığını belirtmiştir [233]. Kurutma, ışık, bitkinin hasat dönemi gibi etmenlerin toplam hiperisin verimini değiştirmedeği ile ilgili ifadeler bulunsa da [120] bitkinin maserasyonunun güneşte bekletilerek sağlandığı çalışmalarda hiperisin içeriğinin azaldığına dair çalışmalar vardır [142]. Biyotip ve mevsim [188], [189], yetiştiği yükseklik, jeolojik özellikler [242] ile ekstraksiyon yöntemi ve çözücü seçimi hiperisin verimi üzerine etkilidir. Cossuta ve diğ (2012) hiperisin bakımından çözücünün polaritesi arttıkça verimin de arttığını ifade etmiştir [196].

Litvanya'dan toplanan bitkilerin kloroform+metanol ekstraksiyonu ürünlerinde görülen en yüksek toplam hiperisin içeriği tomurcuklanma zamanında %0,7, çiçeklenme zamanında %1 olmuştur [243]. Literatürde bunun dışında yer alan basit ekstraksiyon çalışmalarında ise *H. perforatum* L.'deki hiperisin içeriği %0,3 civarında görülmektedir.

Şimdiye kadarki en yüksek hiperisin içeriğine Wang ve diğ. (2014) yanıt yüzey yöntemiyle gerçekleştirdikleri deneysel tasarım çalışmasında karşılaşmıştır. Hesaplamalar sonucu en iyi ekstraksiyon koşulları 2 saatlik sürecin 90°C'de hacimce %77'lik etanol-su ile sürdürülmesi olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda yürütülen denemelerde ortalama %6,76 hiperisin içeren ürünler alınmıştır [244].

Çalışmamızda, en yüksek toplam hiperisin içeriğini sağlayan ekstraksiyon koşulları 25°C'de %60'lık aseton-su ile 120 dk'lık süreçte %0,477 olarak ölçülmüştür. Suyla 80°C'de 120 dk'da %0,034 toplam hiperisin sağlanırken metanolle 45°C'de 60 dk'da %0,106, %60'lık etanol-aseton karışımıyla 45°C'de 120 dk'da %0,280, %80'lik etanol-su karışımıyla 55°C'de 120 dk'da %0,360 toplam hiperisin içeren ürün elde edilmiştir.

Bu değerlerin tümüne bakıldığında asetonun ve etanolün hiperisin kazanımında işlevsel olması fakat birlikte kullanıldıklarında etkilerinin düşmesi, suyun karışımlardaki etkisini göstermektedir. Farklı sıcaklıklarda farklı çözücü bileşimleri öne çıkmıştır. Fakat her durumda geçerli olan, sürenin 60 dk'dan uzun olması gerektiğidir.

Metanolün tek başına kullanımının suyla karışımlarından daha etkili olduğu, metanolün diğerlerine göre hızlı bir süreç sağlamakla birlikte ekstraksiyon verimliliğinin daha düşük

olduğu anlaşılmıştır. 60 dk'nın ardından 120 dk'daki ölçümlerde toplam hiperisin oranında küçük bir düşüş olması metanolün daha fazla hiperisin kazanamayacağını göstermiştir. Çözücü miktarının artırılması hiperisin içeriğini arttırabilir.

5.5. BATARYA TİPİ EKSTRAKTÖRDE EKSTRAKSİYON

Bu çalışmada, çalkalamalı sistemde yaptığımız ön denemeler ve literatür bilgileri ışığında uygun çözücü olarak hacimce %50'lik etanol-su karışımı kullanılmıştır. Çözücü akış hızı 62,5 ml/dk olarak seçilmiştir. Yarı sürekli sistemde, debinin yüksek olması durumunda çözücü doygunluğa ulaşamazken çok düşük olduğunda ise ürün alımı zorlaşmış ve uzun bir süreye ihtiyaç duyulmuştur.

3 kolonlu sistemde 113 dk'da %0,40 toplam hiperisin içeren ürün alınmıştır. Kolon sayısı 4'e çıkarılıp işlem süresi 165 dk'ya uzatıldığında bu oran %2,34'e ulaşmıştır. Sıcaklığın verimi artırıcı etkisi izlenmiş olup bu parametrenin kolon sayısına göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Çok kolonlu çalışmalarda süreç sonlandırıldığında önceki kolonlardan alınan örneklerde hiperisin varlığı tespit edilmiştir. Bu da sürecin daha uzun tutulması veya kolonların yer değiştirmesi hâlinde daha verimli bir ürün alınacağını göstermektedir.

Karşılaştırma yapılabilecek bir pilot ölçekli çalışmayı Koul ve Koul (2007) yapmıştır. Bu çalışmada, kesikli ve karıştırmalı bir sistemde etanol kullanarak %2,5 hiperisin içeren ekstreyi %22,15 verimle elde edilmiştir. Bu verime 15 kg bitkinin 100 litre etanolle her biri 1 saat süren 3 kez ekstraksiyonuyla 75-80°C sıcaklıkta ulaşılmıştır [245].

Cossuta ve diğ. (2012) 1 kg bitkinin 3 litre etanolle pilot ölçekli ekstraksiyonunu gerçekleştirmiştir. 5 saat süren işlem sonunda Eylül ayında toplanan örneklerden 38 mg/kg, Temmuz ayında toplanan örneklerden ise 60 mg/kg hiperisin elde edilmiştir. Temmuz ayı örneklerinin UV-Vis spektrofotometresiyle analizinde ise %0,085 toplam hiperisin ölçülmüştür [196].

Bu iki çalışmayla karşılaştırıldığında çalışmamızda kullanılan 4 kolonlu batarya tipi ekstraktör sistemi iyi bir etkinlik göstermiştir.

5.6. SAFLAŞTIRMA

Ramezani ve Zamani (2017) bitkinin diklorometan ve sonra metanol:aseton (2:1) ile ekstraksiyonu sonrası elde edilen ürünün silika jel doldurulmuş kolonda metanol:aseton:diklorometan (75:10:15) ile saflaştırılmasına çalışılmıştır. Saf olarak elde edilen hiperisin içeriği 5,105 mg/g olarak tespit edilmiştir [215].

Smelcerovic ve diğ. (2002) farklı saflaştırma yöntemlerini incelemiştir. Ürünlerin hiperisin içerikleri flaş kolon kromatografisiyle %3,6, yüksek hızlı karşıt akış kromatografisiyle %0,61, XAD katı faz ekstraksiyonu ile %0,84, Sephadex kolon kromatografisiyle %73,5 oranlarına yükseltilmiştir [246].

Karioti ve diğ. (2009) 880 mg maddenin dietil eter ve etil asetat ile ardışık ekstraksiyonları sonrası metanolla Sephadex LH-20 ayırıştırması sonucunda %98 toplam hiperisin içeren 5,2 mg ürün elde edilmiştir [214].

Hiperisin piridin-metanolik HCl karışımında erime noktası 300°C'nin üzerinde koyu kırmızı iğnecikler şeklinde kristallenir [247].

Çalışmamızda incelenen kolon kromatografisi ve kristallendirme yöntemleri literatür verileriyle karşılaştırılmıştır. Yürütülen kolon kromatografisi denemesinde toplam hiperisin içeriği %0,0683 olan 0,2127 g/g kuru madde ürün elde edilirken piridinle kristallendirme denemesinde %0,1481 toplam hiperisine sahip 0,1148 g/g kuru madde ürün sağlanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hidrodestilasyon yöntemi, uçucu yağ üretiminde sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu tez çalışmasında Clevenger aparatı ile gerçekleştirilen bu yöntem ile elde edilen uçucu yağların verimleri çiçekler için 54 bileşenden oluşan %0,27 (g/g) uçucu yağ ve yapraklar için 52 bileşenden oluşan %0,68 (g/g) olarak bulunmuştur. Bileşenlere bakıldığında, terpenik bileşiklerin oranının düşük olduğu, alifatik hidrokarbonlar ve türevlerinin baskın olduğu görülmüştür. Öne çıkan terpenik bileşenler monoterpen sınıfına dâhil olup seskiterpen varlığı da dikkate değer orandadır. Özellikle *H. perforatum* L. çiçeklerinin yapısının yapraklara göre ısıya karşı daha hassas olması nedeniyle hem kurutma aşamasında hem de hidrodestilasyon sırasında bazı bileşenlerini kaybettiği düşünülebilir. Bu nedenle, *H. perforatum* L. uçucu yağ çalışmalarında kurutmanın serin bir ortamda veya liyofilizasyon gibi bileşenlerin kaybını önleyecek bir yöntemle gerçekleştirilmesi, hidrodestilasyon yerine buhar destilasyonu kullanılması önerilmektedir.

Buhar destilasyonu ve hidrodestilasyonun yanı sıra anfloraj ve fermantasyon da uçucu yağ üretiminde kullanılır. Polar çözücülerle üretilen *H. perforatum* L. ekstralarının uçucu yağlarından daha yüksek antioksidan aktivitesine sahip olması [248] ve uçucu yağ verimlerinin düşük olması nedeniyle piyasada daha çok ekstraları tüketime sunulmaktadır [125]. *H. perforatum* L., aromatik özelliklerinden çok tıbbi etkileri nedeniyle kullanılan bir bitkidir. Geleneksel kullanımında daha çok antidepresif ve antimikrobiyal etkilerinden yararlanılması amaçlanırken, bitkinin azımsanmayacak bir antioksidan kapasitesine sahip olduğu da bilinmektedir. Antioksidan kapasitesinin ölçümünde CUPRAC ve DPPH süpürme yöntemleri kullanılmıştır. CUPRAC antioksidan kapasitesi tayini, kullanılan en basit, en düşük maliyetli ve en yaygın kullanım alanına sahip yöntemlerden biridir. DPPH radikalının ortamdan süpürülmesinin ölçüldüğü yöntem de basit ve sık kullanılan yöntemlerdendir. Etil alkol, su ve etil alkol-su (1:1) ile elde edilen ekstraların antioksidan kapasiteleri, standart antioksidan olarak kullanılan BHA, BHT ve C vitamini ile karşılaştırıldığında BHT ve BHA'ya daha yakın bulunmuştur. 100 µg/ml ekstraların CUPRAC sonuçlarına göre, yaprakların etanol ile (33,35 µg/ml BHA ve 83,63 µg/ml C vitamini) ve çiçeklerin etanol-su karışımıyla (21,78 µg/ml BHA ve 30,99 µg/ml C vitamini) ekstraksiyon ürünleri en yüksek kapasiteli ürünler olmuştur. DPPH

süpürme gücü sonuçları da genel olarak benzer şekildedir. Fakat daha düşük derişimlerde ortamdaki DPPH'ı gidermekte görece yetersiz kalan sulu ekstrenin 80 µg/ml derişimin üzerinde diğer ekstrelerin önüne geçtiği görülmüştür. Bununla birlikte, yaprakların etanol içindeki 40 µg/ml, çiçeklerin ise etanol-su içindeki 60 µg/ml derişime sahip ekstreleri optimum DPPH süpürme gücüne sahip bulunmuştur. Bitkinin toplam fenolik madde içeriğinin incelendiği Folin-Ciocalteu yönteminin uygulanmasında standart olarak pirokateşol kullanılmıştır. 20-100 µg/ml pirokateşol eşdeğerlik aralığında toplam fenolik madde içeriği 200-1000 µg/ml derişimdeki ekstrelerde görülmüştür. Buna göre, yaprakların fenolik içeriği etanol, etanol-su ve su ile elde edilen ekstrelerde 1000 µg/ml derişim için sırasıyla 82,96 µg/ml, 58,83 µg/ml ve 55,78 µg/ml olurken çiçekler için bu değerler 30,93 µg/ml, 44,52 µg/ml ve 39,24 µg/ml olmuştur. Fenolik içeriğinden yararlanmak istendiğinde *H. perforatum* L. yapraklarının etanollü ekstresinin tercih edilmesi, çiçekler kullanılacak olursa etanol-su karışımının kullanılmasının daha iyi olacağı anlaşılmıştır.

Bitkinin yağına rengini veren hiperisinin ekstredeki varlığının spektrofotometrik olarak ölçülebilmesi ekstrelerin kalitesinin belirlenebilmesinde önemli bir avantajdır. Başlıca özelliği antidepresan etkili olan hiperisin psödo-, proto-, protopsödo- gibi türevleriyle birlikte toplam hiperisin olarak adlandırılır ve bu bileşimin ekstre içindeki oranı UV-Vis spektrofotometresinde 590 nm'de ölçülen absorbans ile hesaplanır. Ekstraksiyon çözücüsü olarak etanol, metanol, aseton ve bunların sulu karışımı kullanıldığında en yüksek toplam hiperisin içeriği %60'lık aseton-su karışımı ile 25°C'de 120 dk'lık süreçle elde edilmiştir. 100 g kurutulmuş çiçekte 0,477 g toplam hiperisin tespit edilmiştir.

Batarya tipi ekstraktörle yapılan çalışmada sıcaklığın, alkol-su karışımının ve çözücü debisinin en verimli koşulları belirlendikten sonra 1, 3 ve 4 kolonlu sistemler için toplam hiperisin verimi incelenmiştir. Zamanla alınan ürün miktarı aritmetik olarak artarken kazanılan hiperisin içeriğinin azalması nedeniyle üründeki hiperisin miktarının arttığı bilinmesine rağmen absorbans azalmıştır. Bu yüzden kesikli sistem için geçerli olan formül her bir kolon için uygulanmış ve her kolonda görülen hiperisin kazanımı son ürün için toplanarak bulunmuştur. Yarı kesikli bir sistem olan batarya tipi ekstraktörde süreç tamamlandığında tüm kolonlarda hâlâ hiperisin içeriği bulunduğu görülmüştür. Denemeler sona erdirilse de gerçekte daha uzun süren ve/veya kolonları yer değiştirilen bir sistemde verim daha yüksek olacaktır.

Hiperisin ve türevlerinin bitkide düşük miktarda bulunması nedeniyle saflaştırılması zahmetlidir. Farklı uygulamalar bulunsa da sistematize edilmiş bir yöntem henüz literatüre sunulmamıştır. Hiperisin kazanımına uygunluğu anlaşılan silika jel dolgu maddesi kullanılarak gerçekleştirilen kolon kromatografisinde elde edilen ürün miktarı kristallendirilen ürün miktarından daha fazla olsa da UV-Vis spektrofotometresiyle ölçülen toplam hiperisin içeriği daha düşük olmuştur. Daha büyük miktarda bitki kütlesiyle işlemlere başlamak, farklı yöntemleri ardışık olarak kullanmak, kolon kromatografisi için literatürde yer alanların dışındaki çözücü karışımlarını denemek önerilebilir.



KAYNAKLAR

- [1] G. Yetkin, “Türkiye’de Satılan Ticari Kantaron Yağı Üzerinde Fitoterapötik Yönden Araştırmalar”, Gazi Üniversitesi, 2008.
- [2] Anonymous, “Hypericin, from *Hypericum perforatum*”, *Merck*, 2022. [Çevrimiçi]. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/h9252>.
- [3] T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, “Sarı Kantaron Fizibilite Raporu ve Yatırımcı Rehberi”, Ankara, 2020.
- [4] B. Büyük, “Sıçan Fetüslerinde Kantaron (*Hypericum perforatum*) Otunun Karaciğere Etkisi”, Gaziantep Üniversitesi, 2009.
- [5] S. Ekren, Ç. Sönmez, ve E. Bayram, “Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Klonlarında Bazı Tarımsal ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi”, *Tarım Bilim. Derg.*, c. 16, ss. 225–234, 2010.
- [6] M. Altıparmak, “Diabetik Ratlarda Kantaronun Deri Yarası Üzerine Etkisi”, Erciyes Üniversitesi, 2012.
- [7] D. Çelikkol, “*Hypericum perforatum* L. Bitkisinden Elde Edilen Kantaron Yağının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi”, Cumhuriyet Üniversitesi, 2015.
- [8] M. Şahin, “Sarı kantaron: Doğanın Altın Renkli Şifacısı”, *Apelasyon*, 2014. [Çevrimiçi]. Available at: <http://www.apelasyon.com/Yazi/129-sari-kantaron-doganin-altin-renkli-sifacisi>.
- [9] Anonymous, “St. John’s Wort - *Hypericum perforatum*”, *Steven Foster Group, Inc.* [Çevrimiçi]. Available at: <https://www.stevenfoster.com/education/monograph/hypericum2.html>.

- [10] Anonymous, “TRB1 Bölgesi Bitkisel Üretim Sektörü Stratejisi ve Eylem Planı”, Malatya, 2012.
- [11] Anonymous, “Çiftçilik Faaliyetlerinin Çeşitlendirilmesi ve Geliştirilmesi Alt Tedbiri Kapsamında Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Referans Listesi”, *TKDK Aydın İl Koordinatörlüğü*, 2014. [Çevrimiçi]. Available at: <https://aydin.tkd.gov.tr/Duyuru.aspx?Id=1171>.
- [12] S. Mederos-Molina, “Micropropagation of *Hypericum canariense* L. for the Production of Hypericin”, içinde *Medicinal and Aromatic Plants XI*, 1. baskı, T. Nagata ve Y. Ebizuka, Ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 2002, ss. 94–117.
- [13] N. Çamas ve M. S. Odabas, “Kantaron’da (*Hypericum perforatum* L.) Işık ve Sıcaklığın Büyüme, Gelişme ve Hiperisin Üzerine Kantitatif Etkilerinin Matematiksel Modelleme ile Belirlenmesi”, Samsun, 2009.
- [14] J. M. Greeson, B. Sanford, ve D. A. Monti, “St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*): A Review of the Current Pharmacological, Toxicological, and Clinical Literature”, *Psychopharmacology (Berl)*, c. 153, sayı 4, ss. 402–414, 2001.
- [15] J. Barnes, L. A. Anderson, ve J. D. Phillipson, “St John’s wort (*Hypericum perforatum* L.): A Review of Its Chemistry, Pharmacology and Clinical Properties.”, *J. Pharm. Pharmacol.*, c. 53, sayı 5, ss. 583–600, 2001.
- [16] M. Kaundal, R. Sharma, ve R. Kumar, “Elevated CO₂ and Temperature Effect on growth, Phenology, Biomass and Hypericin Content of *Hypericum perforatum* L. in the Western Himalaya”, *Plant Physiol. Reports*, c. 26, sayı 1, ss. 116–127, 2021.
- [17] K. Makarova vd., “Harvest Time Affects Antioxidant Capacity, Total Polyphenol and Flavonoid Content of Polish St. John’s Wort’s (*Hypericum perforatum* L.) Flowers”, *Sci. Rep.*, c. 11, sayı 1, ss. 1–12, 2021.
- [18] S. M. A. Zobayed, F. Afreen, E. Goto, ve T. Kozai, “Plant-Environment Interactions: Accumulation of Hypericin in Dark Glands of *Hypericum perforatum*”, *Ann. Bot.*, c. 98, sayı 4, ss. 793–804, 2006.
- [19] S. M. A. Zobayed, F. Afreen, ve T. Kozai, “Temperature Stress Can Alter the

- Photosynthetic Efficiency and Secondary Metabolite Concentrations in St. John's Wort", *Plant Physiol. Biochem.*, c. 43, ss. 977–984, 2005.
- [20] H. Rowshan, "St. John's Wort-An Herbal Myth or A Botanical Miracle", *Open Sci. J. Clin. Med.*, c. 2, sayı 2, ss. 47–53, 2014.
- [21] J. Sarris, A. Panossian, I. Schweitzer, C. Stough, ve A. Scholey, "Herbal Medicine for Depression, Anxiety and insomnia: A Review of Psychopharmacology and Clinical Evidence", *Eur. Neuropsychopharmacol.*, c. 21, sayı 12, ss. 841–860, 2011.
- [22] A. Kumar, R. Garg, ve A. K. Prakash, "Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) Treatment on Restraint Stress-Induced Behavioral and Biochemical Alteration in Mice", *BMC Complement. Altern. Med.*, c. 10, sayı 1, s. 18, Ara. 2010.
- [23] P. Jungke vd., "Profiling of Hypothalamic and Hippocampal Gene Expression in Chronically Stressed Rats Treated with St. John's Wort Extract (STW 3-VI) and Fluoxetine", *Psychopharmacology (Berl.)*, c. 213, sayı 4, ss. 757–772, 2011.
- [24] Q. X. Ng, N. Venkatanarayanan, ve C. Y. X. Ho, "Clinical Use of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) in Depression: A Meta-Analysis", *J. Affect. Disord.*, c. 210, sayı December 2016, ss. 211–221, 2017.
- [25] K. Linde, M. M. Berner, ve L. Kriston, "St John' s Wort for Major Depression (Review)", *Cochrane Database Syst. Rev.*, sayı 4, ss. 1–55, 2008.
- [26] Y. Öztürk, S. Aydın, R. Beis, K. H. C. Başer, ve H. Berberoğlu, "Effects of *Hypericum perforatum* L and *Hypericum calycinum* L Extracts on the Central Nervous System in Mice", *Phytomedicine*, c. 3, sayı 2, ss. 139–146, 1996.
- [27] N. Kladar vd., "St. John's Wort Herbal Teas–Biological Potential and Chemometric Approach to Quality Control", *Plant Foods Hum. Nutr.*, c. 75, sayı 3, ss. 390–395, 2020.
- [28] B. Kraus, H. Wolff, J. Heilmann, ve E. F. Elstner, "Influence of *Hypericum perforatum* Extract and Its Single Compounds on Amyloid- β Mediated Toxicity in Microglial Cells", *Life Sci.*, c. 81, sayı 11, ss. 884–894, 2007.
- [29] B. Božin vd., "Impact of Origin and Biological Source on Chemical Composition,

- Anticholinesterase and Antioxidant Properties of Some St. John's Wort Species (*Hypericum* spp., hypericaceae) From the Central Balkans", *Molecules*, c. 18, sayı 10, ss. 11733–11750, 2013.
- [30] T. Griffith, L. Varela-Nallar, M. Dinamarca, ve N. Inestrosa, "Neurobiological Effects of Hyperforin and Its Potential in Alzheimer's Disease Therapy", *Curr. Med. Chem.*, c. 17, sayı 5, ss. 391–406, 2010.
- [31] O. K. Eğilmez, N. Kökten, A. I. D. Ekici, M. T. Kalcioğlu, E. Yesilada, ve M. Tekin, "The Effect of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) on Prevention of Myringosclerosis After Myringotomy in A Rat Model", *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, c. 79, sayı 7, ss. 1128–1134, 2015.
- [32] A. A. Abolfathi, Y. Doustar, P. Mortazavi, ve A. Rezai, "Effect of *Hypericum perforatum* Extract on Renal Ischemic Reperfusion Injury in Rat.pdf", *Journal of Animal and Veterinary Advances*, c. 10, sayı 24, ss. 3244–3248, 2011.
- [33] R. H. Poppenga, "Herbal Medicine: Potential for Intoxication and Interactions with Conventional Drugs", *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, c. 17, sayı 1, ss. 6–18, 2002.
- [34] M. L. Altun, B. S. Yilmaz, I. E. Orhan, ve G. S. Citoglu, "Assessment of Cholinesterase and Tyrosinase Inhibitory and Antioxidant Effects of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort)", *Ind. Crops Prod.*, c. 43, sayı 1, ss. 87–92, 2013.
- [35] A. I. Oliveira, C. Pinho, B. Sarmento, ve A. C. P. Dias, "Neuroprotective Activity of *Hypericum perforatum* and Its Major Components", *Front. Plant Sci.*, c. 7, ss. 1–15, 2016.
- [36] A. Paulke, M. Schubert-Zsilavecz, ve M. Wurglics, "Determination of St. John's Wort Flavonoid-Metabolites in Rat Brain through High Performance Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection", *J. Chromatogr. B*, c. 832, sayı 1, ss. 109–113, 2006.
- [37] M. T. Sultan, M. S. Buttxs, M. M. N. Qayyum, ve H. A. R. Suleria, "Immunity: Plants as Effective Mediators", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, c. 54, sayı 10, ss. 1298–1308, 2014.
- [38] H. Laggner, S. Schmid, ve H. Goldenberg, "Hypericin and Photodynamic Treatment Do

- Not Interfere with Transport of Vitamin C During Respiratory Burst”, *Free Radic. Res.*, c. 38, sayı 10, ss. 1073–1081, 2004.
- [39] L. A. Schmitt, Y. Liu, P. A. Murphy, J. W. Petrich, P. M. Dixon, ve D. F. Birt, “Reduction in Hypericin-Induced Phototoxicity by *Hypericum perforatum* Extracts and Pure Compounds”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, c. 85, sayı 2, ss. 118–130, 2006.
- [40] W. D. Lu ve W. M. Atkins, “A Novel Antioxidant Role for Ligandin Behavior of Glutathione S-Transferases: Attenuation of the Photodynamic Effects of Hypericin”, *Biochemistry*, c. 43, sayı 40, ss. 12761–12769, 2004.
- [41] H. Trommer ve R. H. H. Neubert, “Screening for New Antioxidative Compounds for Topical Administration Using Skin Lipid Model Systems”, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, c. 8, sayı 3, ss. 494–506, 2005.
- [42] Y.-Y. He, C. F. Chignell, D. S. Miller, U. P. Andley, ve J. E. Roberts, “Phototoxicity in Human Lens Epithelial Cells Promoted by St. John’s Wort”, *Photochem. Photobiol.*, c. 80, sayı 3, s. 583, 2004.
- [43] P. P. McCue ve J. M. Phang, “Identification of Human Intracellular Targets of the Medicinal Herb St. John’s Wort by Chemical-Genetic Profiling in Yeast”, *J. Agric. Food Chem.*, c. 56, sayı 22, ss. 11011–11017, 2008.
- [44] K. P. Özen, F. Şahin, Ç. B. Avci, Y. Hişil, C. Gündüz, ve G. Saydam, “*Hypericum perforatum* Extract (St. John’s Wort) and Hypericin Induce Apoptosis in Leukemic HL-60 Cells by Effecting h-TERT Activity”, *Turkish J. Hematol.*, c. 24, sayı 3, ss. 127–133, 2007.
- [45] K.-S. Kil, Y.-N. Yum, S.-H. Seo, ve K.-T. Lee, “Antitumor Activities of Hypericin As A Protein Tyrosine Kinase Blocker”, *Arch. Pharm. Res.*, c. 19, sayı 6, ss. 490–496, 1996.
- [46] P. Agostinis, A. Vantieghem, W. Merlevede, ve P. A. M. De Witte, “Hypericin in Cancer Treatment: More Light on the Way”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, c. 34, sayı 3, ss. 221–241, 2002.
- [47] T. A. Theodossiou, J. S. Hothersall, P. A. De Witte, A. Pantos, ve P. Agostinis, “The Multifaceted Photocytotoxic Profile of Hypericin”, *Mol. Pharm.*, c. 6, sayı 6, ss. 1775–

1789, 2009.

- [48] L. A. Mayurnikova, S. F. Zinchuk, N. I. Davydenko, ve S. A. Gilmulina, “Development of A Functional Basis of Phyto-Beverages with An Increased Antioxidant Activity for the Correction of Nutrition of Patients with Diabetes mellitus”, *Foods Raw Mater.*, c. 5, sayı 2, ss. 178–188, 2017.
- [49] M. Novelli, P. Masiello, P. Beffy, ve M. Menegazzi, “Protective Role of St. John’s Wort and Its Components Hyperforin and Hypericin against Diabetes through Inhibition of Inflammatory Signaling: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies”, *Int. J. Mol. Sci.*, c. 21, sayı 21, ss. 1–35, 2020.
- [50] A. P. Peron, R. G. Mariucci, I. V. de Almeida, E. Düsman, M. S. Mantovani, ve V. E. P. Vicentini, “Evaluation of the Cytotoxicity, Mutagenicity and Antimutagenicity of A Natural Antidepressant, *Hypericum perforatum* L. (St. John’s Wort), on Vegetal and Animal Test Systems”, *BMC Complement. Altern. Med.*, c. 13, ss. 1–9, 2013.
- [51] H. Laggner vd., “The Main Components of St. John’s Wort Inhibit Low-Density Lipoprotein Atherogenic Modification: A Beneficial ‘Side effect’ of An OTC Antidepressant Drug?”, *Free Radic. Res.*, c. 41, sayı 2, ss. 234–241, 2007.
- [52] V. Kaplan, G. N. Hasanoglu Erbasar, L. Cigerim, H. Altay Turgut, ve A. Cerit, “Effect of St. John’s Wort Oil and Olive Oil on the Postoperative Complications after Third Molar Surgery: Randomized, Double-Blind Clinical Trial”, *Clin. Oral Investig.*, c. 25, sayı 4, ss. 2429–2438, 2021.
- [53] A. Mohammadirad vd., “Anti-Aging Effects of Some Selected Iranian Folk Medicinal Herbs-Biochemical Evidences”, *Iran. J. Basic Med. Sci.*, c. 16, sayı 11, ss. 1170–1180, 2013.
- [54] O. Grundmann, Y. Lv, O. Kelber, ve V. Butterweck, “Mechanism of St. John’s Wort Extract (STW3-VI) during Chronic Restraint Stress is Mediated by the Interrelationship of the Immune, Oxidative Defense, and Neuroendocrine System”, *Neuropharmacology*, c. 58, sayı 4–5, ss. 767–773, 2010.
- [55] M. Naziroğlu, B. Çiğ, ve C. Özgül, “Modulation of Oxidative Stress and Ca²⁺

Mobilization through TRPM2 Channels in Rat Dorsal Root Ganglion Neuron by Hypericum perforatum”, *Neuroscience*, c. 263, ss. 27–35, 2014.

- [56] N. Öztürk, S. Korkmaz, ve Y. Öztürk, “Wound-Healing Activity of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) on Chicken Embryonic Fibroblast”, *J. Ethnopharmacol.*, c. 111, sayı 1, ss. 33–39, 2007.
- [57] M. Heinrich, V. Vikuk, R. Daniels, F. C. Stintzing, ve D. R. Kammerer, “Characterization of *Hypericum perforatum* L. (St. John’s Wort) Macerates Prepared with Different Fatty Oils upon Processing and Storage”, *Phytochem. Lett.*, c. 20, ss. 470–480, 2017.
- [58] I. P. Süntar vd., “Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L.”, *J. Ethnopharmacol.*, c. 127, sayı 2, ss. 468–477, 2010.
- [59] D. Hizli vd., “Effect of *Hypericum perforatum* on Intraperitoneal Adhesion Formation in Rats”, *Arch. Med. Sci.*, c. 10, sayı 2, ss. 396–400, 2014.
- [60] N. Kitikannakorn, N. Chaiyakunapruk, P. Nimpitakpong, P. Dilokthornsakul, E. Meepoo, ve W. Kerdpeng, “An Overview of the Evidences of Herbals for Smoking Cessation”, *Complement. Ther. Med.*, c. 21, sayı 5, ss. 557–564, 2013.
- [61] M. Tomczyk, M. Zovko-Končić, ve L. Chrostek, “Phytotherapy of Alcoholism”, *Nat. Prod. Commun.*, c. 7, sayı 2, ss. 273–280, 2012.
- [62] Ö. Doğan ve A. Avcı, “Bitkilerle Tedavi ve İlaç Etkileşimleri”, *Türkiye Klin.*, c. 4, sayı 1, ss. 49–54, 2018.
- [63] F. J. Dunne, “The ‘Natural Health Service’: Natural Does Not Mean Safe”, *Adv. Psychiatr. Treat.*, c. 15, sayı 1, ss. 49–56, 2009.
- [64] G. W. Elmer, W. E. Lafferty, P. T. Tyree, ve B. K. Lind, “Potential Interactions between Complementary/Alternative Products and Conventional Medicines in A Medicare Population”, *Ann. Pharmacother.*, c. 41, sayı 10, ss. 1617–1624, 2007.
- [65] Y. W. F. Lam, S. M. Huang, ve S. D. Hall, *Herbal Supplements-Drug Interactions: Scientific and Regulatory Perspectives*. Boca Raton: CRC Press, 2006.

- [66] S. Lawvere ve M. C. Mahoney, “St. John’s Wort”, *Am. Fam. Physician*, c. 72, sayı 11, ss. 2249–2254, 2005.
- [67] R. Saller, J. Melzer, ve J. Reichling, “Johanniskraut (*Hypericum perforatum*): Ein Plurivalenter Rohstoff für Traditionelle und Moderne Therapien”, *Forschende Komplementarmedizin und Klass. Naturheilkd.*, c. 10, sayı SUPPL. 1, ss. 33–40, 2003.
- [68] S. Shi ve U. Klotz, “Drug Interactions with Herbal Medicines”, *Clin. Pharmacokinet.*, c. 51, sayı 2, ss. 77–104, 2012.
- [69] B. J. Tesch, “Herbs Commonly Used by Women: An Evidence-Based Review”, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, c. 188, sayı 5 SUPPL., ss. 44–55, 2003.
- [70] A. B. Parzhanova, N. T. Petkova, I. G. Ivanov, ve S. D. Ivanova, “Evaluation of Biologically Active Substance and Antioxidant Potential of Medicinal Plants Extracts for Food and Cosmetic Purposes”, *J. Pharm. Sci. Res.*, c. 10, sayı 7, ss. 1804–1809, 2018.
- [71] U. Cakilcioglu, S. Khatun, I. Turkoglu, ve S. Hayta, “Ethnopharmacological Survey of Medicinal Plants in Maden (Elazig-Turkey)”, *J. Ethnopharmacol.*, c. 137, sayı 1, ss. 469–486, 2011.
- [72] N. Ip, T. Pang, ve F. Ip, “Recent Development in the Search for Effective Antidepressants Using Traditional Chinese Medicine”, *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, c. 8, sayı 1, ss. 64–71, 2008.
- [73] A. Krasteva, M. Baeva, T. Gogova, T. Dessev, ve A. Yovchev, “6th International CIGR Technical Symposium”, içinde *Functional Components in Bulgarian Herbs and Possibilities for Usage in Bread Making*, 2011.
- [74] R. Polat, U. Cakilcioglu, ve F. Satil, “Traditional Uses of Medicinal Plants in Solhan (Bingöl-Turkey)”, *J. Ethnopharmacol.*, c. 148, sayı 3, ss. 951–963, 2013.
- [75] K. Solati, M. Karimi, M. Rafieian-Kopaei, N. Abbasi, S. Abbaszadeh, ve M. Bahmani, “Phytotherapy for Wound Healing: The Most Important Herbal Plants in Wound Healing Based on Iranian Ethnobotanical Documents”, *Mini-Reviews Med. Chem.*, c. 21, sayı 4, ss. 500–519, 2020.

- [76] I. Spiridon, R. Bodirlau, ve C. A. Teaca, “Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Plants Used in Traditional Romanian Herbal Medicine”, *Cent. Eur. J. Biol.*, c. 6, sayı 3, ss. 388–396, 2011.
- [77] R. Zhang, Y. Ji, X. Zhang, E. J. Kennelly, ve C. Long, “Ethnopharmacology of Hypericum Species in China: A Comprehensive Review on Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology”, *J. Ethnopharmacol.*, c. 254, s. 112686, 2020.
- [78] Committee on Herbal Medicinal Products, “Assessment report on Hypericum perforatum L., herba”, London, 2018.
- [79] E. J. Hunt, C. E. Lester, E. A. Lester, ve R. L. Tackett, “Effect of St. John’s Wort on Free Radical Production”, *Life Sci.*, c. 69, sayı 2001, ss. 181–190, 2001.
- [80] C. R. Soliva, S. Widmer, ve M. Kreuzer, “Ruminal Fermentation of Mixed Diets Supplemented with St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*) Flowers and Pine (*Pinus mugo*) Oil or Mixtures Containing These Preparations”, *J. Anim. Feed Sci.*, c. 17, sayı 3, ss. 352–362, 2008.
- [81] S. Reyes-Cerpa vd., “Effect of Yeast (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) and Plant (Saint John’s Wort, Lemon Balm, and Rosemary) Extract Based Functional Diets on Antioxidant and Immune Status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Subjected to Crowding Stress”, *Fish Shellfish Immunol.*, c. 74, sayı 2018, ss. 250–259, 2018.
- [82] A. Alahmad, A. Feldhoff, N. C. Bigall, P. Rusch, T. Scheper, ve J.-G. Walter, “Hypericum perforatum L.-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Exhibiting Antioxidant and Anticancer Activities”, *Nanomaterials*, c. 11, sayı 2, s. 487, 2021.
- [83] A. M. Manea, B. S. Vasile, ve A. Meghea, “Antioxidant and Antimicrobial Activities of Green Tea Extract Loaded into Nanostructured Lipid Carriers”, *Comptes Rendus Chim.*, c. 17, sayı 4, ss. 331–341, 2014.
- [84] A. M. Manea, C. Ungureanu, ve A. Meghea, “Effect of Vegetable Oils on Obtaining Lipid Nanocarriers for Sea Buckthorn Extract Encapsulation”, *Comptes Rendus Chim.*, c. 17, sayı 9, ss. 934–943, 2014.
- [85] M. Z. Fiume, “Final Report on the Safety Assessment of Hypericum perforatum Extract

- and Hypericum perforatum Oil”, *Int. J. Toxicol.*, c. 20, sayı 2_suppl, ss. 31–39, 2001.
- [86] K. H. Alzoubi, L. Abdel-Hafiz, O. F. Khabour, T. El-Elimat, M. A. Alzubi, ve F. Q. Alali, “Evaluation of the Effect of Hypericum triquetrifolium Turra on Memory Impairment Induced by Chronic Psychosocial Stress in Rats: Role of BDNF”, *Drug Des. Devel. Ther.*, c. 14, ss. 5299–5314, 2020.
- [87] C. Feucht ve D. R. Patel, “Herbal Medicines in Pediatric Neuropsychiatry”, *Pediatr. Clin. North Am.*, c. 58, sayı 1, ss. 33–54, 2011.
- [88] A. M. Aleisa, “Cytological and Biochemical Effects of St. John’s Wort Supplement (A Complex Mixture of St. John’s Wort, Rosemary and Spirulina) on Somatic and Germ Cells of Swiss Albino Mice”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, c. 5, sayı 5, ss. 408–417, 2008.
- [89] M. J. Meredith, “Herbal Nutraceuticals: A Primer for Dentists and Dental Hygenists”, *J. Contemp. Dent. Pract.*, c. 2, sayı 2, ss. 48–62, 2001.
- [90] Anonymous, “Natural medicines comprehensive database: St. John’s wort”, *Therapeutic Research Center (TRC) Healthcare*, 2020. [Çevrimiçi]. Available at: <https://naturalmedicines.therapeuticresearch.com/databases/food,-herbs-supplements/professional.aspx?productid=329>.
- [91] J. Strandell, A. Neil, ve G. Carlin, “An Approach to the In Vitro Evaluation of Potential for Cytochrome P450 Enzyme Inhibition from Herbals and Other Natural Remedies”, *Phytomedicine*, c. 11, ss. 98–104, 2004.
- [92] K. Zabłocka-Słowińska, K. Jawna, H. Grajeta, ve J. Biernat, “Interactions Between Preparations Containing Female Sex Hormones and Dietary Supplements”, *Adv. Clin. Exp. Med.*, c. 23, sayı 4, ss. 657–663, 2014.
- [93] T. Dost, H. Ozkayran, F. Gokalp, C. Yenisey, ve M. Birincioglu, “The Effect of Hypericum perforatum (St. John’s Wort) on Experimental Colitis in Rat”, *Dig. Dis. Sci.*, c. 54, sayı 6, ss. 1214–1221, Haz. 2009.
- [94] T. Genovese vd., “Hypericum perforatum Attenuates the Development of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice”, *Shock*, c. 25, sayı 2, ss. 161–167, 2006.

- [95] A. O. Sehirli vd., “St. John’s Wort May Ameliorate 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid Colitis of Rats through the Induction of Pregnane X Receptors and/or P-Glycoproteins”, *J. Physiol. Pharmacol.*, c. 66, sayı 2, ss. 203–214, 2015.
- [96] D. Djukić-Ćosić vd., “Cadmium Content in *Hypericum perforatum* L. and *Thymus serpyllum* L. from Localities of the Mountains Rtanj and Ozren”, *Vojnosanit. Pregl.*, c. 68, sayı 11, ss. 930–934, 2011.
- [97] M. R. Gomez, S. Cerutti, R. A. Olsina, M. F. Silva, ve L. D. Martínez, “Metal Content Monitoring in *Hypericum perforatum* Pharmaceutical Derivatives by Atomic Absorption and Emission Spectrometry”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, c. 34, sayı 3, ss. 569–576, 2004.
- [98] M. R. Gomez, S. Cerutti, L. L. Sombra, M. F. Silva, ve L. D. Martínez, “Determination of Heavy Metals for the Quality Control in Argentinian Herbal Medicines by ETAAS and ICP-OES”, *Food Chem. Toxicol.*, c. 45, sayı 6, ss. 1060–1064, 2007.
- [99] K. Helmja vd., “Variation in the Composition of the Essential Oils, Phenolic Compounds and Mineral Elements of *Hypericum perforatum* L. Growing in Estonia”, *Nat. Prod. Res.*, c. 25, sayı 5, ss. 496–510, 2011.
- [100] S. Ražić, A. Onjia, S. Dogo, L. Slavković, ve A. Popović, “Determination of Metal Content in Some Herbal Drugs-Empirical and Chemometric Approach”, *Talanta*, c. 67, sayı 1, ss. 233–239, 2005.
- [101] Ö. F. Tavli, Ö. Hazman, A. Büyükben, F. N. Yilmaz, B. Özbek Çelik, ve E. Eroğlu Özkan, “İstanbul Aktarlarında Satılan *Hypericum perforatum* Örneklerinin Farmakognozik Açıdan İncelenmesi”, *Ankara Univ. Eczac. Fak. Derg.*, c. 44, sayı 2, ss. 265–280, 2020.
- [102] I. E. Orhan vd., “Inhibitory Effect of St. John’s Wort Oil Macerates on TNF α -Induced NF- κ B Activation and Their Fatty Acid Composition”, *J. Ethnopharmacol.*, c. 155, sayı 2, ss. 1086–1092, 2014.
- [103] S. E. Çelik, “Farklı Tür, Karışım ve Çözücü Ortamlarına Uygulanabilen Modifiye CUPRAC Antioksidan Kapasite Ölçümleri”, İstanbul Üniversitesi, 2011.
- [104] H. Karabulut ve M. Ş. Gülay, “Antioksidanlar”, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Vet.*

Fakültesi Derg., c. 1, sayı 1, ss. 65–76, 2016.

- [105] J. Bernatoniene ve D. M. Kopustinskiene, “The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress”, *Molecules*, c. 23, sayı 4, ss. 1–11, 2018.
- [106] U. Tinggi, “Selenium: Its Role As Antioxidant in Human Health”, *Environ. Health Prev. Med.*, c. 13, sayı 2, ss. 102–108, 2008.
- [107] A. S. Prasad, “Zinc: An Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Role of Zinc in Degenerative Disorders of Aging”, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, c. 28, sayı 4, ss. 364–371, 2014.
- [108] L. Li ve X. Yang, “The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions”, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, c. 2018, s. 7580707, 2018.
- [109] L. M. Gaetke ve C. K. Chow, “Copper Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidant Nutrients”, *Toxicology*, c. 189, sayı 1–2, ss. 147–163, 2003.
- [110] A. Ardağ, “Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması”, Adnan Menderes Üniversitesi, 2008.
- [111] S. Albayrak, O. Sağdıç, ve A. Aksoy, “Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.*, c. 26, sayı 4, ss. 401–409, 2010.
- [112] M. Özyürek, “Bazı İçeceklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayininde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi”, İstanbul Üniversitesi, 2005.
- [113] N. Radulović, V. Stankov-Jovanović, G. Stojanović, A. Šmelcerović, M. Spiteller, ve Y. Asakawa, “Screening of In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Nine Hypericum Species from the Balkan”, *Food Chem.*, c. 103, sayı 1, ss. 15–21, 2007.
- [114] N. Eray, A. Dalar, ve M. Turker, “The Effects of Abiotic Stressors and Signal Molecules on Phenolic Composition and Antioxidant Activities of In Vitro Regenerated Hypericum perforatum (St. John’s Wort)”, *South African J. Bot.*, c. 133, ss. 253–263, 2020.
- [115] M. Y. Mir, A. N. Kamili, Q. P. Hassan, S. . Rafi, 000avid A. Parray, J, ve S. Jan, “In Vitro Regeneration and Free Radical Scavenging Assay of Hypericum perforatum L.”,

- Natl. Acad. Sci. Lett.*, c. 42, sayı 2, ss. 161–167, 2019.
- [116] Z. G. Pan, C. Z. Liu, S. J. Murch, ve P. K. Saxena, “Optimized Chemodiversity in Protoplast-Derived Lines of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.)”, *Vitr. Cell. Dev. Biol.*, c. 41, sayı 3, ss. 226–231, 2005.
- [117] D. Ciccarelli, A. C. Andreucci, ve A. M. Pagni, “Translucent Glands and Secretory Canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, Anatomical and Histochemical Studies During the Course of Ontogenesis”, *Ann. Bot.*, c. 88, sayı 4, ss. 637–644, 2001.
- [118] J. Radušienė, B. Karpavičienė, ve Ž. Stanius, “Effect of External and Internal Factors on Secondary Metabolites Accumulation in St. John’s Worth”, *Bot. Lith.*, c. 18, sayı 2, ss. 101–108, 2013.
- [119] E. Bagdonaite, P. Mártonfi, M. Repčák, ve J. Labokas, “Variation in Concentrations of Major Bioactive Compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania”, *Ind. Crops Prod.*, c. 35, sayı 1, ss. 302–308, 2012.
- [120] M. C. Bergonzi, A. R. Bilia, S. Gallori, D. Guerrini, ve F. F. Vincieri, “Variability in the Content of the Constituents of *Hypericum perforatum* L. and Some Commercial Extracts”, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, c. 27, sayı 6, ss. 491–497, 2001.
- [121] V. F. Gromovaya, G. S. Shapoval, I. E. Mironyuk, ve N. V. Nestyuk, “Antioxidant Properties of Medicinal Plants”, *Pharm. Chem. J.*, c. 42, sayı 1, ss. 25–28, 2008.
- [122] Ž. Maleš, A. H. Brantner, K. Sovič, K. H. Pilepić, ve M. Plazibat, “Comparative Phytochemical and Antimicrobial Investigations of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* and *H. perforatum* subsp. *angustifolium* (DC.) Gaudin”, *Acta Pharm.*, c. 56, sayı 3, ss. 359–367, 2006.
- [123] G. Sagratini, M. Ricciutelli, S. Vittori, N. Öztürk, Y. Öztürk, ve F. Maggi, “Phytochemical and Antioxidant Analysis of Eight *Hypericum* taxa from Central Italy”, *Fitoterapia*, c. 79, sayı 3, ss. 210–213, 2008.
- [124] E. Maltas Cagil, A. Uysal, E. Yildiztugay, M. Aladağ, S. Yildiz, ve M. Kucukoduk, “Investigation of Antioxidant and Antibacterial Activities of Some *Hypericum* Species”,

Fresenius Environ. Bull., c. 22, sayı 3a, ss. 862–869, 2013.

- [125] N. Kladar vd., “St. John’s Wort (*Hypericum* Spp.) - Relation Between the Biological Source and Medical Properties”, içinde *Hypericum: Botanical Sources, Medical Properties and Health Effects*, H. R. Davis, Ed. Nova Science Publishers, 2015, ss. 53–80.
- [126] H. Kelebek, O. Sevindik, ve S. Selli, “LC-DAD-ESI-MS/MS-Based Phenolic Profiling of St John’s Wort Teas and Their Antioxidant Activity: Eliciting Infusion Induced Changes”, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, c. 42, sayı 1–2, ss. 9–15, 2019.
- [127] A. Sentkowska, M. Biesaga, ve K. Pyrzynska, “Effects of Brewing Process on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Herbs”, *Food Sci. Biotechnol.*, c. 25, sayı 4, ss. 965–970, 2016.
- [128] I. Arsić, “Preparation and Characterization of St. John’s Wort Herb Extracts Using Olive, Sunflower and Palm Oils”, *Acta Fac. Medicae Naissensis*, c. 33, sayı 2, ss. 119–126, 2016.
- [129] G. G. Franchi, C. Nencini, E. Collavoli, ve P. Massarelli, “Composition and Antioxidant Activity In Vitro of Different St. John’s Wort (*Hypericum Perforatum* L.) Extracts”, *J. Med. Plants Res.*, c. 5, sayı 17, ss. 4349–4353, 2011.
- [130] A. C. Kaliora, D. A. A. Kogiannou, P. Kefalas, I. S. Papassideri, ve N. Kalogeropoulos, “Phenolic Profiles and Antioxidant and Anticarcinogenic Activities of Greek Herbal Infusions; Balancing Delight and Chemoprevention?”, *Food Chem.*, c. 142, ss. 233–241, 2014.
- [131] B. A. Silva, J. O. Malva, ve A. C. P. Dias, “St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*) Extracts and Isolated Phenolic Compounds are Effective Antioxidants in Several In Vitro models of Oxidative Stress”, *Food Chem.*, c. 110, sayı 3, ss. 611–619, 2008.
- [132] C. L. Chen, C. H. Huang, ve J. M. Sung, “Antioxidants in Aerial Parts of *Hypericum sampsonii*, *Hypericum japonicum* and *Hypericum perforatum*”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, c. 44, sayı 11, ss. 2249–2255, 2009.
- [133] P. Labun ve I. Salamon, “Methanol Extracts of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*

- L.), Horsetail (*Equisetum arvense* L.) and Their Comparison of Antioxidant Efficacy”, *Adv. Environ. Biol.*, c. 5, sayı 2, ss. 426–426, 2011.
- [134] D. Z. Orčić, N. M. Mimica-Dukić, M. M. Francišković, S. S. Petrović, ve E. T. Jovin, “Antioxidant Activity Relationship of Phenolic Compounds in *Hypericum perforatum* L.”, *Chem. Cent. J.*, c. 5, sayı 1, ss. 1–8, 2011.
- [135] M. Škerget, P. Kotnik, M. Hadolin, A. R. Hraš, M. Simonič, ve Ž. Knez, “Phenols, Proanthocyanidins, Flavones and Flavonols in Some Plant Materials and Their Antioxidant Activities”, *Food Chem.*, c. 89, sayı 2, ss. 191–198, 2005.
- [136] R. Chimshirova, M. Karsheva, S. Diankov, ve I. Hinkov, “Extraction of Valuable Compounds from Bulgarian St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.). Antioxidant Capacity and Total Polyphenolic Content”, *J. Chem. Technol. Metall.*, c. 54, sayı 5, ss. 952–961, 2019.
- [137] A. A. Zlobin, E. A. Martinson, I. A. Ovechkina, E. A. Durnev, R. G. Ovodova, ve S. G. Litvinets, “Composition and Properties of Pectin Polysaccharides of St. John’s Wort *Hypericum perforatum* L.”, *Russ. J. Bioorganic Chem.*, c. 38, sayı 7, ss. 697–701, 2012.
- [138] W. Li vd., “Isolation of Xanthones from Adventitious Roots of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) and Their Antioxidant and Cytotoxic Activities”, *Food Sci. Biotechnol.*, c. 22, sayı 4, ss. 945–949, 2013.
- [139] Z. Saddiqe, I. Naeem, ve A. Maimoona, “A Review of the Antibacterial Activity of *Hypericum perforatum* L.”, *J. Ethnopharmacol.*, c. 131, sayı 3, ss. 511–521, 2010.
- [140] O. Nazlı vd., “Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Polyurethane/*Hypericum perforatum* Extract (PHPE) Composite”, *Bioorg. Chem.*, c. 82, ss. 224–228, 2019.
- [141] S. Güneş ve F. Tihminlioğlu, “*Hypericum perforatum* Incorporated Chitosan Films As Potential Bioactive Wound Dressing Material”, *Int. J. Biol. Macromol.*, c. 102, ss. 933–943, 2017.
- [142] J. T. Lyles vd., “The Chemical and Antibacterial Evaluation of St. John’s Wort Oil Macerates Used in Kosovar Traditional Medicine”, *Front. Microbiol.*, c. 8, sayı SEP, ss. 1–19, 2017.

- [143] N. Yıldırım ve İ. Küçük, “Preparing and Characterization of St.John’s Wort (*Hypericum perforatum*) Incorporated Wound Dressing Films Based on Chitosan and Gelatin”, *J. Fac. Eng. Archit. Gazi Univ.*, c. 35, sayı 1, ss. 127–135, 2020.
- [144] C. Çirak, J. Radušiene, ve N. Čamas, “Pseudohypericin and Hyperforin in Two Turkish *Hypericum* Species: Variation Among Plant Parts and Phenological Stages”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 36, sayı 5–6, ss. 377–382, 2008.
- [145] S. Ekin, G. Oto, Y. Yardim, A. Levent, F. Ozgokce, ve T. Kusman, “Protective Effect of *Hypericum perforatum* L. on Serum and Hair Trace Elements in Rats 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Oxidative Stress”, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, c. 33, sayı 3, ss. 440–445, 2012.
- [146] M. Jarzębski vd., “Characterization of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) and the Impact of Filtration Process on Bioactive Extracts Incorporated into Carbohydrate-based Hydrogels”, *Food Hydrocoll.*, c. 104, sayı September 2019, 2020.
- [147] F. Karaca, “Defne Yapraklarından Süperkritik Ekstraksiyon Yöntemi ile Esansiyel Yağ Eldesi”, Yıldız Teknik Üniversitesi, 1992.
- [148] Ü. Karık ve M. Öztürk, “Uçucu Yağ Sektörünün Ulusal Ekonomimizdeki Yeri, Sorunları ve Çözüm Önerileri”, *alatarım*, c. 9, sayı 2, ss. 30–37, 2010.
- [149] A. Kılıç, “Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri”, *Bartın Orman Fakültesi Derg.*, c. 10, sayı 13, ss. 37–45, 2008.
- [150] D. Yeşilbağ, “Fitobiyotikler”, *Uludağ Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, c. 26, sayı 1–2, ss. 33–39, 2007.
- [151] N. Haşimi, V. Tolan, S. Kızıl, ve E. Kılınç, “Anason (*Pimpinella anisum* L.) ve Kimyon (*Cuminum cyminum* L.) Tohumlarının Uçucu Yağ Kompozisyonu ile Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi”, *Tarım Bilim. Derg.*, c. 20, ss. 19–26, 2014.
- [152] N. Gañán ve E. A. Brignole, “Fractionation of Essential Oils with Biocidal Activity Using Supercritical CO₂ - Experiments and Modeling”, *J. Supercrit. Fluids*, c. 58, sayı 1, ss. 58–67, 2011.

- [153] E. C. Şaylıman, “Süperkritik Koşullarda Bazı Esansiyel Yağ Bileşenlerinin Çözünürlük ve Faz Davranışlarının İncelenmesi”, Yıldız Teknik Üniversitesi, 1998.
- [154] H. Basmacıoğlu Malayoğlu, B. Aktaş, ve Ö. Yeşil Çeliktaş, “Bazı Bitki Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağların Toplam Fenol İçerikleri ve Antioksidan Aktiviteleri”, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.*, c. 48, sayı 3, ss. 211–215, 2011.
- [155] F. Gironi ve M. Maschietti, “Phase Equilibrium of the System Supercritical Carbon Dioxide-Lemon Essential Oil: New Experimental Data and Thermodynamic Modelling”, *J. Supercrit. Fluids*, c. 70, ss. 8–16, 2012.
- [156] L. Danielski, S. R. S. Ferreira, H. Hense, J. Martínez, ve G. Brunner, “Deterpenation of Citrus Peel Oils with Supercritical Carbon Dioxide—A Review”, *Tree For. Sci. Biotechnol.*, c. 2, sayı Special Issue 1, ss. 10–22, 2008.
- [157] A. Umay, “Lavandula stoechas, Melissa officinalis ve Tribulus terrestris Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması”, Çukurova Üniversitesi, 2007.
- [158] Anonymous, “Terpene”, *The Free Dictionary*, 2022. [Çevrimiçi]. Available at: <https://encyclopedia2.thefreedictionary.com/Sesquiterpenoids>.
- [159] S. Şahin, S. G. Şümnü, E. Yener, S. Karakaya, S. Nehir El, ve N. Karagözlü, “Yeni Teknolojilerle Baharatlardan Esansiyel Yağ Ekstraksiyonu ve Bu Yağların Fiziksel, Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri”, Ankara, 2008.
- [160] S. Kazlauskas ve E. Bagdonait, “Quantitative Analysis of Active Substances in St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) by the High Performance Liquid Chromatography Method”, *Med.*, c. 40, sayı 10, ss. 975–981, 2004.
- [161] E. Yüce, “Analysis of the Essential Oils of Two *Hypericum* Species (*H. lanuginosum* var. *Lanuginosum* Lam. and *H. perforatum* L.) from Turkey”, *Hacettepe J. Biol. Chem.*, c. 44, sayı 1, ss. 29–29, 2016.
- [162] I. Schwob, J. M. Bessiere, V. Masotti, ve J. Viano, “Changes in Essential Oil Composition in Saint John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) Aerial Parts During Its Phenological Cycle”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 32, sayı 8, ss. 735–745, 2004.

- [163] A. Smelcerovic, M. Spiteller, A. P. Ligon, Z. Smelcerovic, ve N. Raabe, “Essential Oil Composition of *Hypericum* L. Species From Southeastern Serbia and Their Chemotaxonomy”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 35, sayı 2, ss. 99–113, 2007.
- [164] J. Radusiene, A. Judzentiene, ve G. Bernotiene, “Essential Oil Composition and Variability of *Hypericum perforatum* L. Growing in Lithuania”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 33, sayı 2, ss. 113–124, 2005.
- [165] I. Schwob, J.-M. Bessière, ve J. Viano, “Composition of the Essential Oils of *Hypericum perforatum* L. from Southeastern France”, *C. R. Biol.*, c. 325, sayı 7, ss. 781–785, Tem. 2002.
- [166] P. S. Chatzopoulou, T. V. Koutsos, ve S. T. Katsiotis, “Chemical Composition of the Essential Oils from Cultivated and Wild Grown St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*)”, *J. Essent. Oil Res.*, c. 18, sayı 6, ss. 643–646, Kas. 2006.
- [167] M. R. Morshedloo, A. Ebadi, F. Maggi, R. Fattahi, D. Yazdani, ve M. Jafari, “Chemical Characterization of the Essential Oil Compositions from Iranian Populations of *Hypericum perforatum* L.”, *Ind. Crops Prod.*, c. 76, ss. 565–573, Ara. 2015.
- [168] Y. Hışıl, F. Şahin, ve S. B. Omay, “Kantaronun (*Hypericum perforatum* L.) Bileşimi ve Tıbbi Önemi”, *Int. J. Hematol. Oncol.*, c. 15, sayı 4, ss. 212–218, 2005.
- [169] S. L. Crockett, “Essential Oil and Volatile Components of the Genus *Hypericum* (*Hypericaceae*)”, *Nat. Prod. Commun.*, c. 5, sayı 9, ss. 1493–1506, 2010.
- [170] T. Hatami, S. B. Glisic, ve A. M. Orlovic, “Modelling and Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) Using Genetic Algorithm”, *J. Supercrit. Fluids*, c. 62, ss. 102–108, 2012.
- [171] K. Taraj, I. Malollari, ve F. Ylli, “Eco-extraction of Essential Oil from Albanian *Hypericum perforatum* L . and Characterisation by Spectroscopy Techniques”, *J. Environ. Prot. Ecol.*, c. 1, ss. 188–195, 2019.
- [172] A. Smelcerovic, Z. Lepojevic, ve S. Djordjevic, “Sub-and Supercritical CO₂-Extraction of *Hypericum perforatum* L”, *Chem. Eng. Technol.*, c. 27, sayı 12, ss. 1327–1329, 2004.

- [173] A. Smelcerovic, Z. Lepojevic, ve S. Djordjevic, “Sub- and supercritical CO₂-extraction of *Hypericum perforatum* L.”, *Chem. Eng. Technol.*, c. 27, sayı 12, ss. 1327–1329, 2004.
- [174] A. Çakir, M. E. Duru, M. Harmandar, R. Ciriminna, S. Passannanti, ve F. Piozzi, “Comparison of the volatile oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey”, *Flavour Fragr. J.*, c. 12, sayı 4, ss. 285–287, 1997.
- [175] M. Pavlović, O. Tzakou, P. V. Petrakis, ve M. Couladis, “The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece”, *Flavour Fragr. J.*, c. 21, sayı 1, ss. 84–87, 2006.
- [176] B. Gudžić, S. Dordević, R. Palić, ve G. Stojanović, “Essential Oils of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum perforatum* L.”, *Flavour Fragr. J.*, c. 16, sayı 3, ss. 201–203, 2001.
- [177] K. H. C. Başer, T. Ozek, H. R. Nuriddinov, ve A. B. Demirci, “Essential Oils of Two *Hypericum* Species from Uzbekistan”, *Chem. Nat. Compd.*, c. 38, sayı 1, ss. 54–57, 2002.
- [178] M. Azizi, “Change in Content and Chemical Composition of *Hypericum perforatum* L. Oil at Three Harvest Time”, *J. Herbs, Spices Med. Plants*, c. 13, sayı 2, ss. 79–85, 2008.
- [179] P. R. Venskutonis ve E. Bagdonaite, “Comparative study on essential oil composition of different accessions of St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L.)”, *J. Essent. Oil Bear. Plants*, c. 14, sayı 4, ss. 442–452, 2011.
- [180] D. Mockute, G. Bernotiene, ve A. Judzentiene, “The essential oils with dominant Germacrene D of *Hypericum perforatum* L. growing wild in Lithuania”, *J. Essent. Oil Res.*, c. 20, sayı 2, ss. 128–131, 2008.
- [181] D. Mockute, G. Bernotiene, ve A. Judzentiene, “Volatile compounds of the aerial parts of wild St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L.) plants”, *Chemija*, c. 14, sayı 2, ss. 108–111, 2003.
- [182] R. Bruni vd., “Herbal Drug Quality and Phytochemical Composition of *Hypericum perforatum* L. Affected by Ash Yellows Phytoplasma Infection”, *J. Agric. Food Chem.*, c. 53, sayı 4, ss. 964–968, 2005.

- [183] L. Moleriu vd., “Essential oil of *Hypericum perforatum*: The chemical composition and antimicrobial activity”, *Rev. Chim.*, c. 68, sayı 4, ss. 687–692, 2017.
- [184] S. Alan, B. Demirci, G. Iscan, Y. B. Kose, ve K. H. C. Baser, “Composition and Anticandidal Activity of the Essential Oil of *Hypericum perforatum* L.”, *Asian J. Chem.*, c. 22, sayı 2, ss. 1315–1320, 2010.
- [185] L. F. Huang, Z. H. Wang, ve S. L. Chen, “Hypericin: Chemical Synthesis and Biosynthesis”, *Chin. J. Nat. Med.*, c. 12, sayı 2, ss. 81–88, 2014.
- [186] G. M. Kitanov, “Hypericin and Pseudohypericin Contents in Some *Hypericum* Species”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 29, ss. 171–178, 2001.
- [187] A. K. Ayan ve C. Çirak, “Hypericin and Pseudohypericin Contents in Some *Hypericum* Species Growing in Turkey”, *Pharm. Biol.*, c. 46, sayı 4, ss. 288–291, 2008.
- [188] I. A. Southwell ve M. H. Campbell, “Hypericin Content Variation in *Hypericum perforatum* in Australia”, *Phytochemistry*, c. 30, sayı 2, ss. 475–478, 1991.
- [189] I. A. Southwell ve C. A. Bourke, “Seasonal Variation in Hypericin Content of *Hypericum perforatum* L. (St. John’s Wort)”, *Phytochemistry*, c. 56, ss. 437–441, 2001.
- [190] I. A. Southwell, “25 Years of Natural Product R&D with New South Wales Agriculture”, *Molecules*, c. 10, ss. 1232–1241, 2005.
- [191] C. Çirak, J. Radušiene, B. (Sağlam) Karabük, ve V. Janulis, “Variation of Bioactive Substances and Morphological Traits in *Hypericum perforatum* Populations from Northern Turkey”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 35, sayı 7, ss. 403–409, 2007.
- [192] V. Verma vd., “Phenolic Constituents and Genetic Profile of *Hypericum perforatum* L. from India”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 36, sayı 3, ss. 201–206, 2008.
- [193] H. Römpf, C. Seger, C. S. Kaiser, E. Haslinger, ve P. C. Schmidt, “Enrichment of Hyperforin from St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*) by Pilot-Scale Supercritical Carbon Dioxide Extraction”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, c. 21, sayı 4, ss. 443–451, 2004.
- [194] A. G. Jensen ve S. H. Hansen, “Separation of Hypericins and Hyperforins in Extracts of *Hypericum perforatum* L. Using Non-aqueous Capillary Electrophoresis with Reversed

- Electro-osmotic Flow”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, c. 27, sayı 1–2, ss. 167–176, 2002.
- [195] S. Y. Kazemi, S. M. Abedirad, S. H. Zali, ve M. Amiri, “Hypericin from St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*) As a Novel Natural Fluorophore for Chemiluminescence Reaction of bis(2,4,6-Trichlorophenyl) Oxalate–H₂O₂–Imidazole and Quenching Effect of Some Natural Lipophilic Hydrogen Peroxide Scavengers”, *J. Lumin.*, c. 132, sayı 5, ss. 1226–1231, 2012.
- [196] D. Cossuta, T. Vatai, M. Báthori, J. Hohmann, T. Keve, ve B. Simándi, “Extraction of Hyperforin and Hypericin from St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) with Different Solvents”, *J. Food Process Eng.*, c. 35, sayı 2, ss. 222–235, 2012.
- [197] O. J. Catchpole, N. B. Perry, B. M. T. Da Silva, J. B. Grey, ve B. M. Smallfield, “Supercritical Extraction of Herbs I: Saw Palmetto, St. John’s Wort, Kava Root, and Echinacea”, *J. Supercrit. Fluids*, c. 22, sayı 2, ss. 129–138, 2002.
- [198] I. Arsic vd., “*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae Sunflower, Olive and Palm Oil Extracts Attenuate Cold Restraint Stress-Induced Gastric Lesions”, *Molecules*, c. 15, sayı 10, ss. 6688–6698, 2010.
- [199] F. F. Liu, C. Y. W. Ang, ve D. Springer, “Optimization of Extraction Conditions for Active Components in *Hypericum perforatum* Using Response Surface Methodology”, *J. Agric. Food Chem.*, c. 48, sayı 8, ss. 3364–3371, 2000.
- [200] D. Gîtea, M. Şipoş, T. Mircea, ve B. Paşca, “The Analysis of Alcoholic Extracts of *Hypericum* Species by UV/Vis Spectrophotometry”, *Analele Univ. din Oradea-Fascicula Biol.*, c. 17, ss. 111–115, 2010.
- [201] B. A. Silva, F. Ferreres, J. O. Malva, ve A. C. P. Dias, “Phytochemical and Antioxidant Characterization of *Hypericum perforatum* Alcoholic Extracts”, *Food Chem.*, c. 90, sayı 1, ss. 157–167, 2005.
- [202] D. Cossuta vd., “12th European Meeting on Supercritical Fluids”, içinde *Supercritical fluid extraction of St. John’s wort (Hypericum perforatum L.) and marigold (Calendula officinalis L.)*, 2010.
- [203] S. Glisic, A. Smelcerovic, S. Zuehlke, M. Spiteller, ve D. Skala, “Extraction of

- Hyperforin and Adhyperforin from St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) by Supercritical Carbon Dioxide", *J. Supercrit. Fluids*, c. 45, sayı 3, ss. 332–337, 2008.
- [204] U. Wölflle, G. Seelinger, ve C. M. Schempp, "Topical Application of St John's Wort (*Hypericum perforatum*)", *Planta Med.*, c. 80, sayı 2–3, ss. 109–120, 2014.
- [205] Y. Cui ve C. Y. W. Ang, "Supercritical Fluid Extraction and High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Phloroglucinols in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)", *J. Agric. Food Chem.*, c. 50, sayı 10, ss. 2755–2759, 2002.
- [206] C. Seger, H. Römpf, S. Sturm, E. Haslinger, P. C. Schmidt, ve F. Hadacek, "Characterization of Supercritical Fluid Extracts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) by HPLC-MS and GC-MS", *Eur. J. Pharm. Sci.*, c. 21, sayı 4, ss. 453–463, 2004.
- [207] M. Mannila, H. Kim, C. Isaacson, ve C. M. Wai, "Optimization of Supercritical Fluid Extraction for the Separation of Hyperforin and Adhyperforin in St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)", *Green Chem.*, c. 4, ss. 331–336, 2002.
- [208] M. Abdelhadi, A. Meullemiestre, A. Gelicus, A. Hassani, ve S. A. Rezzoug, "Intensification of *Hypericum perforatum* L. Oil Isolation by Solvent-free Microwave Extraction", *Chem. Eng. Res. Des.*, c. 93, sayı April, ss. 621–631, 2015.
- [209] L. Orio, G. Cravotto, A. Binello, G. Pignata, S. Nicola, ve F. Chemat, "Hydrodistillation and In Situ Microwave-generated Hydrodistillation of Fresh and Dried Mint Leaves: A Comparison Study", *J. Sci. Food Agric.*, c. 92, sayı 15, ss. 3085–3090, 2012.
- [210] V. V. Punegov vd., "Microwave-assisted Extraction of Hypericin and Pseudohypericin from *Hypericum perforatum*", *Russ. J. Bioorganic Chem.*, c. 41, sayı 7, ss. 757–761, 2015.
- [211] A. A. Šmelcerović, S. M. Dordević, Ž. D. Lepojević, ve D. T. Veličković, "The Analysis of the Kinetics of Extraction of Resinoids and Hypericines from the Amber, *Hypericum perforatum* L.", *J. Serbian Chem. Soc.*, c. 67, sayı 6, ss. 457–463, 2002.
- [212] F. F. Liu vd., "Evaluation of Major Active Components in St. John's Wort Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array

- Detection and Electrospray Mass Spectrometric Confirmation”, *J. Chromatogr. A*, c. 888, sayı 1–2, ss. 85–92, 2000.
- [213] A. Smelcerovic, M. Spiteller, ve S. Zuehlke, “Comparison of Methods for the Exhaustive Extraction of Hypericins, Flavonoids, and Hyperforin from *Hypericum perforatum* L.”, *J. Agric. Food Chem.*, c. 54, ss. 2750–2753, 2006.
- [214] A. Karioti, F. F. Vincieri, ve A. R. Bilia, “Rapid and Efficient Purification of Naphthodianthrones from St. John’s Wort Extract by Using Liquid-Liquid Extraction and SEC”, *J. Sep. Sci.*, c. 32, sayı 9, ss. 1374–1382, 2009.
- [215] Z. Ramezani ve M. Zamani, “A Simple Method for Extraction and Purification of Hypericins from St John’s Wort”, *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, c. 12, sayı 1, s. e13864, 2017.
- [216] S. Minaei, H. A. Chenarbon, A. Motevali, ve A. Arabhosseini, “Energy Consumption, Thermal Utilization Efficiency and Hypericin Content in Drying Leaves of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum*)”, *J. Energy South. Africa*, c. 25, sayı 3, ss. 27–35, 2014.
- [217] A. C. B. Diniz, L. V. Astarita, ve E. R. Santarém, “Secondary Metabolite Content in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) Plants Submitted to Drying and Freezing”, *Acta Bot. Brasilica*, c. 21, sayı 2, ss. 443–450, 2007.
- [218] N. Kalogeropoulos, K. Yannakopoulou, A. Gioxari, A. Chiou, ve D. P. Makris, “Polyphenol Characterization and Encapsulation in β -Cyclodextrin of A Flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St. John’s Wort) Extract”, *LWT - Food Sci. Technol.*, c. 43, sayı 6, ss. 882–889, 2010.
- [219] Y. Soysal ve S. Öztekin, “Technical and Economic Performance of A Tray Dryer for Medicinal and Aromatic Plants”, *J. Agric. Eng. Res.*, c. 79, sayı 1, ss. 73–79, 2001.
- [220] H. A. Chenarbon, S. Minaei, A. R. Bassiri, M. Almassi, ve A. Arabhosseini, “Modeling of Drying St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) Leaves”, *J. Med. Plants Res.*, c. 5, sayı 1, ss. 126–132, 2011.
- [221] I. Alibas ve O. Kacar, “Microwave Drying Kinetics, Hypericin Content, Effective Moisture Diffusivity and Activation Energy of *Hypericum perforatum* L.”, *J. Essent.*

Oil-Bearing Plants, c. 19, sayı 2, ss. 454–465, 2016.

- [222] H. A. Chenarbon, S. Minaei, A. R. Bassiri, M. Almassi, A. Arabhosseini, ve A. Motevali, “Effect of Drying on the Color of St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L.) Leaves”, *Int. J. Food Eng.*, c. 8, sayı 4, 2012.
- [223] S. A. R. Naqvi, N. Akbara, S. M. A. Shah, S. Ali, ve A. Abbas, “Green Approaches for the Extraction of Bioactive from Natural Sources for Pharmaceutical Applications”, içinde *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Solvents for the Pharmaceutical Industry*, Elsevier Inc., 2020, ss. 269–291.
- [224] M. S. Abubakar, “Effect of Microwave Radiation on Organic Solvents”, Warsaw, 2020.
- [225] G. Ç. Dulger, Ü. Geçgel, ve E. Culpan, “The International Congress of Eurasian Natural Nutrition and Healthy Life”, içinde *Mikroalga Ekstraksiyon Yöntemiyle Uçucu Yağ Eldesi*, 2018, ss. 525–530.
- [226] N. Çolak ve Y. Tülek, “Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu”, *Gıda*, c. 28, sayı 3, ss. 313–320, 2003.
- [227] E. Büyüktuncel, “Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I”, *Hacettepe Üniversitesi Eczac. Fakültesi Derg.*, c. 32, sayı 2, ss. 209–242, 2012.
- [228] T. Dedebaş, T. Dursun Çapar, L. Ekici, ve H. Yalçın, “Yağlı Tohumlarda Ultrasonik-Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ve Avantajları”, *Avrupa Bilim ve Teknol. Derg.*, sayı 21, ss. 313–322, 2021.
- [229] S. Corr, “1,1,1,2-Tetrafluoroethane; From Refrigerant and Propellant To Solvent”, *J. Fluor. Chem.*, c. 118, sayı 1–2, ss. 55–67, 2002.
- [230] L. A. Berrueta, B. Galo, ve F. Vicente, “A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments”, *Chromatographia*, c. 40, sayı 7, ss. 474–483, 1995.
- [231] Z. Ayhan ve A. Döş, “Gıdalarda Katı Faz Mikroekstraksiyon Tekniği ile Flavor Analizi”, *Gıda*, c. 29, sayı 2, ss. 169–175, 2004.
- [232] E. Alver, A. Demirci, ve M. Özçimder, “Microextraction Methods”, *Mühendislik ve Fen Bilim. Dergisi, Sigma*, c. 30, ss. 75–90, 2012.

- [233] Y. Naït-Si ve J. D. Fourneron, “Hypericin and Pseudohypericin. Purity Criteria and Quantitative Determination in Extracts of Saint John’s Wort (*Hypericum perforatum*)”, *Monatshefte fur Chemie*, c. 135, sayı 10, ss. 1319–1326, 2004.
- [234] E. C. Tatsis, V. Exarchou, A. N. Troganis, ve I. P. Gerothanassis, “¹H NMR Determination of Hypericin and Pseudohypericin in Complex Natural Mixtures by the Use of Strongly Deshielded OH Groups”, *Anal. Chim. Acta*, c. 607, sayı 2, ss. 219–226, 2008.
- [235] A. Çakir, M. E. Duru, M. Harmandar, R. Ciriminna, S. Passannanti, ve F. Piozzi, “Comparison of the Volatile Oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey”, *Flavour Fragr. J.*, c. 12, sayı 4, ss. 285–287, 1997.
- [236] A. Necip ve M. Işık, “Bioactivities of *Hypericum Perforatum* L and *Equisetum Arvense* L Fractions Obtained with Different Solvents”, *Int. J. Life Sci. Biotechnol.*, c. 2, sayı 3, ss. 221–230, 2019.
- [237] D. Štěrbová, D. Matějček, J. Vlček, ve V. Kubán, “Combined Microwave-assisted Isolation and Solid-phase Purification Procedures Prior to the Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Plant Materials”, *Anal. Chim. Acta*, c. 513, sayı 2, ss. 435–444, 2004.
- [238] A. Güzel, M. Akyüz, ve M. A. Şanda, “Determination of Antioxidant Activity of the *Hypericum perforatum*”, *J. Integr. Anatol. Med.*, c. 1, sayı 1, ss. 9–18, 2019.
- [239] E. M. Gioti, Y. C. Fiamegos, D. C. Skalkos, ve C. D. Stalikas, “Antioxidant Activity and Bioactive Components of the Aerial Parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece”, *Food Chem.*, c. 117, sayı 3, ss. 398–404, 2009.
- [240] L. Becker vd., “Improvement of Antioxidant Activity and Polyphenol Content of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium* Powders Using Successive Grinding and Sieving”, *Ind. Crops Prod.*, c. 87, ss. 116–123, 2016.
- [241] P. Labun ve I. Salamon, “Methanol Extracts of St. John’s-wort (*Hypericum perforatum* L.), Horsetail (*Equisetum Arvense* L.) and Their Comparison of Antioxidant Efficacy”, *Adv. Environ. Biol.*, c. 5, sayı 2, ss. 426–428, 2011.

- [242] O. Kaçar ve N. Azkan, “Bursa’da Doğal Florada Bulunan Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Populasyonlarında Farklı Yüksekliklerin Hiperisin Oranı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi”, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.*, c. 19, sayı 1, ss. 77–89, 2005.
- [243] E. Bagdonaite, P. Mártonfi, M. Repčák, ve J. Labokas, “Variation in the Contents of Pseudohypericin and Hypericin in *Hypericum perforatum* from Lithuania”, *Biochem. Syst. Ecol.*, c. 38, sayı 4, ss. 634–640, 2010.
- [244] X. Wang, J. Mi, Y. Dong, ve J. Yang, “Optimization of Extraction Process of Hypericin from St. John’s Wort by Central Composite Design-Response Surface Methodology”, *J. Chem. Pharm. Res.*, c. 6, sayı 7, ss. 1667–1675, 2014.
- [245] V. K. Koul ve S. Koul, “Process Optimization for the Extraction of Hyperforin and Hypericin from St. John’s Wort”, *Nat. Prod. Radiance*, c. 6, sayı 4, ss. 293–296, 2007.
- [246] A. Smelcerovic, H. Laatsch, Z. Lepojevic, ve S. Djordjevic, “The Separation of Hypericine and Pseudohypericine from *Hypericum perforatum* L.”, *Pharmazie*, c. 57, sayı 3, ss. 178–180, 2002.
- [247] B. S. Joshi ve P. N. Kaul, “Alternative Medicine: Herbal Drugs and Their Critical Appraisal-Part 1”, içinde *Progress in Drug Research*, E. Jucker, Ed. Basel: Springer, 2001, ss. 1–76.
- [248] A. Dordevic vd., “Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oil and Crude Extracts of *Hypericum tetrapterum* Fries (Hypericaceae)”, *J. Med. Plants Res.*, c. 4, sayı 14, ss. 1441–1445, 2010.

EK-1

Python dilinde yazılan toplam hiperisin içeriği tahmin programı aşağıdaki gibidir:

```
from sklearn.linear_model import LinearRegression
from sklearn.model_selection import cross_val_score
from sklearn.ensemble import RandomForestRegressor
from sklearn.model_selection import GridSearchCV
from sklearn.metrics import mean_squared_error
from sklearn.model_selection import train_test_split
import numpy as np
import pandas as pd
import warnings

warnings.filterwarnings('ignore')
!wget -
q https://gist.githubusercontent.com/Bhasfe/536e1503f83d038
047b2501654aff7ee/raw/cb205d91b91c0ff1f81210ee8a178ea00a80c
caa/hiperisin.csv
%matplotlib inline
%config IPCompleter.greedy=True

data = pd.read_csv('hiperisin.csv', sep=';')
data['etanol_over_su'] = data['etanol_over_su'].str.replace
(',', '.').astype(float)
data['hiperisin'] = data['hiperisin'].str.replace(',', '.').
astype(float)

X = data[['zaman', 'sicaklik', 'etanol_over_su']].values
y = data[['hiperisin']].values

X_train, X_test, y_train, y_test = train_test_split(X, y, t
est_size=0.2, random_state=44, shuffle=True)

lr = LinearRegression()
lr.fit(X_train, y_train)
y_pred = lr.predict(X_test)

print("\nLinear Regression Test Errors:")
print("MSE:", mean_squared_error(y_test, y_pred))
print("RMSE:", np.sqrt(mean_squared_error(y_test, y_pred)))
print("R^2:", lr.score(X_test, y_test))
```

```

parameters = {'n_estimators':[100,200,300,500,700], 'criterion':['absolute_error']}
search = GridSearchCV(estimator=RandomForestRegressor(), param_grid=parameters, cv=5)
search.fit(X_train, y_train)
rf_best = search.best_estimator_
rf = RandomForestRegressor(search.best_params_['n_estimators'])
y_pred = rf_best.predict(X_test)

print("\nRandom Forest Test Errors:")
print("MSE:", mean_squared_error(y_test, y_pred))
print("RMSE:", np.sqrt(mean_squared_error(y_test, y_pred)))
print("R^2:", rf_best.score(X_test, y_test))

```

```
rf.fit(X, y)
```

Linear Regression Test Errors:

MSE: 0.006363667960818946

RMSE: 0.07977260156732352

R^2: -0.07926496040635844

Random Forest Test Errors:

MSE: 0.0004918270659030696

RMSE: 0.022177174434608878

R^2: 0.9165871440689779

RandomForestRegressor(n_estimators=200)

```
zaman = 60
```

```
sicaklik = 45
```

```
etanol_over_su = 0.6
```

```
precition = rf.predict(np.array([zaman, sicaklik, etanol_over_su]).reshape(1, -1))
```

```
print("Prediction:", precition[0])
```

EK-2

EK-1’de verilen program kullanılarak hesaplanan hiperisin içerikleriyle deneysel olarak elde edilen hiperisin içerikleri ve bu değerler arasındaki hata yüzdesi aşağıda verilmiştir.

Deney No	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Etanol/Su Oranı	Deneysel hiperisin miktarı (%g/g)	Hesaplanan hiperisin miktarı (%g/g)	% Hata
1	15	25	0	0,0027	0,0035	-29,385
2	30	25	0	0,0031	0,0031	-1,333
3	60	25	0	0,0039	0,0037	6,105
4	120	25	0	0,0037	0,0037	0,667
5	15	35	0	0,0055	0,0045	18,815
6	30	35	0	0,0031	0,0034	-9,333
7	60	35	0	0,0031	0,0034	-11,267
8	120	35	0	0,0035	0,0036	-2,059
9	15	45	0	0,0059	0,0066	-11,310
10	30	45	0	0,0078	0,0074	5,368
11	60	45	0	0,0084	0,0080	4,488
12	120	45	0	0,0090	0,0086	4,250
13	15	25	0,2	0,0205	0,0249	-21,610
14	30	25	0,2	0,0363	0,0321	11,661
15	60	25	0,2	0,0263	0,0262	0,359
16	120	25	0,2	0,0181	0,0255	-41,114
17	15	35	0,2	0,0246	0,0249	-1,250
18	30	35	0,2	0,0267	0,0288	-7,946
19	60	35	0,2	0,0213	0,0232	-8,812
20	120	35	0,2	0,0339	0,0307	9,529
21	15	45	0,2	0,0347	0,0387	-11,757
22	30	45	0,2	0,0548	0,0465	15,120
23	60	45	0,2	0,0310	0,0339	-9,563
24	120	45	0,2	0,0566	0,0480	15,277
25	15	55	0,2	0,0468	0,0410	12,298
26	30	55	0,2	0,0299	0,0363	-21,164
27	60	55	0,2	0,0201	0,0244	-21,194
28	120	55	0,2	0,0318	0,0335	-5,435
29	15	25	0,4	0,0921	0,0891	3,226
30	30	25	0,4	0,0956	0,0929	2,829
31	60	25	0,4	0,0948	0,0966	-1,981
32	120	25	0,4	0,1407	0,1263	10,269
33	15	35	0,4	0,0648	0,0702	-8,331
34	30	35	0,4	0,0791	0,0788	0,301

35	60	35	0,4	0,0846	0,0862	-1,842
36	120	35	0,4	0,0925	0,1026	-10,957
37	15	45	0,4	0,0993	0,1012	-1,940
38	30	45	0,4	0,1128	0,1077	4,505
39	60	45	0,4	0,1065	0,1078	-1,237
40	120	45	0,4	0,1395	0,1303	6,593
41	15	55	0,4	0,1442	0,1400	2,922
42	30	55	0,4	0,1508	0,1442	4,365
43	60	55	0,4	0,1288	0,1343	-4,285
44	120	55	0,4	0,1372	0,1396	-1,691
45	15	25	0,6	0,1442	0,1372	4,831
46	30	25	0,6	0,1584	0,1581	0,188
47	60	25	0,6	0,1938	0,1940	-0,062
48	120	25	0,6	0,2382	0,2278	4,352
49	15	35	0,6	0,1441	0,1459	-1,251
50	30	35	0,6	0,1723	0,1656	3,874
51	60	35	0,6	0,1979	0,1960	1,005
52	120	35	0,6	0,2045	0,2186	-6,904
53	15	45	0,6	0,1895	0,1901	-0,304
54	30	45	0,6	0,2421	0,2254	6,865
55	60	45	0,6	0,1943	0,2067	-6,385
56	120	45	0,6	0,2105	0,2313	-9,891
57	15	55	0,6	0,2279	0,2131	6,510
58	30	55	0,6	0,2107	0,2129	-1,054
59	60	55	0,6	0,2981	0,2824	5,265
60	120	55	0,6	0,2913	0,2930	-0,582
61	15	25	0,8	0,0779	0,0921	-18,112
62	30	25	0,8	0,1268	0,1249	1,511
63	60	25	0,8	0,1856	0,1864	-0,393
64	120	25	0,8	0,2142	0,2262	-5,609
65	15	35	0,8	0,1201	0,1168	2,719
66	30	35	0,8	0,1376	0,1384	-0,527
67	60	35	0,8	0,1809	0,1876	-3,666
68	120	35	0,8	0,2548	0,2445	4,023
69	15	45	0,8	0,1659	0,1724	-3,868
70	30	45	0,8	0,2236	0,2127	4,858
71	60	45	0,8	0,2107	0,2198	-4,320
72	120	45	0,8	0,3163	0,2910	8,010
73	15	55	0,8	0,1707	0,1843	-7,995
74	30	55	0,8	0,1967	0,2025	-2,918
75	60	55	0,8	0,3282	0,3064	6,630
76	120	55	0,8	0,3600	0,3458	3,944
77	15	25	1	0,0244	0,0257	-5,202

78	30	25	1	0,0279	0,0303	-8,434
79	60	25	1	0,0353	0,0371	-5,215
80	120	25	1	0,0472	0,0486	-2,952
81	15	35	1	0,0267	0,0280	-5,031
82	30	35	1	0,0373	0,0352	5,747
83	60	35	1	0,0414	0,0410	1,094
84	120	35	1	0,0498	0,0502	-0,798
85	15	45	1	0,0332	0,0391	-17,772
86	30	45	1	0,0480	0,0469	2,222
87	60	45	1	0,0656	0,0598	8,894
88	120	45	1	0,0917	0,0785	14,418

