

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Anemone narcissiflora* BİTKİSİNİN KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK  
AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ahmet AHISKALIOĞLU**

**ŞUBAT 2007  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Anemone narcissiflora* BİTKİSİNİN KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK  
AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ**

**Ahmet AHISKALIOĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
Yüksek Lisans (Kimya)  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11.01.2007**

**Tezin Savunma Tarihi : 13.02.2007**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI**

**Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK**

**Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Rezzan ALİYAZICIOĞLU**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Emin Zeki BAŞKENT**

**TRABZON 2007**

## ÖNSÖZ

“*Anemone narcissiflora* Bitkisinin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımızda yardımcı olan başta değerli hocalarımız Doç. Dr. Murat KÜÇÜK olmak üzere, Doç. Dr. Ümmühan OCAK, Yrd. Doç. Dr. Miraç OCAK ve diğer Biyokimya Anabilim Dalı ve Kimya Bölümü hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin ölçülmesinde emeği geçen değerli hocamız Yrd. Doç. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU’ a ve bitkinin adlandırılmasında yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Kamil COŞKUNCELEBİ’ ye teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca laboratuvar imkanlarından yararlandığımız Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI’ya teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan aileme ve nişanlım Nagehan Şahinoğlu’na sonsuz teşekkür ederim.

Ahmet AHISKALIOĞLU

Trabzon, 2007

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
ÖZET .....	V
SUMMARY .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ .....	X
1. Giriş .....	1
2. Genel Bilgiler .....	2
2.1. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması .....	2
2.2. Serbest Radikaller ve Genel Özellikleri .....	3
2.3. Antioksidanlar .....	4
2.4. Bitkiler Tarafından Üretilen Bazı Antioksidan Maddeler .....	5
2.4.1. E Vitamini .....	5
2.4.2. Karetenoidler .....	7
2.4.3. Askorbik Asit.....	7
2.4.4. Diğer Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkili Biyomoloküller.....	9
2.5. Antimikrobiyal Maddeler Hakkında Bilgi.....	12
2.5.1. Antibiyotiklere Duyarlılık Deneyleri .....	14
2.5.1.1. Dilüsyon Yöntemi.....	15
2.5.1.2. Difüzyon Yöntemi.....	15
2.6. Bitkilerde Bulunan Biyoaktif Bileşikler .....	15
2.7. Anzer Yaylasında Yetişen <i>Anemone narcissiflora</i> Bitkisi Hakkında Bilgi.....	17
2.8. GS-MS Hakkında Bilgi... ..	18
3. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	20
3.1. Kullanılan Cihazlar .....	20
3.2. Numunelerin Toplanması ve Deneysel Çalışmalara Hazırlama İşlemleri..	21

3.2.1.	Su Buharı Destilasyonu .....	21
3.2.2.	Soxhlet Ekstrasyonu .....	22
3.3.	GS-MS için Metanolik Ekstraktların Türevlendirilmesi .....	24
3.4.	Toplam Fenolik Madde Tayini .....	25
3.5.	DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini .....	25
3.5.1.	IC <sub>50</sub> Değerinin Bulunması .....	27
3.6.	Antimikrobiyal Aktivite Tayini .....	27
3.6.1.	Kloroform ve Metanol Ekstraktları İçin Antimikrobiyal Aktivite Tayini..	27
3.7.	Uçucu Yağ Ekstraktları İçin Antimikrobiyal Aktivite Tayini .....	28
4.	BULGULAR.....	29
4.1.	Ekstrakt Miktarı ve Konsantrasyonları ile İlgili Bulgular.....	29
4.2.	DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi ile İlgili Bulgular .....	29
4.3.	Toplam Fenolik Madde Miktarı ile İlgili Bulgular.....	35
4.4.	Antimikrobiyal Aktivite ile İlgili Bulgular.....	36
4.5.	Antioksidan Aktivite ile İlgili Bulgular.....	38
4.6.	<i>Anemone narcissiflora</i> Bitkisinin Uçucu Bileşenlerinin Kimyasal Bileşimi ile İlgili Bulgular .....	38
4.7.	<i>Anemone narcissiflora</i> Bitkisinin Metanolik Fraksiyonunun Kimyasal Bileşimi ile İlgili Bulgular .....	40
4.8.	<i>Anemone narcissiflora</i> Bitkisinin Kloroformlu Bileşenlerinin Kimyasal Bileşimi ile İlgili Bulgular .....	41
5.	TARTIŞMA .....	43
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
7.	KAYNAKLAR .....	47

ÖZGEÇMİŞ

## ÖZET

Yapılan çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesinin Anzer yaylası önemli bitki floralarından *Anemone narcissiflora* subsp. *narcissiflora* bitkisi bitkisinin kimyasal bileşimlerinin aydınlatılması ve antioksidan, antimikrobiyal özelliklerinin ortaya çıkartılmasıdır. Bitki 2004-Haziran Anzer yaylasından toplandı. Bitkinin kimyasal bileşimi üç farklı ekstrakt hazırlanarak Gaz kromatografisi-Kütle spektrometresinde (GC-MS) incelendi. Bitkinin yaprak, sap ve çiçek kısımlarının su buharı destilasyonu ile uçucu bileşenleri, metanolik ekstraksiyon ile nispeten polar bileşenleri ve kloroform ile ekstraksiyon ile nispeten apolar bileşenleri tayin edildi. Her üç ekstraktın biyolojik değeri DPPH radikal temizleme yönünden ve antibakteriyal yönden incelendi.

Bitkinin uçucu bileşenlerinin çeşitli terpenlerden oluştuğu ve yaprak kısmının % 85.5 oranına kimyasal bileşimi aydınlatıldı. Metanolik özütlerin daha çok fenolik bileşiklerde zengin ve kloroformlu özütlerin ise yağ asitlerince zengin olduğu tespit edildi. Ayrıca bitkinin her üç kısmının DPPH radikal temizleme yönünden etkili olduğu fakat yaprak kısmının metanolik fraksiyonununun hem fenolik madde içeriği bakımından zengin ve hem de DPPH radikal temizleme daha iyi antioksidan özelliğe sahip olduğu bulundu. Antibakteriyal yönden ise uçucu bileşenlerin sadece *Bacillus cereus* bakterisi üzerinde etkili olduğu, diğer metanolik ve kloroformlu ekstraktların ise çalışılan 9 bakteriden sadece *Bacillus cereus* üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği bulundu.

Sonuç olarak *Anemone narcissiflora* subsp. *Narcissiflora* bitkisinin kimyasal içerik yönünden ve *in vitro* çalışmalarda biyolojik etkinlik yönünden ve antikanserojen potansiyele sahip olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Anemone narcissiflora*, antioksidan, antibakteriyal, GC-MS, antikanser

## SUMMARY

### The Determination of Chemical Composition of *Anemone narcissiflora* subsp. *narcissiflora* Extracts and Their Biological Activities

The aim of the current study was to determine chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of the plants from Anzer Plateau, which famous with its world-renowned “Anzer Honey.” Thus, *Anemone narcissiflora* subsp. *narcissiflora* plant was collected from Anzer Plateau in June, 2004. The chemical composition of the plant was investigated by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) in its three different extracts. The essential oils obtained by steam-distillation, the polar components obtained by methanol extraction, and relatively non-polar components obtained by chloroform extraction were analyzed in leaves, stems, and flowers of the plant separately. The biological activities of all three types of samples were investigated through DPPH scavenging test.

The essential oils of the plant were found to be composed mainly of terpenes, as most plants, and the highest identification percentage was achieved for leaf essential oils as 85.5% total. Methanolic extracts were showed high phenolic contents and antioxidant activities. In addition, all three plant parts had high DPPH scavenging activity, while methanolic fractions were shown to contain higher amounts of phenolics as well as higher levels of DPPH scavenging, and thus antioxidant, activity. The essential oils showed antimicrobial activity only against the bacterium *Bacillus cereus*. All the chloroform and methanol extracts, interestingly, showed antibacterial activity against eight of the nine bacteria tested, with no activity against *B. cereus*.

The results of this study revealed the chemical composition of the essential oils and antimicrobial activity and antioxidant activity, and thus anticancer potential, of the chloroform and methanol extracts of the Anzer plant *Anemone narcissiflora* subsp. *narcissiflora*.

**Key words:** *Anemone narcissiflora*, antioxidant, antibacterial, GC-MS, anticancer

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması .....	5
Şekil 2. E Vitamini .....	6
Şekil 3. C Vitamini .....	8
Şekil 4. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substituenleri (b).....	11
Şekil 5. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin resmi .....	17
Şekil 6. Clevenger tipi su buharı düzeneği.....	21
Şekil 7. Soxhlet Düzeneği .....	22
Şekil 8. Döner buharlaştırıcı.....	23
Şekil 9. DPPH radikalinin formülü .....	25
Şekil 10. Bitkinin sap kısmının metanolik (A8SM) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi. ....	29
Şekil 11. Bitkinin yaprak kısmının metanolik (A8YM) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi .....	30
Şekil 12. Bitkinin çiçek kısmının metanolik (A8CM) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi.....	30
Şekil 13. Bitkinin sap kısmının kloroform (A8SK) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi.....	31
Şekil 14. Bitkinin yaprak kısmının kloroform (A8YK) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi.....	31
Şekil 15. Bitkinin çiçek kısmının kloroform (A8CK) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi .....	32
Şekil 16. Bitkinin çiçek kısmının uçucu (A8CU) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi .....	32
Şekil 17. Bitkinin sap kısmının uçucu (A8SU) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi.....	33
Şekil 18. Bitkinin yaprak kısmının uçucu (A8YU) ekstraktının DPPH radikal temizleme aktivitesi.....	33
Şekil 19. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin metanollü, kloroformlu ve uçucu ekstraktlarının DPPH radikali temizleme aktiviteleri.....	35
Şekil 20. Folin-Ciocalteu metoduna göre standart olarak kullanılan kateşinin farklı	



konsantrasyonlarda verdiği grafik.....	36
Şekil 21. A8YM, A8SM ve A8CM'nin 700 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenen % polifenol.....	36

## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri .....	6
Tablo 2. Denemelerde kullanılan malzemeler .....	8
Tablo 3. GC-MS spektrumunun alındığı deneysel çalışma şartları.....	11
Tablo 4. Toplam polifenol tayininde yapılan pipetleme işlemleri .....	25
Tablo 5. DPPH yöntemi için deney şartları .....	26
Tablo 6. Su buharı destilasyonu ve kloroform/metanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen madde miktarları .....	29
Tablo 7. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin metanolik ve kloroformlu ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri .....	37
Tablo 8. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin uçucu bileşenlerinin antimikrobiyal aktiviteleri .....	37
Tablo 9. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin metanolik, kloroformlu ekstraktlarının ve uçucu bileşenlerinin DPPH radikali temizleme aktiviteleri.....	38
Tablo 10. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin uçucu bileşenleri .....	39
Tablo 11. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin metanolik ekstraktlarının bileşenleri.....	41
Tablo 12. <i>Anemone narcissiflora</i> bitkisinin kloroformlu ekstraktlarının bileşenleri.....	42

## SEMBOLLER DİZİNİ

CHCl <sub>3</sub>	: Kloroform
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
IC <sub>50</sub>	: %50 inhibisyon konsantrasyonu
LOO <sup>•</sup>	: Lipit peroksi radikali
MH	: Mueller-Hilton broth
MIC	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum karbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NO <sup>•</sup>	: Azot monoksit radikali
O <sub>2</sub>	: Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	: Süperoksit radikali
ROO <sup>•</sup>	: Alkil perosit radikali
Troloks	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV	: Ultra viyole

## 1.GİRİŞ

Dünya üzerinde 750.000.000 ile 1.000.000 arasında bitki türü olduğu tahmin edilmekte ve bunların 500 bin kadarının tanımlanmış olup her yıl 2000 kadar yeni bitkinin tanımlanması yapılmaktadır. Kullanılan tıbbi bitkilerin yaklaşık 100 bin civarında olduğu tahmin edilmektedir. Son yıllarda tıbbi bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif moleküllerin çok ilgi uyandırmasının sebepleri kısaca şöyle izah edilebilir (Cotton, 1999);

- 1) Halk arasında uzun zamandır tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin yan etkilerinin görülmemesi,
- 2) Bazı ilaç ve ilkel maddelerin, bitkisel kaynaklardan sentetik yollara nazaran daha ucuza ve daha kolay elde edilebilmesi,
- 3) Sentetik ilaçlar genellikle tek etkiye sahipken, bitkisel ilaçların birkaç etkiye birden sahip olmaları,
- 4) Kimya sanayisi yeterince gelişmemiş kalkınma yolundaki ülkelerin memleketlerinde bitkilerden yararlanarak, kolay ve ucuz bir tedavi imkanı elde etmek istemeler.

Ülkemizde halkın çoğunluğunun kırsal kesimlerden gelmesi ve ülkemizin zengin bitki florasına sahip olması gibi nedenlerden dolayı bitkisel amaçlı tedavi yolları oldukça yaygın kullanılmaktadır ve hatta bu tür ilaçlar halk arasında “kocakarı” ilaçları diye bilinmektedir.

Yapılan bu çalışmanın amacı günümüzde popüler bir araştırma alanı haline gelen bitkisel kaynaklı ilaçlar alanına katkı sağlamak için *Anemone narcissiflora* bitkisinin kimyasal bileşimini aydınlatmak ve antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini ortaya çıkarmaktır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Bitkilerin Tedavi Amaçlı Kullanılması**

Geleneksel ve tıbbi amaçlı bitkilerin kullanımı olarak adlandırılan etnobotanik hakkındaki yazılı bildiler M. Ö 3000’li yıllara kadar eski Mısır, Hitit, Grek ve Roma dönemlerinde papirus ve diğer kaynaklardan tespit edilmiştir (Yen, 1993). Anadolu’da insanlar yontma taş devrinden beri bitkilerden tedavi amaçla yararlanmış olup Anadolu’da yaklaşık 200 yıl süren Selçuklu döneminde kullanılan bitkisel droglar ve ilaçlar hakkında özgün araştırmalar bulunmaktadır. Bu alandaki en önemli kaynaklar Dineveri, Ebu Reyhan Buruni, ve İbn Baytar’ın eserleridir. Ayrıca 9. yüzyılda Yakup bin İshak El Kindi tarafından yazılan uçucu yağ taşıyan droglar önemli eserlerdendir. Osmanlılar döneminde tıbbi bitkileri konu alan dersler Sultan 2. Mahmut zamanında 1839 yılında Mekteb-i Tibbiye-i Şahane döneminde tıp ve eczacılıkta okutulmakta idi.

Bitkisel, hayvansal veya madensel olan ve eczacılık, kimya ve boya endüstrisinde kullanılan etkin maddeler daha çok drog olarak adlandırılırlar. Bitkisel kökenli droglar çok eski devirlerden beri hastalıklara karşı kullanılırken bitkilerde bulunan etkin bileşikler ve etki mekanizmaları hakkındaki bilgiler XIX. Yüzyılın ortasından sonra araştırılmaya başlandı. Bitkilerdeki hastalıkları tedavi edici özellik taşıyan etken maddeler bitkilerin, çiçek, yaprak, tohum, meyve, kök, gövde, kabuk gibi bölümlerine bulunabilir. Bazı bitkilerin belirli kısımları kullanılırken bazılarının tümünden yararlanır. Örneğin ıhlamur ve papatyanın sadece çiçekleri kullanılırken nane ve kekiğin tümü kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yaklaşık 4 milyar insanın bitkisel tıbbi kullandığını bildirmektedir. Bitkisel ilaçlar daha çok bitki çayı, ham tabletler, konsantreler, olarak kullanılmaktadır. Bitkisel ilaçların kullanımı daha çok uzak doğuda, Hindistan, Çin ve Japonya da yaygın olmakla birlikte Avrupa da bitkisel ilaçları araştırma ve destekleme dernekleri “European Societies Cooperation of Phtotherapy (ESCOP) birliği mevcuttur. Dünyada son yıllarda bitkisel amaçlı yapılan çalışmaların yayımlandığı bilimsel dergilerin sayısı da hızla artmaktadır (Baytop, 1999; Baytop, 2001).

## 2.2. Serbest Radikaller ve Genel Özellikleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller en dış elektron kabuğundan bir elektron kaybetmiş olduklarından bu elektron açığını kapatabilmek için başka atomların elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Serbest radikal oluşturan kaynaklar radyasyon, virüsler, UV-ışınları, X-ışınları, ozon kozmik ışınlar, hava kirliliğini yaratan fosil kökenli yakıtların yanma sonundaki ürünleri, sigara dumanı, otomobil egzoz gazları, sanayi atıkları, enfeksiyonlar, stres, hücre metabolizmasının toksik ürünleri, bazı tahrip edici kimyasallar, haşere kontrol ilaçları ve birçok başka etkenlerdir.

Radikal tepkimeleri biyoloji ve tıpta yaşamsal bir öneme sahiptir ve yaşayan her canlı da her an oluşmakta ve kaybolmaktadır Çünkü radikaller, metabolizmanın normal işleyişi sırasında sürekli olarak üretilmektedir. Moleküler oksijen ( $O_2$ ) kendisi bir diradikaldir. Temel haldeki moleküler oksijen, oksijen atomlarının her ikisinde de birer çiftleşmemiş elektron bulundurur Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre iki kısımda toplanırlar. Oksijen içeren radikaller serbest oksijen radikalleri (SOR) olarak adlandırılırlar. Biyolojik sistemlerde sıklıkla kullanılan ve serbest oksijen radikalleri Tablo 1 de verilmektedir (Sies, 1991).

Tablo 1. En sık karşılaşılan serbest radikaller ve serbest radikal üreten türlerin bazı özellikleri

Adı	Simge	Etkisi
Hidrojen radikali	$H^\bullet$	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	$O_2^{\bullet-}$	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	$OH^\bullet$	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	Reaktivitesi çok düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	$^1O_2$	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	$HO_2^\bullet$	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırır
Peroksil radikali	$ROO^\bullet$	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olur
Triklorometil radikali	$CCl_3^\bullet$	$CCl_4$ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	$RS^\bullet$	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	$RO^\bullet$	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO	L – argininden <i>in vivo</i> üretilir
Azot dioksit	$NO_2$	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

### 2.3. Antioksidanlar

Oldukça aktif moleküller olan radikallerin çoğalması canlı sistemlerde kontrol edilemeyen hasarlara yol açabilirler. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek oksidasyonunu engelleyen, yavaşlatan, durduran bileşiklerdir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid oksidasyonunu inhibe ederler (Halliwell, 1992).

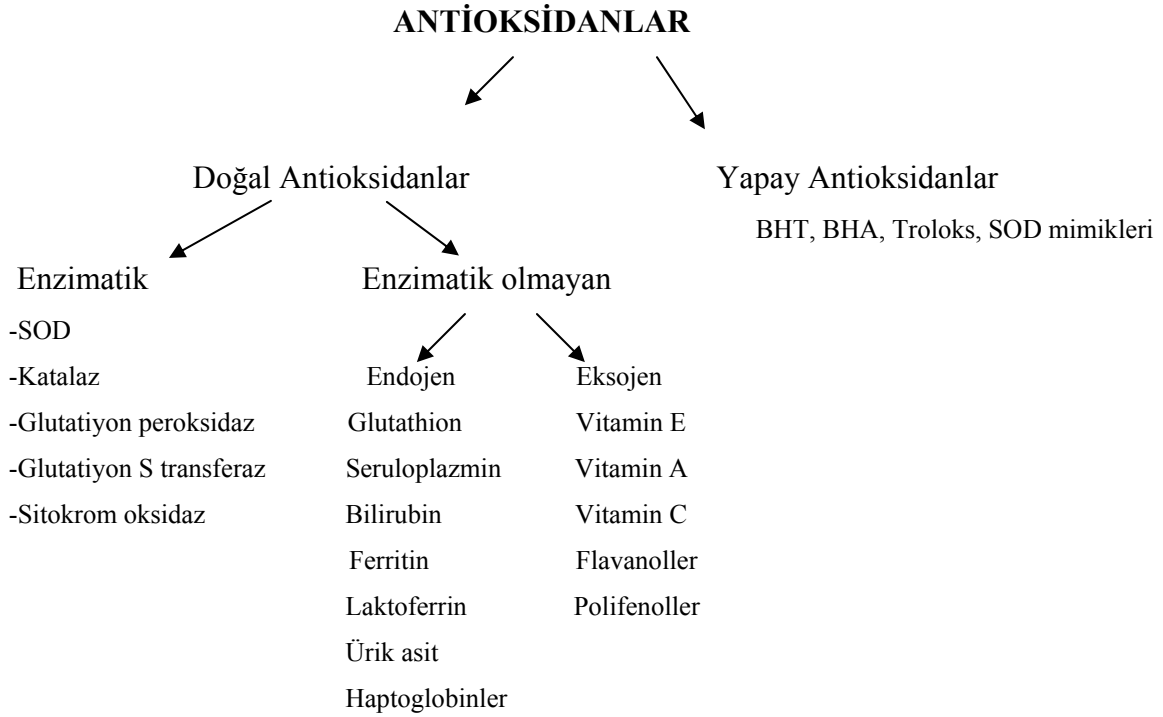
Antioksidan savunma mekanizmaları oldukça çeşitli olup bunlardan bazılarını şöyle özetlemek mümkündür:

1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
2. Üretilmiş radikallerin temizlenmesi (detoksifikasyon)
3. Hücre deformasyonunun onarılması
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması
5. Endojen antioksidan kapasitesinin artırılması.

Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca 2 gruba ayrılır Doğal antioksidanlar etki mekanizmalarına göre enzimatik ve nonenzimatik olarak iki sınıfa ayrılır. Şekil 1'de antioksidanların sınıflandırılması verilmektedir.

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla *oksidan-antioksidan denge* olarak tanımlayabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin özellikle oksidanlar lehine bozulması membran lipitleri, proteinler ve DNA gibi hücrenin önemli yaşamsal yapılarında bütünlüğün bozulmasına ve canlıda patolojik olayların gelişmesine yol açar.

Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre deformasyonunun onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak tanımlanan beş değişik şekilde yürür (Akkuş, 1995).



Şekil. 1 Antioksidanların sınıflandırılması

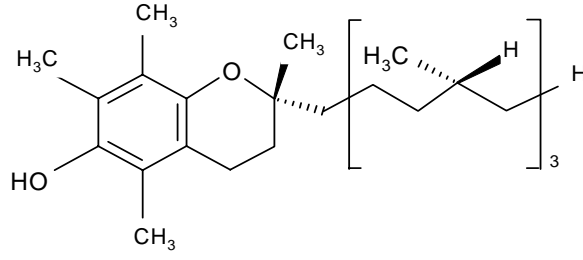
## 2.4. Bitkiler Tarafından Üretilen Bazı Antioksidan Maddeler

Bitkiler sonsuz sayıda biyomolekül üretebilme yeteneğine sahip canlılardır. İnsan organizması tarafından üretilen bitkisel kaynaklar tarafından üretilen (eksojen kaynaklı) pek çok biyomolekülün vitamin ve antioksidan özellikleri vardır. Bu bileşikler özellikle halkalı ve aromatik yapıya sahip moleküller olup insan organizması tarafından üretilemedikleri için bitkisel gıdalarla temin edilirler. Bu tür bileşiklerin başında esansiyel aminoasitler, E, A, C vitaminleri ile çeşitli fenolik bileşikler ile yağ asitleri bulunmaktadır.

### 2.4.1. E Vitamini ( $\alpha$ -tokoferol)

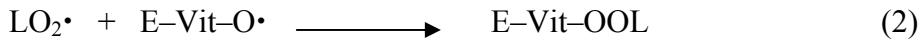
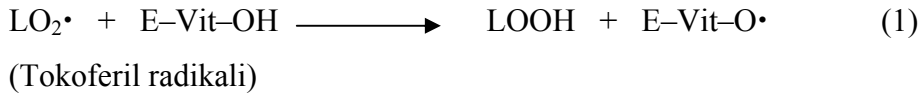
E vitamini, tokoferol yapısında olup ilk olarak Evans ve Sure tarafından tanımlanmış ve 1938 yılında izole edilmiştir.





Şekil 2. E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol)

Sekiz doğal tokoferolden, doğada en yaygın bulunanı ve en aktif olanı  $\alpha$ -tokoferoldür. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. E vitamini, yağda çözünebilir bir antioksidandır. Daha çok mitokondri ve mikrozoimler gibi membranca zengin fraksiyonlarda bulunur.  $\alpha$ -Tokoferol membranlar dışındaki ortamlarda oldukça zayıf bir antioksidan iken, membran lipid tabakaları arasında oldukça etkilidir. E vitamini, zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları lipid peroksi radikallerini ( $LOO\cdot$ ) parçalamak (1) ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır (2).



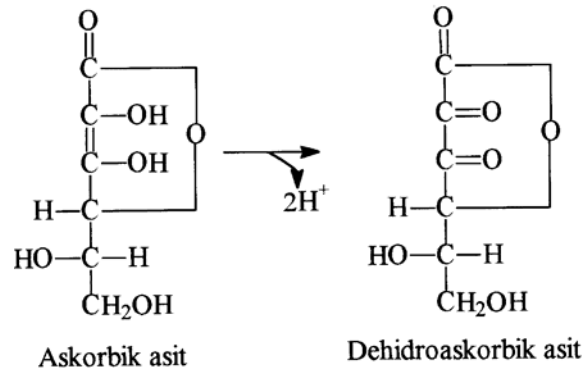
Görevini tamamlayan E vitamini tekrar kullanıldığı için yenilenmesi gerekir. Özellikle yer fıstığı, kuruyemiş, lifli yeşil besinler, badem, pamuk gibi bitkilerin yağlarında ve keten tohumlarında bol bulunan E vitaminin antioksidan özelliğinin yanı sıra hücrede sinyal iletim mekanizmasındaki bazı basamaklar üzerinden hücre çoğalmasını etkilemektedir. E vitamininin kalp hastalığı oluşma riskini azalttığı bir çok araştırma ile gösterilmiştir (Chen vd., 1988).

### 2.4.2. Karotenoidler

Karotenoidler, çeşitli derlemelerde bildirildiği gibi, bilinen çok iyi radikal tutucu, zincir reaksiyonlarını bozucu ve lipid peroksitlerin oluşmasını engelleyici ve yok edici bir bitki antioksidan pigment molekülüdür (Polyakov vd., 2001). Oksijenin toksik etkisini ve serbest radikalleri yok edici olarak bilinen en iyi antioksidan madde olup aktivitesi, ortam oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Özellikle havuçta ve ıspanakta bol bulunan bu antioksidan molekül, izoprenoid bir sisteme ve hidrofobik bir yapıya sahiptir.  $\beta$ -karoten ince bağırsakta parçalanır ve iki molekül retinal oluşturur. İnsanlarda bu dönüşüm etkin değildir.  $\beta$ -karotenin A vitamini aktivitesi retinolün altıda biri kadardır. Diyetlerinde bol miktarda  $\beta$ -karoten bulunan toplumlarda akciğer kanseri, deri kanseri ve kalp hastalığı görülme sıklığı daha azdır.  $\beta$ -karoten bakımından zengin gıdaların tüketilmesi katarakt riskini de azaltır.  $\beta$ -karoten, antioksidan özelliğinden dolayı ve bağışıklık fonksiyonunu artırması nedeniyle koruyucu etkiye sahiptir. Görmede en önemli madde retinol olup, memeliler bu maddeyi tam olarak sentezleyemezler. Dolayısıyla etkin bir görme olayı için bu organizmalar, dışarıdan A vitamini alınımına ihtiyaç duyarlar. Hücrelerde A vitamini, oksidoretüktazlar tarafından redoks reaksiyonları ile bitkilerde provitamin olan  $\beta$ -karotenden üretilebilir (Edge vd., 1997).

### 2.4.3. Askorbik Asit (C vitamini)

C vitamini ilk defa 1970'li yıllarda Pauling tarafından bulunmuş olup suda çözünebilir bir vitamindir. Pek çok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici madde olarak rol oynayan askorbik asit (22), özellikle yeşil renkli taze sebze (biber, maydanoz, ıspanak vb.), meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolayca emilir, ısıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya ise dayanıklıdır. Kuvvetli bir indirgeyici olan askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur ve bu reaksiyon fizyolojik şartlarda geri dönüşümlüdür.



Şekil. 3. C Vitamini

Yapılan epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, askorbik asit,  $\beta$ -karoten, polifenol gibi doğal antioksidanların serbest radikalleri yok edici ve oluşturdukları zararları azaltıcı etkileri olduğunu göstermektedir. Askorbik asitin, peroksil radikallerini temizleme aktivitesinin yanında  $H_2O_2$  bağımlı lipid peroksidasyonunu koruyucu ve OH-deoksiguanozin oluşumunu engelleyici aktiviteleri bildirilmiştir (Yen vd., 2002). Askorbik asit, iyi bir indirgen özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C vitamini bitkisel ve hayvansal yağları, balık, margarin ve süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı korumaktadır.

C vitamininin indirgeyici özelliğinin yanında oksitleyici etkisi de vardır. Proteine bağlı  $Fe^{+3}$ 'ü (ferrik demir),  $Fe^{+2}$ 'e (ferröz demir) indirgeyerek (3) Fenton reaksiyonu ile  $H_2O_2$ 'nin etkileşmesine uygun hale getirir. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur.



Görüldüğü gibi C vitamininin ferrik demirle doğrudan reaksiyonunda C vitamini radikali meydana gelir (4). Bu C vitamini radikali pek reaktif değildir. Ya NADH-redüktaz tarafından indirgenir ya da iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesini durdurur (5).



Ancak aynı radikal başka bir ferrik demiri indirgeyerek kendisi dehidroaskorbata (DHA) dönüşürken (6) bu arada yine Fenton reaksiyonu için gerekli olan ferröz demiri açığa çıkarabilir.



Askorbik asit düzeyinin düşük olması, tüm kronik enflamatuvar (doku hasarı) hastalıklarda ve lipid peroksidasyonunun artmış olduğu durumlarda önemli rol oynar. Sigara içenlerde, koroner arter hastalığı olanlarda ve kanserli hastalarda plazma askorbat düzeyinin normalden daha düşük olduğu kaydedilmiştir (Chen vd., 1988).

#### **2.4.4. Diğer Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkili Biyomoleküller**

Bitkiler tarafından sentezlenen ve ikincil metabolizma ürünleri olarak adlandırılan pek çok biyomoleküller; bitkilerde sinyalizasyon (mesajcı), antioksidan, antimikrobiyal, insektisit, herbisitlere gibi koruyucu rolleri bulunurlar. Bu nedenle (karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra) bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olduğu için bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir. Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan biri olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının bulunduğu belirtilmektedir (Bravo, 1998). Fenolik ajanlardan polifenoller en az 10 farklı sınıf altında toplanan bir grup bileşik sınıfı olup çeşitli meyveler, sebzeler, kuruyemişler, tohumlar, çiçekler, kök ve gövde kısımları doğal olarak sentezlenen maddelerdir. Polifenollerin antioksidan etkilerinden başka, divalent katyon bağlayıcılar, DNA topoizomeraz II aktivitesinin inhibisyonu, protein kinaz C ve protein tirozin kinazların inhibisyonu, hepatik elektrofilik mekanizmada rol oynayan enzimlerin ve sitokrom P<sub>450</sub> gibi sistemlerin aktivasyonu, nitrik oksit sentaz, siklo-oksijenaz ve lipo-oksijenaz enzimlerinin modülatörü etkisi gösterilmiştir (Wollgast ve Anklam, 2000).

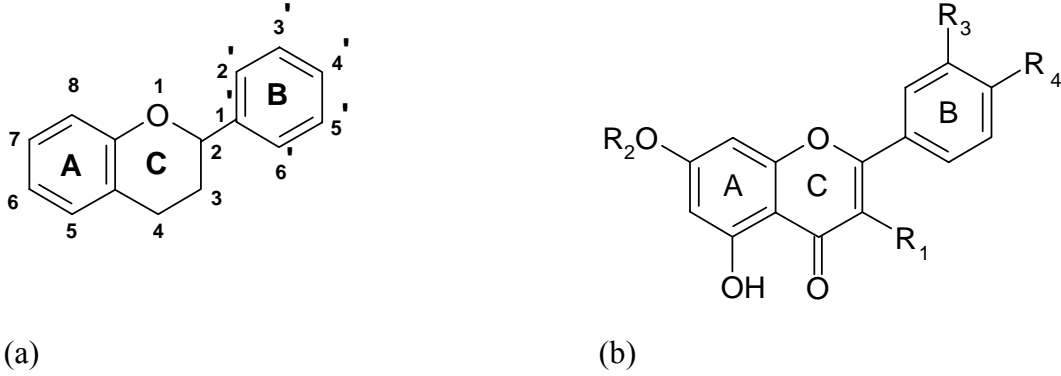
Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi olup bitkiye koku ve tat verirken, bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından

sorumlu olup (acı biberden terpenoid capsaicin) bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Bitkilerde bulunan bazı tıbbi önemi olan bileşiklere örnekler

Bitkiler tarafından sentezlenen ve fenolik bileşikler oldukça çeşitli olup bunların içinde en etkin olan biyomol flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışığın zararlı etkisinden bitkiyi koruyucu etkiye sahip moleküllerdir. Şimdiye kadar bitkilerden izole edilip yapısı aydınlatılan 4,000 -6,000 civarında flavonoid olduğu bildirilmiştir (Peterson, 1998).

Flavonoidler; en önemli antioksidan özelliğe sahip grup olup kendi içinde 13 alt sınıfa ayrılır (Tablo 4). 1990 yılına kadar 5,000 tane flavonoid yapısı bildirilmiştir. Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, A, B, C halkasından ibaret difenilpropan (C6-C3-C6) yapısı oluşturur (Şekil 4). A halkası üç karbonlu bir bileşik olan malonil-CoA dan yani glukoz üzerinden fenil alanin ve cinnamik asitten sentezlenirken, C ve B halkaları Sikimat ve fenilpranoid metabolik yolu üzerinden yine glukozdan sentezlenir. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması sebebiyle flavonoid alt sınıfları oluşur. Flavonoid yapılarında yer alan en etkili fonksiyonel gruplar hidroksil gruplarıdır. Doğal flavonoidlerin yapısında en fazla yedi hidroksil grubu bulunduğu bildirilmiştir (Guliyev ve Harmandar, 2000). Bu hidroksil grupları, reaktif özellikte olup kolaylıkla alkilenebilir ve glikozillenebilirler. Flavonoidlerin taşıdığı farklı hidroksil gruplar ve onlara bağlı substitüenler onların farklı indirgenme potansiyeli kazanmasına ve bundan dolayı değişik antioksidan aktivite göstermelerine sebep olur. Örneğin; flavonoid radikallerinin indirgenme potansiyelleri alkil, peroksil ve süperoksit radikallerinin indirgenme potansiyellerine göre daha düşüktür. Bu nedenle flavonoidler bu oksit türlerini deaktive ederler ve reaksiyonlarının vereceği zararları engellerler. Flavonoidlerin yapıları ile antioksidan aktiviteleri arasında yakın bir ilişki vardır. Örneğin; flavonoid yapısında C-4' pozisyonunda hidroksil grubunun bulunması antioksidan aktiviteyi artırırken, serbest 4'-OH grubunun metoksil grubu ile substitue olması aktiviteyi önemli derecede azaltır (Guliyev ve Harmandar, 2000; Havsteen, 2002). Bu durum göz önüne alındığında Küersetin, kateşin, luteolin ve rutin, antioksidan olarak etkili flavonoidlerdir. Flavonoidlerin sadece antioksidan aktivite değil aynı zamanda antimikrobial, antitoksik, antivirütik gibi değişik biyolojik aktivitelere de sahip olduğu bildirilmiştir (Cowan, 1999; Weston, 1999; Havsteen, 2002 ).

Bir flavonoid alt sınıfı olan antosiyaninler suda çözünen en önemli pigmentlerden olup yüksek yapılı bitkilerin çiçek ve meyve kısmında bulunurlar. Flavonoidlerin bir başka alt sınıfı olan kateşinler insan besininin genel bileşeni olarak tanımlanır ve yeşil çay yapraklarında (epikateşin, epikateşingallat, vs.) bulunmaktadır.



Flavonoid	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Luteonil	H	H	OH	OH
Luteonil-7-O-glukozit	H	glc	OH	OH
Kamferol-3-O-soforozit	O-soph	H	H	OH
Küersetin-3-O-galokozit	O-gal	H	OH	OH
Galaegin	OH	H	H	H
Küersetin-4'-O-glukozit	OH	H	OH	O-glc
Kamferol	OH	H	H	OH
Küersetin	OH	H	OH	OH

Şekil 4. Flavonoidlerin temel yapısı (a) ve bazı substitüenleri (b)

Kinonlar, iki keton ile substitue olmuş aromatik halkalardır. Ubikinonlar doğada karakteristik olarak oldukça reaktif bileşiklerdir. Bu bileşikler meyve ve sebzelerin kesildikleri zaman kararmalarından sorumlu olup pek çok redoks reaksiyonda elektron taşıyıcı olarak rol oynayıp ayrıca koenzim rolleri de vardır.

Taninler, oldukça hidroksillenmiş moleküller olup protein ve karbohidratlarla suda çözünmeyen kompleksler oluşturdukları için tanince zengin gıdalar toksik özelliğine sahip olup protein çöktürmek amacıyla dericilikte ve tekstil sanayinde kullanılırlar. Molekül ağırlıkları 500 ila 3000 g/mol arasında değişir ve bitkinin hemen her kısmında (kök, gövde, odun, yaprak, meyve) bulunurlar. Bitkisel taninler hidroliz olabilen ve kondanse olabilen taninler diye iki grupta toplanırlar. Hidrolizlenebilen taninler, gallik asit içerirler ve genellikle *D*-glukoz ile çeşitli esterler oluştururlarken kondanse taninler veya proantosyanidinler, yüksek molekül ağırlığına sahip flavonoid monomerlerinden oluşurlar.

Asit, alkali, sıcak su ile ve enzimatik yolla kolaylıkla hidroliz olurlar. Taninler belki de kondenzasyonla bitki dokusu odunun flavan türevlerini oluştururlar. Taninlerin bir başka adı da kinon polimerleridir (Wollgast ve Anklam, 2000).

Kumarinler, benzen ve  $\alpha$ -piran halkası ile kaynaşmış fenolik bileşiklerdir. Samanın karakteristik kokusundan sorumludurlar. 1996 yılına kadar en az 1300 tane izole edilmiştir. Kumarinler, antitrombotik, antiinflamatuvar ve vazodilatör özelliklere sahiptirler. En fazla kullanılan antikoagülandır.

Terpenoidler, yağ asidi benzeri asetat birimlerinden sentezlenirler. Fakat yağ asitlerinden, dallanmadan dolayı farklılık gösterirler. Bakterilere, virüslere, mantarlara, ve protozoa ya karşı etkilidirler.

Alkaloidler, bunlara heterosiklik azotlu bileşikler de denir. Tıbbi olarak ilk kullanılan alkaloid morfin olup 1805 yılında bulundu. Kodein ve heroin birer morfin türevidirler.

Lektin ve Polipeptidler, bir veya birden fazla şeker birimi içeren glikoproteinler veya oligomerik proteinler olup immun reaksiyona sebep olabilirler.

Karışımlar ve Diğer Bileşikler, propolis çeşitli ağaçların balsam (koku verici, teskin edici) ham özüdür. Çoğu zaman arı yapışkanı olarak ağaçlardan toplanır. Kimyasal yapısı oldukça karmaşık olup yapısında yukarıda tanımlanan lateksler, terpenoidler, flavonoidler, benzoik asit ve esterleri, substitüe fenolik asitler ve esterler bulunur. Sentetik sinnamik asitler, propolis ile aynı olup influenza virüsünün hemagglutinasyon aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Amoros vd., 1992). HSV-1 mutantlarına, adenovirüslere, poliovirus ve vesikular stomatitise karşı etkin oldukları bildirmiştir. Karışım dışında, bitkilerin çeşitli kısımlarında bulunan organik yapıları bileşiklerden bazıları poliaminler, izotiyosiyanatlar, tiyosülfinitler ve glukozidlerdir.

#### **2.4. Antimikrobiyal Maddeler Hakkında Bilgi**

Antibiyotikler hakkındaki gelişmeler, enfeksiyon hastalıklarının etkenleri hakkındaki bilgilerin gelişmesine paralel olarak 19. yüzyılın ikinci yarısında başlamıştır. Çok eski tarihlerde enfeksiyon tedavisi için; ya enfekte olmuş vücut bölgeleri kesilir ya da hastaya arsenik içirilir ve mikropların hastadan önce ölmesi için dua edilirdi. Daha sonra sıtma tedavisinde kinin, sfiliz tedavisinde de topikal olarak civa kullanılmaya başlandı. 20. yüzyılın başlarında Ehrlich tarafından yapılan başarılı çalışmalar, bugün biz hekimlerin

tedavi şansını oldukça yükselten pek çok antibiyotiğin bulunmasında başlangıç olmuştur. 1929 da Fleming tarafından Penisillinlerin bulunuşu antibiyotik çağını başlatmıştır.

Genel olarak bakteri ve mantar türlerini öldüren veya üremelerini önleyen bileşiklere antimikrobiyal maddeler adı verilir. Mikroorganizmaları öldürücü maddelere mikrobisid etkili maddeler ve mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösterirler maddelere ise mikrobiyostatik etki adı verilir. Antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olan, tümüyle sentetik (kimyasal yolla sentez edilen) olan maddelere de kemoterapötik maddeler denir. Bakteriler prokaryot canlılar, memeli hücreleri ise ökaryotik canlılardır. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örneğin; penisilinler, sefalosporinler, sülfonamidler) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptirler.

Antibiyotikler tüm dünyada en sık kullanılan ilaçların başında gelmektedir. Hastaneye yatan her üç hastadan biri antimikrobiyal tedavi alırken, bu toplam ilaç giderlerinin %25'ini kapsamaktadır. Bir antibiyotiğin kullanıma sunulmasına kadar geçen süre, emek, maliyet göz önüne alındığında, antibiyotiklerin hekimler tarafından doğru endikasyonlarda reçete edilmesi gerekmektedir. Ayrıca reçete edilen ilacın, ilaç etkileşimleri, yan etkileri ve direnç gelişimi gibi olumsuz etkileri de düşünüldüğünde, bu gereklilik mutlak hale gelmektedir

Antimikrobiyal maddeler etkili olabildikleri mikroorganizma cins sayısının az yada çok oluşuna bağlı olarak, dar yada geniş spektrumlu şeklinde tanımlanır. En dar spekturumlu maddeler enfeksiyona neden olan mikroorganizma üzerine etkili ve tedavide ideal antimikrobiyal maddeler olarak kabul edilir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler konağın doğal bağışıklığında önemli rol oynayan ve ekolojik dengeyi sağlayan normal mikroorganizma florasını bozar. Fakat birçok patojenin birlikte etken olduğu enfeksiyonlarda ya da mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının beklenemeyeceği acil durumlarda geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler (karbapenemler, kinolonlar) kullanılır.

Antibakteriyel maddeler bakteriler üzerine beş farklı yoldan etki eder:

1. Hücre duvarı sentezinin inhibe edenler (Beta-laktam antibiyotikler, penisilinler, glikopeptid antibiyotikler)
2. Sitoplazma zarının fonksiyon ve yapısının bozulmasına neden olanlar (Polimiksinler)



3. Protein sentezinin inhibisyonuna neden olanlar (Amino glikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolid antibiyotikler)
4. Nükleik asit sentez ve fonksiyonlarının bozulması (Kinonlar, rifamisin, nitrofurantoin)
5. Kimyasal yapılardaki benzerlik yolu ile metabolizmanın bozulmasına neden olanlar (Sülfonamidler)

*Escherichia coli*, normal bağırsak florasını oluşturan bakterilerdendir. Bağırsaklarda diyare oluşturan suşları dışında, kommensal olarak yaşarlar. Üriner yol enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, menenjit gibi hastalıklara sebep olur. *Klebsiella pneumoniae*, insanlarda üst solunum yolu ve dışkı florasında bulunan bir bakteri olduğu için patojenliği uygunsuz koşullar karşısında fırsatçı patojen olarak açığa çıkar. Bu nedenle hastane enfeksiyonlarından sorumlu bir bakteridir. *Klebsiella pneumoniae*, öncelikle pnömoni yapar ve bakteriyel pnömonilerin %2'sinden sorumludur. Daha çok 2 yaş altı ve 40 yaş üstü kişilerde vücut direncinin kırılması, virütik üst solunum yolu enfeksiyonları sonrasında bu tip pnömoniler görülür. Ayrıca piyelit, piyelonefrit ve sistit gibi idrar yolu enfeksiyonları, prostatit, otitis media, sinüzit, peritonit, menenjit, kolosistit, anjin ve çeşitli organ hastalıklarından sorumludur. *Yersinia pseudotuberculosis* ise, hıyarçık vebası, akciğer vebası ve veba sepsisi'ne neden olur. *Pseudomonas aeruginosa*, endokardit, solunum sistemi enfeksiyonları, bakteriyemi, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, üriner enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları bu bakteri varlığında görülür. *Enterococcus faecalis*, anjin, tonsilit, farenjit, sinüzit, otitis media, mastoidit, menenjit, beyin apsesi, solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yara enfeksiyonlarına yol açar. *Staphylococcus aureus*, deri enfeksiyonları, toksik şok sendromu, solunum sistemi enfeksiyonları, besin zehirlenmesi gösterdiği enfeksiyonlardır. *Bacillus cereus* ise, deri şarbonu, bağırsak şarbonu ve akciğer şarbonu hastalıklarına neden olur. *Candida albicans* ve *Candida tropicalis*, ağız kandidozu, genital kandidoz, deri kandidozu ve onikomikoz'a neden olur (URL-1, 2007 ; Amoros, vd., 1992. Brooks, 1998. Blue vd., 2002, Jalava, 2004 ).

### **2.5.1. Antibiyotiklere Duyarlılık Deneyleri**

Günümüzde enfeksiyon hastalıkları etken mikroorganizmanın antibiyotiklere duyarlılık deneyi sonuçlarına göre, enfeksiyon etkeninin duyarlı bulunduğu en uygun

antimikrobiyal madde ile tedavi edilir. Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılığı temelde iki farklı yöntem ile belirlenebilir.

#### **2.5.1.1. Dilüsyon Yöntemi**

Antibiyotiklerin sıvı veya katı (agarda dilüsyon) besiyerlerinde bir seri halinde seyreltilmesi ve her bir seyreltme ortamına, duyarlılığı belirlenecek bakterinin belirli sayıda hücre içeren süspansiyonundan eşit miktarda ilave edilmesidir. Deney serileri uygun sıcaklıkta (35-37°C'de) ve bakterinin üremesi için uygun süre (16-20 saat) bekletildikten sonra sonuçlar ile bakterinin üremesini durduran en az antibiyotik miktarı belirlenir.

#### **2.5.1.2. Difüzyon Yöntemi**

Yöntemin esası belirli konsantrasyondaki antibiyotiklerin katı besiyerine difüze olması yani yayılmasıdır. Antibiyotikler genellikle kağıt disklere belli konsantrasyonlarda emdirilir ve bunlar antibiyotik kaynağı olarak kullanılır. Bu yöntem disk-difüzyon yöntemi olarak adlandırılır. Dilüsyon yönteminden farklı antimikrobiyal maddelerin bir tek konsantrasyonunun etkinliği denir. Disk-difüzyon yöntemine benzeyen, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) belirlenmesini sağlayan E-testi (Dereceli antibiyotik şeridi yöntem) kantitatif yöntem olarak kullanılır.

### **2.6. Bitkilerde Bulunan Biyoaktif Bileşikler**

Bitki drogları üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda selüloz, nişasta, pektin protein ve şekerler gibi tedavi yönünden etkisiz daha çok besin ve enerji ihtiyacını karşılayan moleküller yanında çok az miktarlarda bitkilerde bulunan farmakolojik etkiye sahip moleküllerde mevcuttur. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir. Bu bileşikleri glikozitler, organik asitler, tanenler, alkaloidler, sabit yağlar, uçucu yağlar, reçineli bileşikler, vitaminler ve antibiyotiklerdir

Glikozitler: Enzimatik veya seyreltik asitlerin etkisiyle şeker olayan bir kısım ile bir veya daha fazla şeker molekülüne ayrılan bileşikler olup şeker kısımları sudaki çözünürlüklerini

artırırlar. Bazı glikozitler farmakolojik etkiye sahip olup yüksük otu yaprağında bulunan digitalin glikozidi kalp ilacı olarak kullanılmaktadır

Tanenler: Bitki aleminde en yaygın olarak bulunan fenolik yapıda moleküllerdir. Daha çok suda çözülebilen bileşikler olup tıp, eczacılık, deri sanayinde kullanılmaktadırlar.

Organik asitler: Karbohidratların oksidasyonu ile oluşan organik moleküllerdir. Bitkilerde serbest veya tuzları halinde bulunup bitkiye ekşi lezzetini kazandırırılar.

Alkaloidler: Yapılarında azotlu bileşikler içeren, katı ve genellikle renksiz maddeler olup asitlerle tuz meydana getirirler. Morfin, kodein, kafein, kokain, atropin bu tür maddelerdir.

Sabit Yağlar: Gliserin ve yağ asitlerinin esterifikasyonu ile oluşan içerdikleri yağ asitlerine göre katı veya sıvı halde bulunan organik çözücülerde çözünen ve suda çözünmeyen lipidlerdir. Bitkilerin daha çok meyve ve tohumlarında bulunurlar.

Uçucu yağlar: Daha çok terpenlerden oluşmuş karışımlara olup kokolu ve uçucu moleküllerdir. Bitkiye koku ve tat veririrken, bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Daha çok su buharı destilasyonu ve ekstraksiyon ile elde edilirler.

Vitaminler: Suda çözünen ve suda çözünmeyen vitaminler olarak iki sınıfa ayrılı hayvan organizması tarafından üretilemeyip daha çok koenzim ve antioksidan aktivite için gerekli moleküllerdir. Suda çözünen vitaminler: askorbik asit, B vitaminleri olup organik çözücülerde ve yağda çözünenler A vitamini, E vitamini bulunmaktadır (Akkuş, 1995).

Bitkilerde normal metabolizma sırasında ve herhangi bir stres durumunda ( yaralanma, enfeksiyon, uv radyasyon ) ikincil metabolit ürünleri adı verilen fenolik bileşikler üretilirler. Aromatik yapıya sahip bu fenolik bileşikler basit fenoller, fenolik asitler (benzoik asit, sinnamik asit türevleri), kumarinler, flavonoidler, stilbenler, hidrolizlenebilen kondanse taninler ve ligninler üretilir. Bu bileşiklerin bazıları antimikrobiyal aktivite için, bazıları antioksidan ve bazıları koku, tat, renklilik oluşturmak gibi fonksiyonları üstlenirler (Bravo, 1998).

## 2.7. Anzer Yaylasında Yetişen *Anemone narcissiflora* Bitkisi Hakkında Bilgi



Şekil. 5 *Anemone narcissiflora* bitkisinin resmi

Yaygın Adı	: <i>Anemone</i>
Bitki Tipi	: Herbaceous perennial
Aile	: Ranunculaceae
Doğal alanı	: Avrupa, Asya ve Kuzey Batı Amerika
Yükseklik	: 1-1,5 fit
ÇiçeklenmeZamanı	: Mayıs –Haziran
Güneş	: Tam güneşten kısmı gölgeye
Su	: Orta nem
Muhafaza	: Düşük
Bilinen Riskleri	: Bu türün birkaç üyesi hafifçe zehirlidir, toksik özellikleri ısı ile ya da kurutma ile giderilebilir.

*Anemone* L. (Ranunculaceae) bitkisinin Türkiyede 8 doğal türü mevcut olup (Davis vd., 1965; Davis, 1988),bitkinin yaş olarak zehirli olduğu fakat kurutulmuş bitkinin Anadolu ve Bulgaristan da yaralara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Stoyanow, 1972 Baytop, 1999).

Orta nemlilikte, iyi gübreli topraklarda tam güneşten kısmi gölgeye kadar kolayca yetiştirilebilir. Kısmi gölgede nemli, zengin, kumlu-humuslu, asidik, bazik ve nötral toprakları tercih eder. Çiçekler yazın yüksek ısı süresince uyku halinde olur. Bitkiler soğuk

iklimlerde en iyi performansı gösterirler. Mayıs ayında çiçeklenir ve tohumları hazirandan temmuza kadar olgunlaşır. Çiçekleri hermafrodittir (yani hem dişi hem erkek organlarına sahiptir) ve sinekler ve kelebekler tarafından polenlenir. Yaprakları çiğ olarak ya da pişirilerek tüketilebilir. Üst kök uçları da yiyecek olarak kullanılabilir (Davis, 1965)

*Anemone narcissiflorin*, bitkisinin triterpen ve saponinleri ile kimyasal bileşimleri Masood vd., (2004), Tiwari vd., (2003), tarafından çalışıldı fakat bitkinin antioksidan özelliği ile antimikrobiyal aktivitesi çalışmalarına rastlanmadı.

## 2.8. GC-MS Hakkında Bilgi

Gaz kromatografisi–Kütle spektrometresi iki ayrı analiz yönteminin birleştirilmesi ile oluşmuş bir cihazdır. GC kısmı ile karışımda bulunan maddeleri üzerinde takılı bulunan kolunun özelliklerine göre ayırır ve MS kısmı ile ayrı ayrı karakterize eder.

Gaz kromatografisinde iki çeşit faz bulunmaktadır. Mobil (hareketli faz)olarak inert bir gaz olan Helyum (He) veya azot (N) kullanılmaktadır. Sabit veya stasyonier faz ise analizi yapılacak olan maddenin kimyasal özelliklerine GC kolunu seçilir. Bu kolonlar camdan, çelikten veya yüksek sıcaklığa dayanıklı polimerlerden üretilirler. Analiz edilecek numune içersindeki maddeler inert gazın yardımı ile kolon içersinde sürüklenirken kolon maddesi ile etkileşmektedir. Bu etkileşim bazen kimyasal bazen fiziksel olmaktadır. Her bileşiğin kolon maddesine ilgisi farklıdır. Bu özellikten dolayı bileşiklerin kolunu ayrı ayrı zamanda terk etmesi nedeniyle analiz yapılmaktadır. Kolon maddesi ile en az etkileşimde bulunan madde kolonu en erken terk eder, kolon ile en fazla etkileşen madde en son terk eder. Sabit fazı değiştirmek suretiyle çok değişik karışımları GC de analiz etmek mümkündür.

Genel olarak GC kolonu sıcaklığı ayarlanabilir bir fırın içersine yerleştirilir. Fırın sıcaklığının artması ile kaynama noktası en düşük olan bileşik kolonu ilk terk eder. Bir bileşiğin kolonu terk etme zamanı (elüsyonu) kolonun cinsine, taşıyıcı gazın cinsine, kullanılan gazın basıncına ve fırın sıcaklığına bağlı olarak değişir. Kolondan çıkan bileşikler daha sonra dedektöre gelmektedirler. Dedektör kolondan bileşik gelmesi durumunda elektronik sinyaller üretir. Bileşiğin konsantrasyonu arttıkça sinyalin büyüklüğü de orantılı olarak artmaktadır. Cihaza bağlı bir bilgisayar yardımı ile dedektörden gelen sinyaller bir grafiğe kaydedilir. Bu grafiğe “kromatogram” adı verilir. Kromatogramda her pik bir maddeye karşılık gelmekte ve pikin büyüklüğü maddenin

konsantrasyonu ile orantılıdır. Genel olarak bir kromatogramda x eksenini elüsyon zamanı (Retention index), y eksenini yoğunluğu veya şiddeti (absorbans) gösterir. GC de kullanılan en önemli dedektörler alev iyonizasyon dedektörü (FID), nitrojen fosfor dedektörü (NPD), elektron yaklama dedektörü (ECD) ve kütle spektrometresi dedektörü (MS) dir.

Kütle spektrometresi (MS) GC cihazı ile kullanılan dedektörler içerisinde en hassas ve kullanışlı olanıdır. MS dedektörü sadece kolondan çıkan maddeyi göstermekle kalmaz aynı zamanda bu bileşiğin ne olduğunu gösterir. Çünkü doğadaki her bileşiğin tek bir kütle spektrumu bulunmaktadır. MS de bileşikler moleküler iyon formuna dönüştürülürler. GC kolonundan ayrılan bileşik direkt olarak elektron iyonizasyon çemberine geçer ve burada elektron bombardımanına maruz bırakılarak bileşiğin daha küçük parçalara ayrılması sağlanır. Bu parçalar küçük veya büyük olabilmekle birlikte belirli bir yüke sahip kütlededir. Bu parçacıklar ve üzerlerinde taşıdıkları yükler birbirine oranlanır ve kütle/yük değişimi ( $m/z$ ) olarak ifade edilmektedir. Pek çok parçacığın yükü +1 olduğundan  $m/z$  değeri genellikle parçacığın kütleini göstermektedir (Baugh, 1993; Skoog vd., 1998).

Bir bileşiğin kütle spektrumu onun parmak izi olarak kabul edilmektedir. Bilim adamları yaptıkları çalışmalar sonucu pek çok bileşiğin MS spektrumu elde etmişler ve bu spektrumlar bir kütüphane de toplanmışlar. Bir bileşiğin kütle spektrumu alındığında bu spektrum cihazın kütüphanesindeki spektrumlar ile karşılaştırılır ve olası uyuma değerleri ile hangi bileşik olabileceği söylenebilir. Günümüzde en çok kullanılan MS kütüphaneleri Wiley ve NIST kütüphaneleridir.

### 3. YAPILAN ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kullanılan Cihazlar

Denemelerde kullanılan madde, malzeme ve cihazlar KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyoanatilik Kimya Araştırma Laboratuvarı ve Organik Kimya Laboratuvarından temin edilmiştir. Tablo 2’de kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmalar ile Tablo 3 GC-MS spektrumunun alındığı deneysel çalışma şartları verilmektedir.

Tablo 2. Denemelerde kullanılan malzemeler

Malzeme ve Cihaz Adı	Markası
UV-vis spektrofotometre	LaboMed ve LKB UltraopecK4053
GC (gaz kromatografisi)	Agilent-6890N
MS (Kütle spektrometresi)	Agilent 5973
Rotary evaporatör	Buchi 461 Water Bath
Vorteks karıştırıcı	Heidof
Su banyosu	Nüve
Etüv	Nüve
Derin dondurucu	Bosch
Magnetik karıştırıcı	Nüve
Parçalayıcı	Moulinex

Tablo 3. GC-MS spektrumunun alındığı deneysel çalışma şartları

Başlangıç sıcaklığı	60 °C
Zaman	2 dakika
Hız	5 °C/dak
Maksimum sıcaklık	280 C
Toplam süre	60 dakika
Enjekte edilen numune miktarı	1 µL
Enjektör sıcaklığı	230 °C
Kapiler Kolon	HP-5 (30 m x3.32 mmx0.25 µm)
Taşıyıcı gaz	Helyum, 1.3 mL/dakika

### **3.2. Numunelerin Toplanması ve Deneysel Çalışmalara Hazırlanma İşlemleri**

Anzer Yaylası'ndan 2004 Haziran ayında toplanan bitkinin çiçek, yaprak ve sap kısımları ayrılarak kurutuldu. Bitkinin adlandırılması KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölüm öğretim üyesi Doç. Dr. Kamil ÇOŞKUNCELEBİ tarafından yapıldı. Kurutulmuş kısımlar ayrı ayrı öğütücüde öğütüldü. Su buharı destilasyonu ile uçucu bileşenler ekstrakte edildi (Şekil 6). Ayrıca Soxhlet sistemi (Şekil 7) kullanılarak metanolik, kloroformlu ekstraktlar elde edildi.

#### **3.2.1. Su Buharı Destilasyonu (Uçucu yağ eldesi):**

Su buharı destilasyonu, az uçucu ve suda çözünmeyen ya da çok az çözünen maddelerin uçucu olmayan maddelerden ayrılmasında veya saflaştırılmasında kullanılan bir tekniktir. Genellikle 100 °C civarında en az 5 mm-Hg kadar bir buhar basıncı gösteren ve suda çözünmeyen bileşiklere uygulanan bu yöntem ile birçok yüksek kaynama noktasına sahip maddenin nispeten düşük sıcaklıklarda destillenme olanağı bulunabilir. Su buharı ile reaksiyon vermeyen, kaynama noktaları 100 °C'nin yukarısında olan ve kaynama noktasında veya daha düşük sıcaklıklarda bozulan maddeler için su buharı destilasyonu yöntemi özellikle önemlidir.

Su buharı destilasyonu, uçucu olmayan katı maddelerle bir arada bulunabilen az miktardaki uçucu yabancı maddelerin uzaklaştırılmasında ve reçinemsî reaksiyon ürünlerinden uçucu ve suda çözünmeyen bileşiklerin elde edilmesinde de kullanılabilir. Nitekim su buharı destilasyonu doğal ürünlerin izolasyonunda ve büyük miktarda reçinemsî yan ürünlerin oluştuğu kimyasal reaksiyonlarda ana ürünlerin ayrılmasında kullanılabilir. Bizim yaptığımız su buharı destilasyonunda kullanılan destilasyon cihazı, Clevenger tipidir. Toz haline getirilmiş numuneden 15-20 g kadar tartım aldıktan sonra örnek temiz balona konur ve üzerine 1 L saf su ilave edilir. Balon bir soğutucu sisteme bağlanarak ısıtılmaya başlanır. Kaynama sıcaklığında 4 saat destilasyon devam ettirilir. Toplanan uçucu yağ hegzan ile çözümlenerek alınır ve GC-MS için direkt 1 µL enjektöre uygulandıktan sonra kalan numunenin konsantrasyon tayini yapıldı.





Şekil 6. Clevenger ipi su buharı düzeneği

### 3.2.2. Soxhlet Ekstraksiyonu



Şekil 7. Soxhlet düzeneği

Ekstraksiyon, doğal kaynaklardan veya reaksiyon karışımlarından bir maddenin ayrılmasında kullanılan bir tekniktir. Bu teknik, genellikle, sulu çözelti veya süspansiyon ya da katı karışımlardan bir organik maddenin izole edilmesi amacı ile kullanılır.

Katı maddelerin bir çözücü ile sürekli ekstraksiyonunun sağlanması için uygun bir düzenek “Soxhlet Aygıtı”dır. Soxhlet düzeneği; Soxhlet aygıtı üzerine yerleştirilmiş bir geri soğutucu ve alttan ısıtılan bir balondan oluşur.

Soxhlet aygıtı ile ekstraksiyon, özellikle bitkisel ve hayvansal kaynaklardan doğal ürünlerin izolasyonunda ve anorganik tuzlar yanında bulunabilen organik maddelerin ekstraksiyonunda faydalıdır. Çalışmada kloroformlu ve metanollü iki ayrı ekstraksiyon uygulandı. Kloroform düşük dipol momente sahip olduğundan nispeten apolar karaktere sahip bir çözücü olup bitkideki daha çok apolar karakterli maddeleri çözecektir. Yaklaşık 250 mL kloroform kullanılarak 60 °C de 6 saat ekstraksiyon devam ettirildi. Elde edilen çözeltinin kloroform kısmı bir Rotary-Evaporatory adı verilen döner buharlaştırıcı (Şekil 7) ile uçurulduktan sonra direkt olarak GC-MS spektrumu alınarak biyolojik aktivite tayini yapıldı.

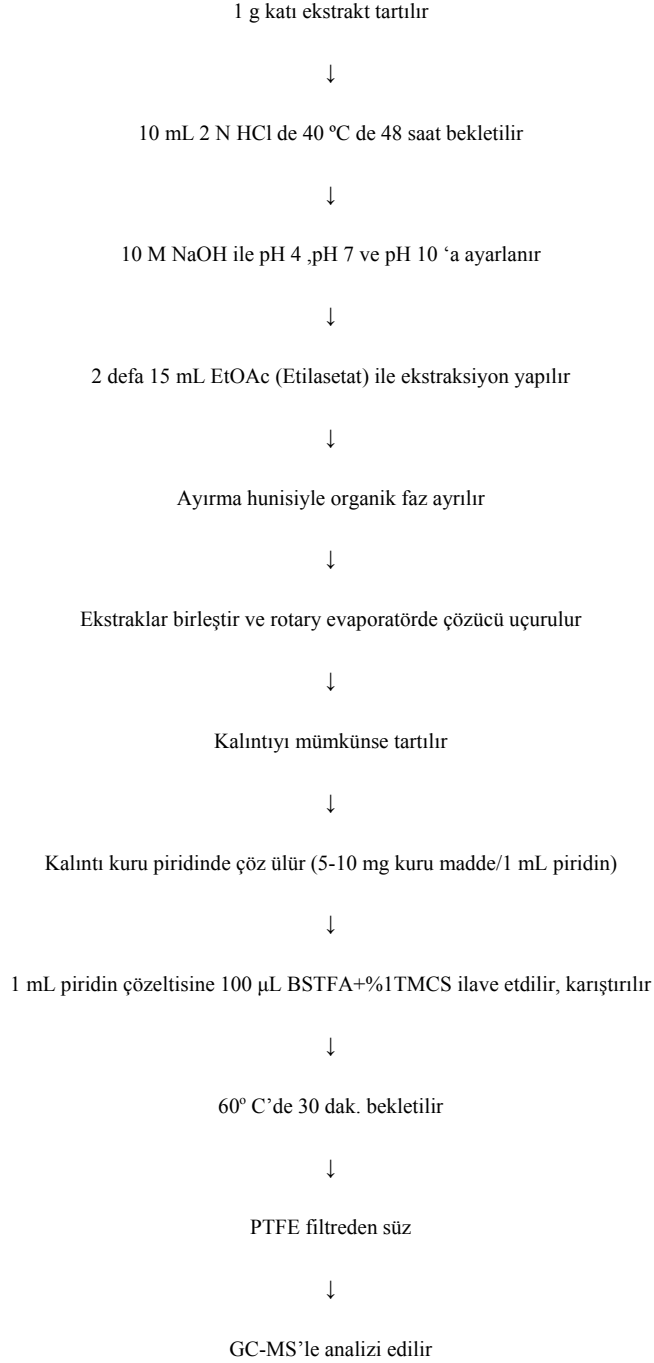


Şekil 8. Döner buharlaştırıcı (Rotary Evaporatory)

Metanol oldukça polar bir çözücü olup bitkideki nispeten polar molekülleri ekstrakte eder. Yaklaşık 250 mL metanol ile 60 °C’de 8 saat ekstraksiyon devam ettirildi. Elde edilen çözeltideki metanol döner buharlaştırıcıdan (Şekil 8) uzaklaştırıldıktan sonra GC-MS spektrumu alınmadan önce türevlendirme işlemine tabii tutuldu. Numunenin konsantrasyonu tayin edildikten sonra biyolojik aktivite incelendi.

### 3.3. GC-MS İçin Metanolik Ekstraktların Türevlendirilmesi

Metanolik ekstrakt numunesinde bileşiklere bağlı bulunan glikozidleri ve Őekerleri parçalamak amacıyla önce sey. HCl ile hidroliz iŐlemi yapıldı ve sonra etilasetat ile ekstraksiyon yapılarak GC lerinin alınabilmesi için apolar ve uçucu bileŐiėi haline dönüŐtürmek maksadıyla türevlendirme iŐlemi yapıldı. Bu amaçla izlenen yol arka taraftaki akıŐ Őemasındaki gibidir.



### 3.4. Toplam Fenolik Madde Tayini

Metot, suda ve diğerk organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifiyle alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 700 nm’de maksimum absorbans oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977). Sonuçların karşılaştırılması amacıyla standart fenolik bileşik olarak kateşin kullanılmıştır. Tayine başlamadan önce kateşinin 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039 ve 0,0195 mg/mL’lik konsantrasyonları hazırlandı. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri bulunarak standart grafik çizilmiştir. Standart grafiğe göre bitki ekstraktlarının da toplam fenolik madde miktarları mg/ml cinsinden hesaplanmıştır. Her bir numune değişen konsantrasyonlarda standart için uygulanan pipetleme işlemleri Tablo 4’de özetlenmiş olup absorbanslar 700 nm’de ölçülerek grafik çizilmiştir.

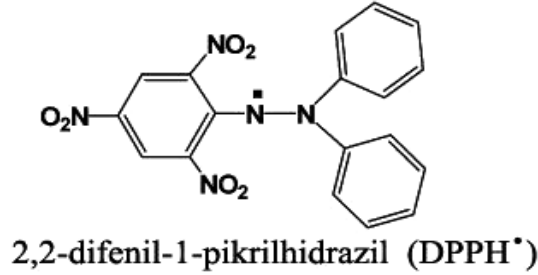
Tablo 4. Toplam polifenol tayininde yapılan pipetleme işlemleri

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Test</b>
Distile su	0.1 mL	-	-
Standart (değişik konsantrasyonlarda)	-	0.1 mL	-
Numune (değişik konst.)	-	-	0.1 mL
Distile su	5 mL	5 mL	5 mL
0.2 N Folin Reaktifi	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Tüpler vorteks ile karıştırıldı ve 3 dakika sonra			
%2 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
700 nm’de köre karşı absorbans okundu			

### 3.5. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH• radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Şekil.9) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm’de maksimum absorbans oluşturmaktadır (Yu vd. 2002). Antioksidanlarla muamele, DPPH• ’tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olacaktır. Farklı numune konsantrasyonuyla muamele edilen DPPH’ın absorbansındaki değişim ölçülerek absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilerek  $y=ax+b$  denkleminde DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı µg/mL cinsinden belirlenmekte ve IC<sub>50</sub> değeri olarak ifade

edilmektedir. Bu metodun önemli bir dezavantajı büyük antioksidan moleküllerin sterik engellenmeye maruz kalmaları nedeniyle inaktif olarak test edilmeleridir. Bu metoda antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilemektedir.



Şekil 9. DPPH radikalinin formülü

Çalışmada radikalın 150  $\mu\text{M}$ 'lik metanolik çözeltisini kullanıldı. Ekstraktlar değişik konsantrasyonlarda hazırlandı (0,0312, 0,0625, 0,125, 0,250, 0,500, 1,000 mg/ml). Eşit hacimde DPPH çözeltisi ve numuneler karıştırılıp oda sıcaklığında 50 dak inkübasyona bırakılmıştır (Tablo 5). Süre sonunda DPPH'nin maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okunmuştur. Kör olarak DPPH çözeltisi ve numunenin çözüldüğü çözelti kullanılmıştır. Bulunan absorbanslar ve karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek  $\text{IC}_{50}$  değerleri mg/ml cinsinden hesaplanmıştır (Yu vd., 2002)

Tablo 5. DPPH yöntemi için deney şartları

	<b>Kör</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Numune</b>
Numune (Değişik konsatrasyon)	750 $\mu\text{L}$	-	750 $\mu\text{L}$
Metanol (Destile)	750 $\mu\text{L}$	-	-
DPHH (150 $\mu\text{M}$ )	-	750 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$
Çözücü	-	750 $\mu\text{L}$	-

517 nm de absorbans okunur.

### 3.5.1. IC<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması

Ortamdaki mevcut radikalın ya da oksidan bileşiğin konsantrasyonunu yarıya düşüren numune konsantrasyonuna IC<sub>50</sub> değeri denir. IC<sub>50</sub> değeri ile antioksidan aktivite arasında ters orantı vardır. IC<sub>50</sub> değeri ne kadar düşükse antioksidan aktivite o kadar yüksektir. IC<sub>50</sub> değerlerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gereklidir. Bu nedenle çalışmalarımızda beş veya sekiz konsantrasyonda ölçüm yapılmıştır. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonları hazırlanıp; absorbans ölçümleri yapılır ve absorbanslar konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilir. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen konsantrasyon miktarı IC<sub>50</sub> değerini verir.

### 3.6. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

#### 3.6.1. Kloroform ve Metanol Ekstraktları İçin Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Bütün test mikroorganizmaları Refik Saydam'ın Hifzissihha Enstitüsün'den (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Bunlar; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 702 Roma, *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida tropicalis* ATCC 13803. Bütün yeni sentezlenmiş bileşikler tartıldı ve bu bileşikler 1 g/mL'lik ekstrakt stok çözeltileri hazırlamak için kloroform-DMSO karışımında çözüldü.

Maddelerin antimikrobiyal etkileri, çift seyreltme yöntemi kullanılarak ayrı ayrı kantitatif olarak test edildi ve en az inhibasyon konsantrasyonunda (MIC: Minimal Inhibition Concentration) miktarlar ( $\mu\text{g/mL}$ ) belirlendi. Antibakteriyel ve antifungal denemeler her biri ayrı ayrı Mueller-Hilton Broth (MH) (Difco, Detroit, MI), pH-7,3 ve tamponlanmış Alkollü Nitrojen bazında (Difco, Detroit, MI) pH-7,0'de yapıldı. MIC büyüme göstermeyen en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Test paralel yürütülür. Ampicillin ve fluconazole, ayrı ayrı standart antibakteriyel ve antifungal ilaçlar olarak kullanıldı. DMSO, kloroform ve kloroform: DMSO (9:1), 1:10 seyreltme ile kontrol çözeltisi olarak kullanıldı (Perez, 1990; Ahmad vd., 1998).

### 3.7. Uçucu Yağ Ekstraktları İçin Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Bütün test mikroorganizmaları Refik Saydam'ın Hifzissihha Enstitüsün'den (Ankara, Türkiye) temin edilmiştir. Bunlar; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* 702 Roma, *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida tropicalis* ATCC 13803. Bütün ekstraktlar tartıldı. 500 µg/mL'lik çözeltilerinin hazırlanması için bu ekstraktlar n-hekzanda çözüldüler.

Basit bir yöntem olan agar kuyucuk yöntemiyle duyarlılık tarama testi yapıldı. Her organizma Mueller Histon broth bekletildi ve birim/mL olacak şekilde, yaklaşık  $10^6$  koloniye seyreltildi. Bunlar MH ve Sabouraud Dextrose Agar yüzeyine yayıldılar ve sonra kurutuldular. 5 metre çapındaki kuyular steril mantar kesici kullanılarak agardan kesildi ve ekstrakt numunelerinin 100µL'si bu kuyulara dağıtıldı. Bu bitkiler 35 °C'de 18 saat süreyle inkübe edildi. Antimikrobiyal aktivite, bu test organizmalarına karşı inhibitör sınırı ölçülerek değerlendirildi. Cefprozil (Fortum 10µg) ve Triflucon (5µg) standart ilaçlardır. Aseton kontrol çözücü olarak kullanıldı. Bu testler paralel yürütülür. Sonuçlar inhibitör bölgesinin çapının durumuna göre değerlendirilir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Ekstrakt Miktarı ve Konsantrasyonları ile İlgili Bulgular

Anzer yaylasından toplanan bitkiye laboratuvarımızdaki bitki katalog numarasına göre A numarası verilmiş olup diğer harfler sap (S), yaprak (Y) ve çiçek (C) yi temsil etmektedir. Ayrıca metanolik (M) kloroform (K) ile temsil edilmektedir. Analize hazırlanan bitkinden alınan miktarlar ve elde edilen ekstrakt miktarları Tablo 6 da verilmiştir. Tabloya göre en fazla ekstrakt metanol ile yapılan ekstraksiyonda ele geçmiş olup bitkinin yaprak kısmında maksimumdur.

Tablo 6. Su buharı destilasyonu ve kloroform/metanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen madde miktarları

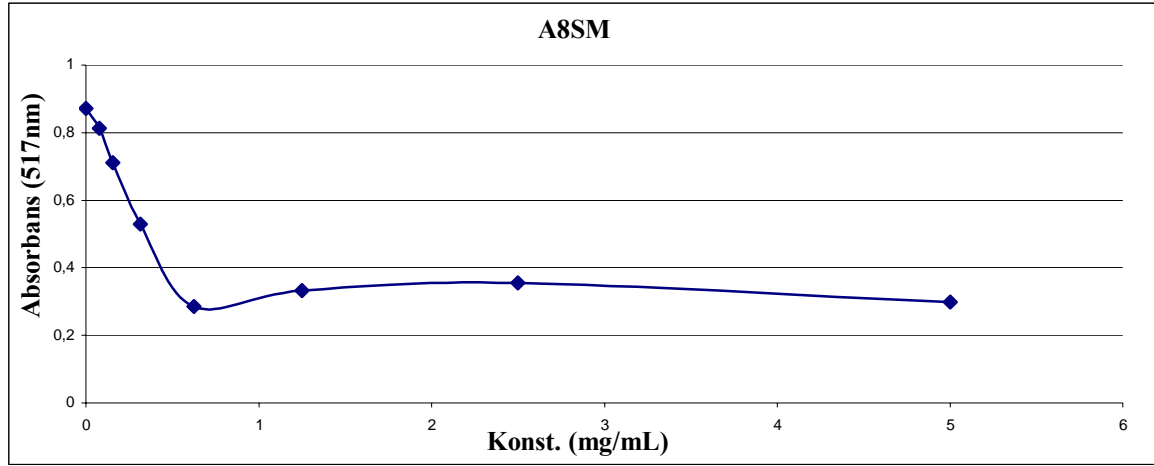
Ekstrakt	Alınan örnek miktarı (g)	Elde edilen madde miktarı (g)	% Ekstrakt	Ekstrakt konsantrasyonu	
				<i>CHCl<sub>3</sub></i> -DMSO	DMSO
A8SM	22,1698	5,8904	26,57	-	5,8904 g/25mL
A8YM	11,8607	4,7450	40,00	-	4,7450 g/100mL
A8CM	21,3378	7,0141	32,87	-	7,0141 g/100mL
A8SK	21,0573	0,3013	1,43	0,3013 g/100mL	-
A8YK	47,1614	1,8740	3,97	1,8740 g/100mL	-
A8CK	27,4004	0,9063	3,30	0,9063 g/100mL	-

### 4.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi ile ilgili Bulgular

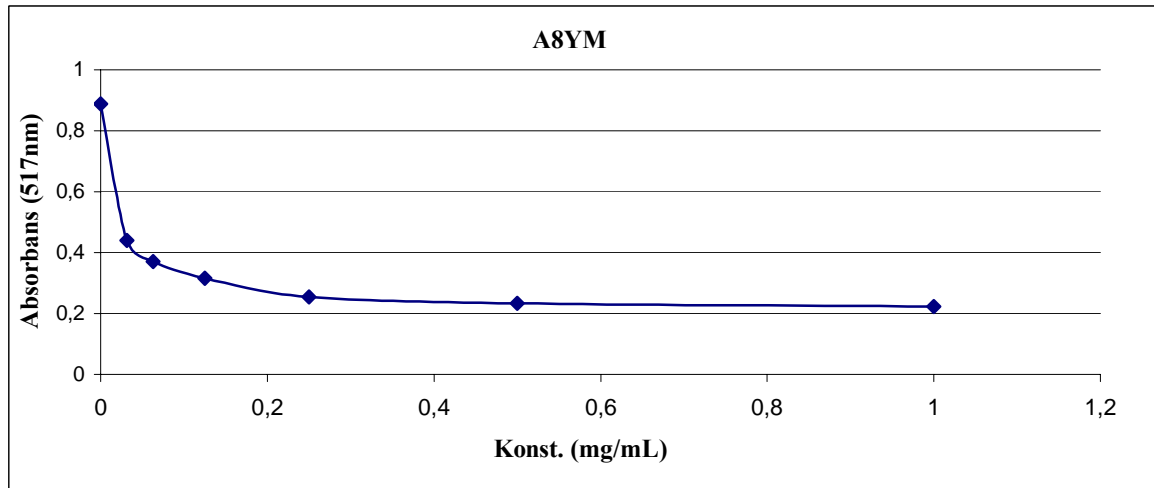
DPPH sulu veya metanolik çözeltilerde kararlı ve sentetik olarak üretilen ticari bir radikal olup lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Hazırlanan 150 µM'lik metanolik DPPH çözeltisi mor renklidir. DPPH çözeltisine eşit miktarda eklenen değişen konsantrasyonlardaki numune çözeltileri DPPH radikalini temizleyerek mor renk açılmaktadır. 517 nm'de absorbanslar okunarak konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir ve



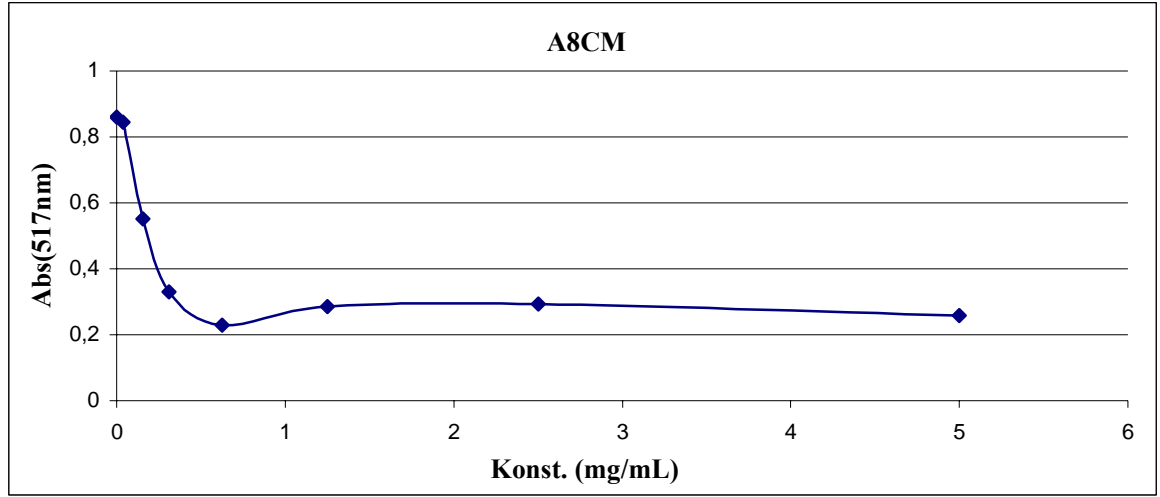
%50 DPPH miktarını inhibe eden madde miktarı ( $IC_{50}$ ) belirlenir.  $IC_{50}$  değerinin tespit edilmesi farklı numune konsantrasyonlarında bulunan deneysel sonuçlar grafiğe geçirildi. Şekil-10 dan Şekil 15 e kadar metanolik ve kloroformlu ekstraktlara ait grafik bilgileri verilirken Şekil 16-Şekil 18 da uçucu bileşenlere ait grafikler verilmektedir.



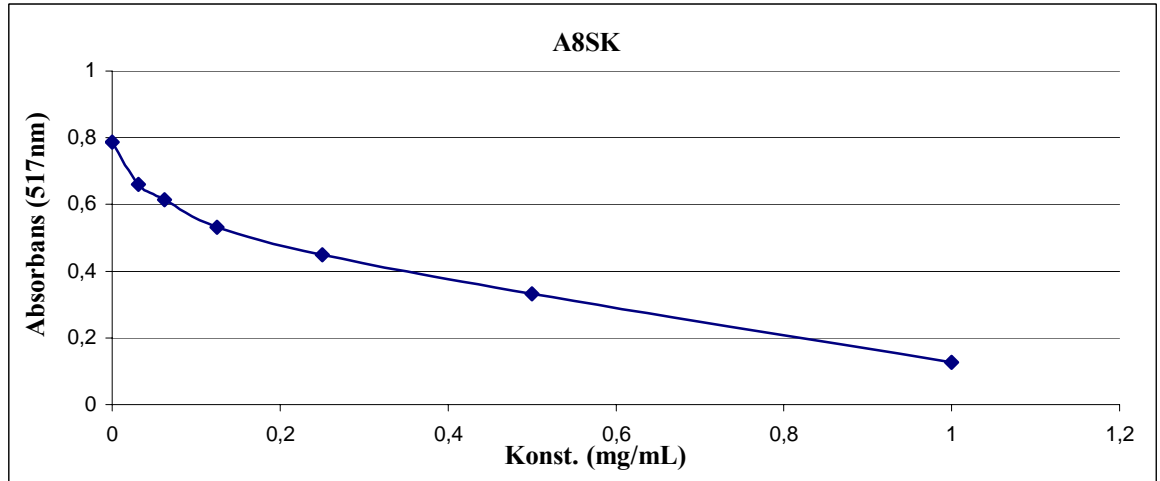
Şekil 10. Bitkinin sap kısmının metanolik (A8SM) ekstrakt'ının DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.422$ )



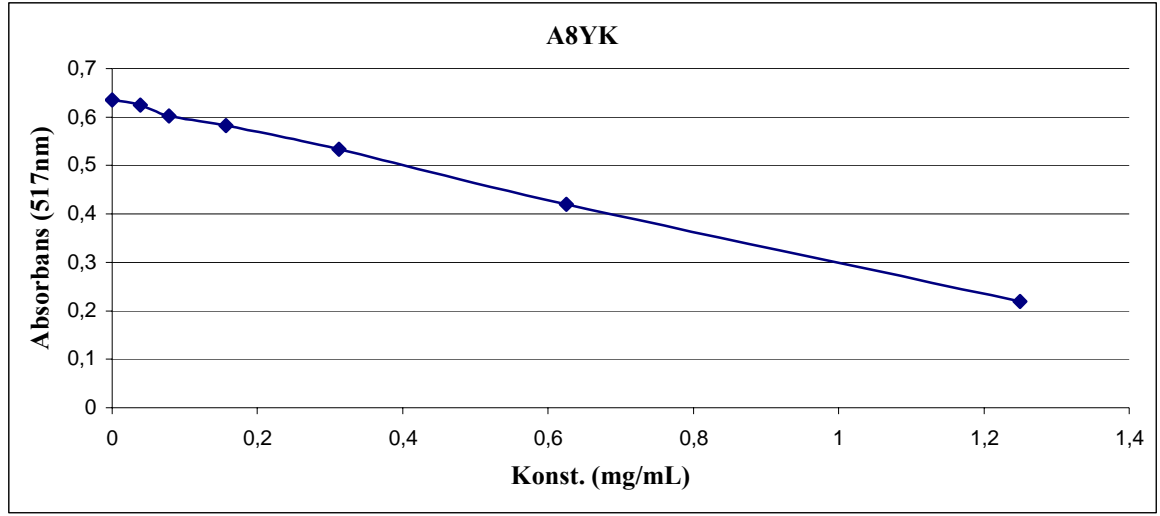
Şekil 11. Bitkinin yaprak kısmının metanolik (A8YM) ekstrakt'ının DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.029$ )



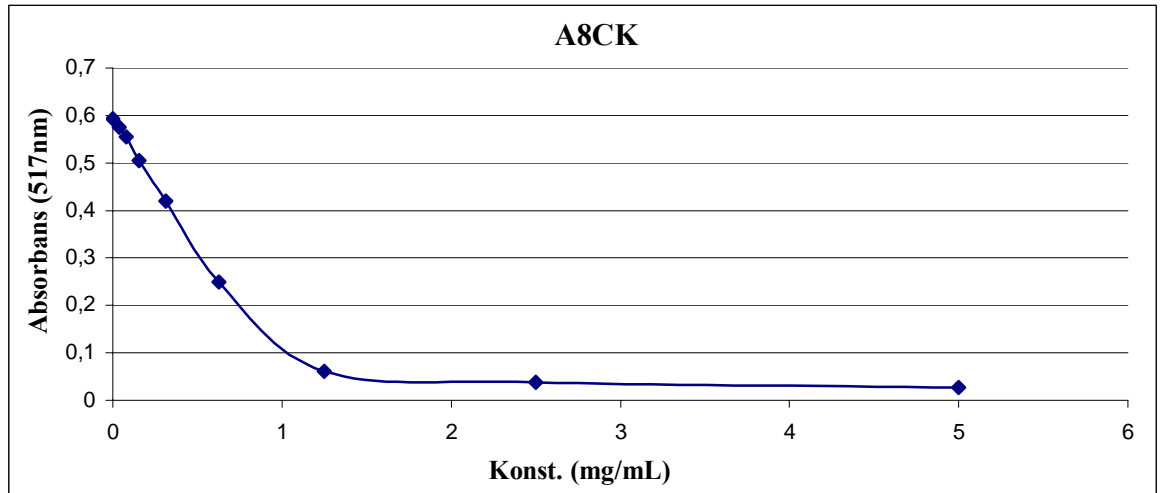
Şekil 12. Bitkinin çiçek kısmının metanolik (A8CM) ekstraktı'nın DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.222$ )



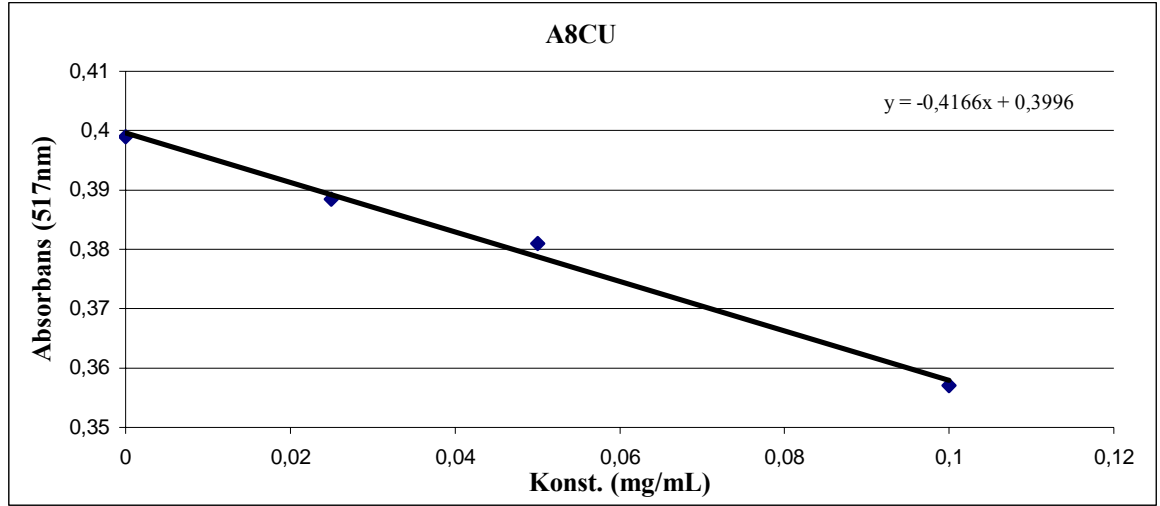
Şekil 13. Bitkinin sap kısmının kloroform (A8SK) ekstraktı'nın DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.117$ )



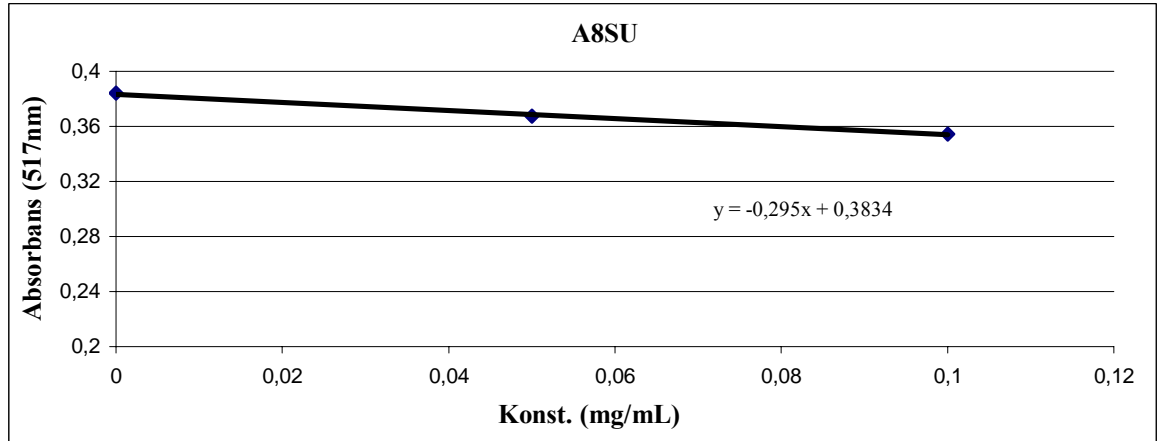
Şekil 14. Bitkinin yaprak kısmının kloroform (A8YK) ekstraktı'nın DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.652$ )



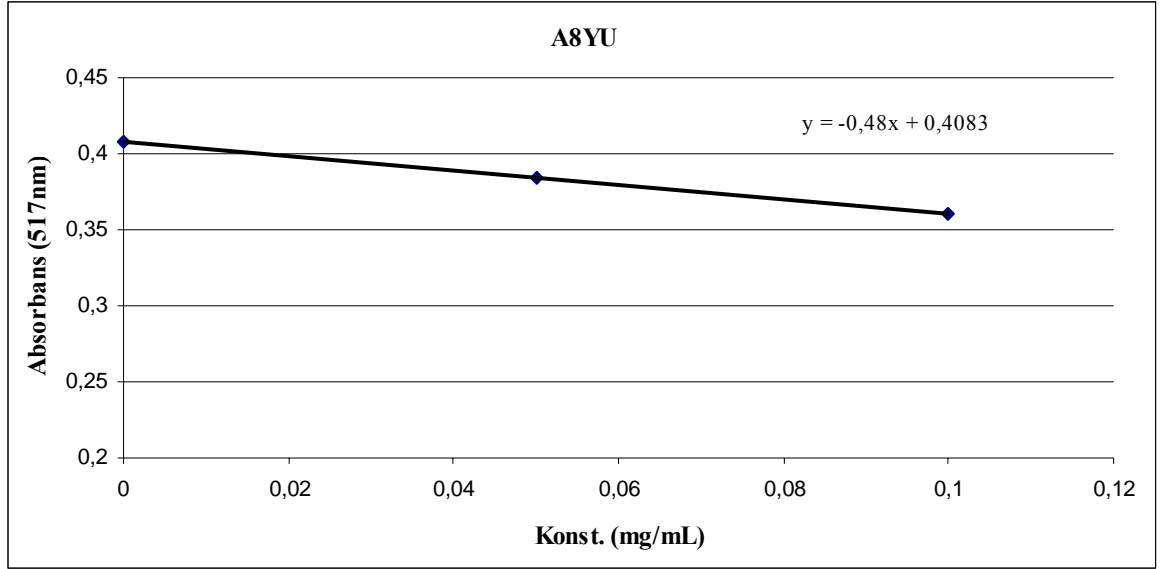
Şekil 15. Bitkinin çiçek kısmının kloroform (A8CK) ekstraktı'nın DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.512$ )



Şekil 16. Bitkinin çiçek kısmının uçucu (A8CU) ekstraktı'nın DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.48$  )

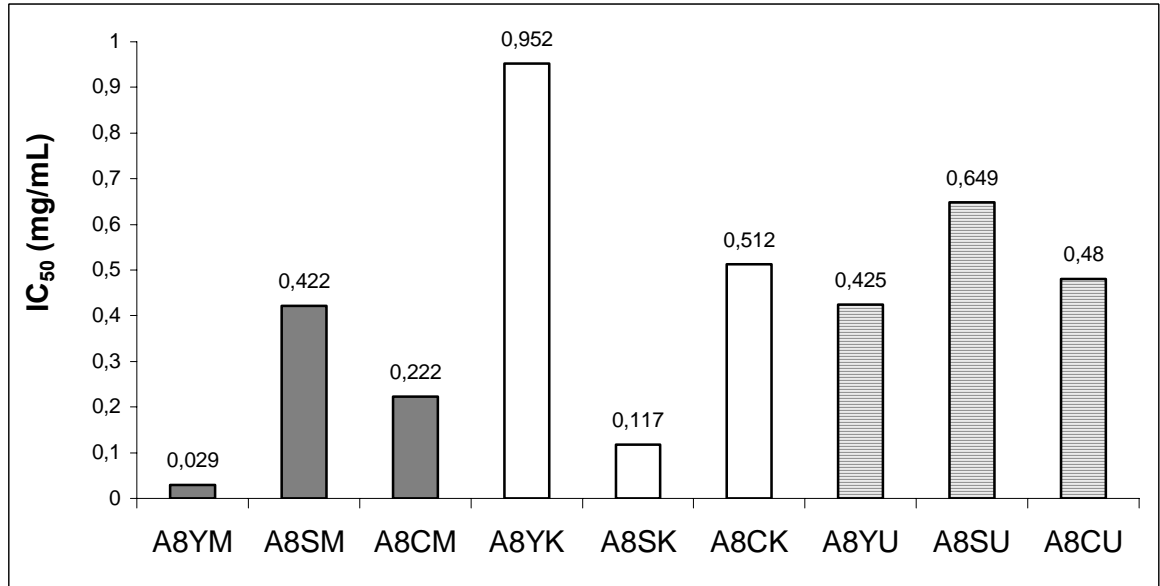


Şekil 17. Bitkinin sap kısmının uçucu (A8SU) ekstraktı'nın DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsantrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsantrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.649$ )



Şekil 18. Bitkinin yaprak kısmının uçucu (A8YU) ekstraktı'nın DPPH radikal temizleme aktivitesi. Grafik numune konsatrasyonu 517 nm'deki absorbansa karşı grafik çizilerek elde edildi, aktivite kontrolün maksimum absorbansını yarıya düşüren numune konsatrasyonu ( $IC_{50}$ ) olarak ifade edildi ( $IC_{50} = 0.42$ )

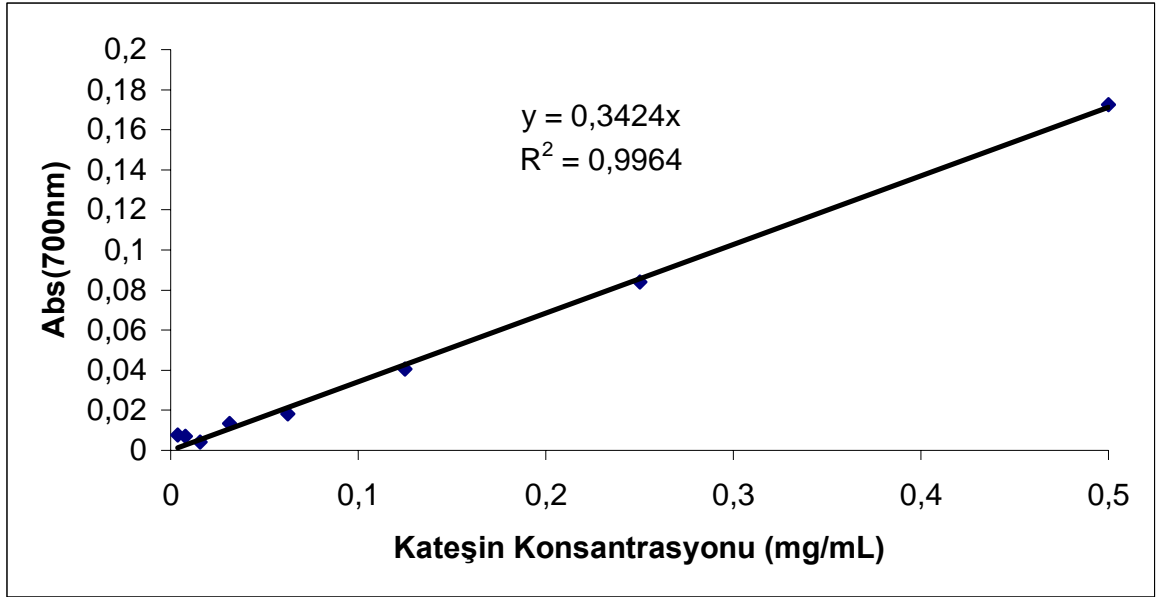
Grafikten ekstrapolasyon ile bulunan  $IC_{50}$  değerleri Şekil 19 de toplu halde verilmektedir. Buna göre en yüksek radikal temizleme yeteneğine sahip ekstrakt metanolik yaprak iken en düşük DPPH temizleme yeteneğine sahip Kloroformlu ekstraktlar bulundu.



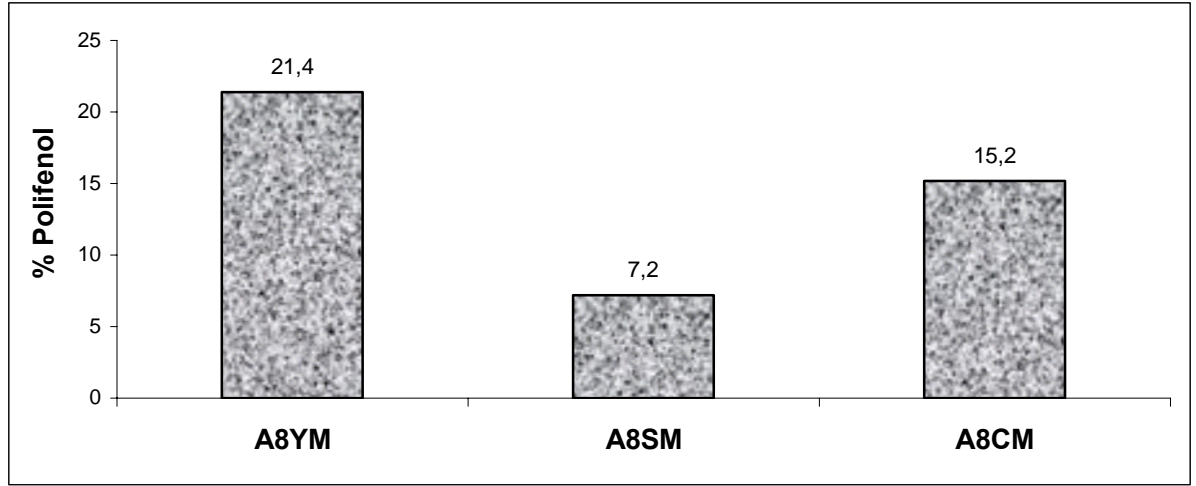
Şekil 19. *Anemone narcissiflora* bitkisinin metanollü, kloroformlu ve uçucu ekstraktlarının DPPH radikali temizleme aktiviteleri.

#### 4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı ile İlgili Bulgular

Hazırlanan ekstraktlara ilk önce gerekli olan seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra toplam fenolik madde miktarları kateşin standardına göre tayin edildi. 700 nm’de okunan absorbans değerleri y ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart çalışma grafiğinde absorbans konsantrasyonla doğru orantılı olup, elde edilen doğru denklemi  $y = ax + b$ ’ye göre belirlendi. Hazırlanan standart çalışma grafiği kullanılarak numunenin içerdiği mg cinsinden polifenol miktarı, 700 nm’de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlendi.



Şekil 20. Folin-Ciocalteu metoduna göre standart olarak kullanılan kateşinin farklı konsantrasyonlarda verdiği grafik.



Şekil 21. A8YM, A8SM ve A8CM'nin 700 nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenen % Polifenol miktarları.

#### 4.4. Antimikrobiyal Aktivite ile İlgili Bulgular

Tablo 7'de 9 farklı türden bakteri türüne karşılık metanolik ve kloroformlu ekstraktlara ait minimal inhibisyon konsantrasyonları (MIC) ve standart antibiyotiklerin MIC değerleri verilmektedir. Bu bakteri türlerinde *Bacillus cereus* hariç diğer tüm bakterilere metanolik ve kloroformlu ekstraktlar inhibisyon etkisi göstermektedir. Özellikle metanolik ekstraktların 8 farklı bakteri türü üzerindeki antibakteriyel etkisi kloroformlu ekstraktlardan daha yüksek bulundu.

Tablo 7. *A. narcissiflora* subsp. *narcissiflora* bitkisinin metanolik ve kloroformlu ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları

Numuneler	Mikroorganizmalar ve MIC değerleri (µg/mL)								
	Ec	Kp	Yp	Pa	Ef	Sa	Bc	Ca	Ct
Chl-Yaprak	50	50	50	100	25	50	-	100	100
Chl-Çiçek	25	25	25	100	25	-	-	100	100
Chl-Sap	50	50	100	100	25	25	-	100	100
MeOH-Yaprak	50	25	50	25	25	50	-	25	25
MeOH-Çiçek	50	25	50	25	50	-	-	50	50
MeOH-Sap	50	50	50	25	12.5	25	-	25	25
Ampisilin	8	32	>128	32	32	2	2	2	2

Ec: *Escherichia coli*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Sa: *Staphylococcus aureus* 3, Bc: *Bacillus cereus*, Ca: *Candida albicans*, Ct: *Candida tropicalis*.

(-): Aktivite yok (1 mg /ml); MeOH: Metanol ekstrakt; Chl: Kloroform ekstrakt.

Tablo 8’de 9 farklı bakteri türü üzerine uçucu bileşenlerin antibakteriyal etkileri verilmektedir. Uçucu bileşenler sadece *Bacillus cereus* üzerinde inhibisyon gerçekleştiren diğer bakterilere etki etmemişlerdir. Agar kuyucuk yönteminin uygulanması sonucu, değerlendirmeler inhibitör bölgesinin çapının durumuna göre hesaplandı.

Tablo 8. *A. narcissiflora* subsp. *narcissiflora* (500 µg/mL) bitkisinin uçucu bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitesi

Numune	Mikroorganizmalar ve inhibisyon çapları (mm)									
	Ec	Kp	Yp	Pa	Ef	Sa	Bc	Ca	Ct	
Çiçek	-	-	-	-	-	-	+	-		
Yaprak	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Sap	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Hekzan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ceftazidime (10 µg)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	
Triflucan (5 µg)	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	

İnhibisyon yarı çapları: (-): < 5.5 mm; (+): 5.5-10 mm; (++) : 11-15 mm; (+++): ≥ 16 mm. Ec: *Escherichia coli*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis*, Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Bc: *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*. Kontrol çözücüsü olarak hekzan kullanıldı.

#### 4.5. Antioksidan Aktivite ile ilgili Bulgular

Çalışmada antioksidan aktivite uçucu ve kloroformlu bileşiklerde sadece DPPH radikalini temizleme aktivitesi cinsinden incelenirken metanolik ekstraktlar da ayrıca fenolik madde miktarları da hesaplandı Elde edilen tüm bulgular tablo 9’da verilmektedir. Aktivite DPPH radikalinin % 50’sini inhibe eden madde miktarı cinsinden (IC<sub>50</sub>: µg/mL) hesaplandı. Buna göre Tüm ekstraktların DPPH radikal temizleme yeteneğine sahip olduğu bulundu. Metanolik yaprak ekstraktının fenolik madde miktarı oldukça yüksek ve buna paralel olarak DPPH radikali temizleme aktivitesi de yine en yüksek bulundu. Elde edilen aktiviteler standart antioksidanlar olan BHT ve Quercetin ile karşılaştırıldı. BHT suni bir antioksidan olup Quercetin bitkisel kaynaklı bir flavanoldür.



Tablo 9. *A. narcissiflora* subsp. *narcissiflora* nın DPPH· temizleme aktivitesi

	<u>DPPH· *</u> (IC <sub>50</sub> : µg/mL)	<u>Polifenol</u> (% in kuru ekstrakt)
EO-Yaprak	425±32.5	-
EO-Çiçek	480±45.3	-
EO-Sap	649±68.7	-
MeOH-Yaprak	29±6.4	21.4±6.4
MeOH-Çiçek	222±34.6	7.2±2.1
MeOH-Sap	422±70.2	15.2±4.3
Chl-Yaprak	952±121.5	-
Chl-Çiçek	512±57.6	-
Chl-Sap	117±17.8	-
BHT	9.8±0.4	-
Quercetin	2.5±0.2	-

\* Tüm denemeler 3 kez tekrar edilmiş olup sonuçlar ortalama ±SD olarak hesaplandı ve verildi.  
- : test edilmedi.

MeOH: Metanol ekstrakt; Chl: Kloroform ekstrakt; EO: Essential oil (uçucu bileşen)

#### 4.6. *Anemone narcissiflora* Bitkisinin Uçucu Bileşenlerinin Kimyasal Bileşimi ile İlgili Bulgular

Clevenger tipi su buharı destilasyonu ile elde edilen uçucu bileşenler 1.0 mL kadar hegzan ile cihazadan alındıktan sonra gaz kromatografisine direkt olarak enjekte edildi. Elde edilen veriler RT (retention time) değeri cinsinden kolondan bileşenlerin ayrılma zamanları cinsinden olup standart alkan karışımı kullanılarak aynı şartlarda cihazdan elusyon zamanlarına göre grafik edilerek Retantion indeks değerleri elde edildi. Elde edilen RI değerleri literatürde daha önce HP-5 kolonu ile tespit edilen değerlere göre araştırıldı ve referansları tablonun en sağ sütununa verildi. Tablodaki % alan ise bir bileşenden bitkide bulunan % değeri göstermekte olup bu değer pik yüksekliğinden yine ekstrapole edilerek elde edilmiştir. Elde edilen değerler Tablo 10'da verilmektedir. 53 tane madde bitkinin üç ayrı kısmından tespit edilmiştir. Elde edilen bileşenleri GC'nin MS kütüphanesi ile sırasıyla çiçek kısmının 58.4, 71 ve 85.5 lik kısmı aydınlatılabildi. Geri kalan kısmı bilinmeyenleri ifade etmektedir. Bu bileşenlerin çoğunluğunu yağ asitleri ve mono ve sesquiterpen'ler oluşturmaktadır.

Tablo 10. *A. narcissiflora subsp. Narcissiflora* 'nın temel bileşenleri

Bileşenler*	RI**	Çiçek %Alan	Sap %Alan	Yaprak %Alan	Kaynak
<i>p</i> -Ksilen	865	1.4	-	-	a
3-Furanmetanol	905	1.5	-	-	e
Metoksifenil oksim	931	8.3	-	-	e
$\alpha$ -Pinen	941	2.6	2.1	-	a
Verbenene	960	2.1	-	1.4	a
Benzaldehit	962	-	-	0.2	d
3-Furil metil asetat	1011	-	-	1.4	e
2-Etil hekzanol	1035	-	2.2	0.5	e
Limone	1036	-	-	4.9	l
Octilin	1067	-	1.1	-	e
Linalool	1096	-	3.3	-	b
Borneol	1157	4.1	-	-	b
Bilinmyen <sup>1</sup>	1172	-	2.6	-	
$\alpha$ -Terpineol	1188	-	3.4	1.2	d
Nonanoic asit	1274	-	1.1	-	e
Bilinmeyeyen <sup>2</sup>	1304	10.3	-	-	
$\beta$ -Pinen	1306	-	-	2.1	c
2,4 decadienal	1316	-	1.2	-	e
$\alpha$ -Copaene	1379	-	-	2.4	d
Damascenone	1385	-	1.1	0.4	e
Isovanilin	1397	5.5	-	0.1	e
$\beta$ -Elemene	1399	3.8	-	-	l
$\beta$ -Caryofilen	1424	2.1	-	1.4	m
Aromadendrene	1445	3.6	-	1.8	d
$\alpha$ -Humulene	1472	1.4	-	-	l
Germacrene-d	1482	-	1.2	1.6	a
Cyclodecene	1526	-	-	1.0	e
2-Butenedioik asit	1539	-	1.1	-	e
Longiborneol	1597	-	2.5	-	b
$\alpha$ -Cadinol	1644	2.2	-	-	b
$\beta$ -Eudesmol	1652	1.6	1.8	1.5	m
( <i>cis</i> )-2-Nonadecene	1693	-	3.2	-	e
$\alpha$ -Muurolol	1698	-	-	1.4	n
7-Tetradecene	1737	-	-	1.9	e
Tridecanol	1737	-	4.4	-	e
Octadecane	1800	-	2.1	-	e
Pentadecanoic acid	1847	2.2	4.7	1.9	e
Isobutyl phthalate	1869	-	-	0.9	e
Pinane	1882	2.1	-	1.0	e
2-Formylhexadecane	1915	-	-	1.1	e
Hekzadehanoik asit	1928	1.7	15.5	-	e
Isopitol	1949	-	-	2.4	e
Tetradecanoic asit	1949	-	5.3	-	e
Dibutyl phthalate	1963	-	2.9	0.4	e
Phytol	2112	-	-	2.1	e
Behenic alcohol	2225	-	-	0.5	e
Lanol S	2289	1.9	-	1.2	e
Dehidroabietal	2260	-	3.6	0.9	b
Cyclotetradecane	2290	-	1.5	-	e
Bilinmeyeyen <sup>3</sup>	2391	-	-	3.9	
Di-(2-ethylhexyl) fitalat	2550	-	1.2	-	e
Erucylamide	2779	-	1.9	-	e
Stigmastan-3,5-dien	3078	-	-	8.0	e
Toplam		58.4	71.0	85.5	

Bilinmeyen	RI	m/z (%)	Çiçek	Sap	Yaprak
Bil-1	1172	180(36), 137(88), 124(100), 109(14), 81(22), 55(65)	-	2.6	-
Bil-2	1304	429(60), 341(100), 325(32), 207(36), 73(85), 57(46)	10.3	-	-
Bil-3	2391	239(86), 109(15), 98(38), 81(100), 71(36), 57(50)	-	-	3.9

\*\* Kovats Index : HP-5 kolonu ile n-alkanlar yürütülerek elde edilen indis.

e : Wiley and NIST kütle spektral kütüphaneleri

a: Yayli vd., 2005, b: Adams, 1995, c: Ricci, 2005, d: Sacchetti vd., 2005, k: Duru vd., 2003,

l:Gauvin, vd., 2004, m: Flamini, cd., 2003, n: Tepe vd. 2005.

#### 4.7. *Anemone narcissiflora* Bitkisinin Metanolik Fraksiyonunun Kimyasal Bileşimi ile İlgili Bulgular

Metabolik ekstraktlar polar bileşenler olduklarından önce uçucu bileşenleri haline getirildi ve HP-5 kolona verildi. Elde edilen elusyonlar yine RI değerlerine dönüştürülüp tayin edildi. Elde edilen bileşenler üç sınıf altında toplandı. Bulunan değerler Tablo 11 de verilmektedir. Bu polar yapıli bileşenler yağ asitleri, fenolik asitler ve şekerlerdi. Yağ asitlerinden en fazla (%16) hegzadekanoik bulundu.

Tablo 11. *A. narcissiflora* subsp. *Narcissiflora*'nın metanolik kısmının temel bileşenleri

Bileşenler <sup>*, a</sup>	RI <sup>**</sup>	Çiçek %Alan	Sap %Alan	Yaprak %Alan
<b>Yağ asitleri</b>				
Propanoik asit	1050	0.2	1.8	0.4
Pentanoik asit	1104	-	-	0.8
Octanoik asit	1269	-	0.2	0.2
Butanedioik asit	1324	1.0	0.9	0.7
Decanoik asit	1463	-	0.2	-
Palmitik asit	2052	7.3	-	-
Hekzadekanoik asit	2053	16.7	18.0	5.9
<i>trans</i> -9-Octadecenoik asit	2222	-	-	1.0
$\alpha$ -Linolenik asit	2223	6.8	2.1	-
11- <i>cis</i> -Octadecenoik asit	2224	-	2.1	-
Oleik asit	2230	-	0.3	-
Stearic asit	2249	0.6	-	-
Octadecanoic asit	2250	0.4	1.5	0.7
<b>Fenolik asitler</b>				
Limonene	1348	-	-	0.4
<i>p</i> -hydroxybenzoic asit	1575	5.6	0.5	2.3
Suberic asit	1710	0.4	0.8	2.2.
Hydrocinnamic asit	1769	0.2	-	-
Isovanillic asit	1776	-	-	0.6
<i>p</i> -coumaric asit	1798	5.2	3.4	2.6
Azelaic asit	1808	0.3	1.4	2.5
Sebacic asit	1905	-	-	0.4
Vanilacetic asit	1906	0.1	-	-
Ferulic asit	1934	0.8	2.3	0.6
Cinnamic asit	1935	0.1	2.1	1.7
Caffeic asit	2001	4.9	-	-

<b>Şekerler</b>				
Levoglucosan	1731	1.8	-	-
D-Sorbitol	1980	0.1	-	-
Glusitol	1981	-	1.7	1.8
D-Glukose	2029	0.4	-	-
$\alpha$ -D-Galactopiranoz	2030	-	0.4	-

<sup>a</sup> Tüm bileşikler Trimetilsilil Ester ile türevlendirildi (TMSE).

\*\* Wiley and NIST kütüphanesi kullanılarak adlandırılma yapıldı.

#### 4.8. *Anemone narcissiflora* Bitkisinin Kloroformlu Bileşenlerinin Kimyasal Bileşimi ile İlgili Bulgular

Kloroformlu ekstraktlar yine apolar bileşenlerden ibaret olup hiç bir türevlendirme yapılmaksızın kolona verildi. Elde edilen değerler yine RI değerlerine aklanlar referans alınarak dönüştürüldü ve bulunan bileşenler tablo 12’de verilmektedir.

Tablo 12. *A. narcissiflora* subsp. *Narcissiflora*’nın temel kloroformlu bileşenleri

Bileşikler*	RI**	Çiçek %Alan	Sap %Alan	Yaprak %Alan
Fenil etil alkol	1087	0.1	-	-
Metiletilmalenimid	1222	-	0.3	-
Benzen asetik asit	1258	0.2	-	-
<i>p</i> -Vinilguaiakol	1313	-	0.4	1.6
2-Methoxy-4-vinilfenol	1313	0.2	1.1	-
<i>p</i> -Metilofenol	1349	-	-	2.7
2-(4-Metoksifenil) etanol	1369	0.3	-	-
Izovanilin	1397	-	0.4	-
Niazinamid	1401	0.2	-	-
Benzoik asit	1530	0.4	-	-
Etil vanilate	1567	-	0.4	-
$\gamma$ -Terpine	1576	0.2	-	-
2,5-Dimetilbezoik asit	1629	0.2	-	-
4-Methoksi stilben	1747	0.1	-	-
Myristik asit	1764	-	0.5	-
Tetradecanoik asit	1765	0.4	0.8	-
Loliolid	1766	-	-	2.3
Ethyl vanillate	1811	-	0.1	-
Neophytadiene	1841	-	-	3.2
Pentadecanoik asit	1864	0.3	0.6	-
Ferulic asit	1871	-	0.4	-
<i>n</i> -Hexadecanoic asit	1972	9	19	2.9
Palmitic asit	1972	-	1.2	-
Stearic asit	1995	-	0.9	-
Heptadecanoic asit	2065	0.2	0.5	-
Didecyl sebacate	2101	-	-	2.1
Phytol	2114	2.7	-	1.4
Linoleik asit	2138	1.7	2.1	-
Octadecanoik acid	2167	0.3	0.8	-
Palmitamide	2183	-	-	1.9
Muscalure	2275	0.9	-	-
1-Octadecene	2288	1.2	0.7	-
Stearyl alkol	2288	-	1.8	-

Tablo 12'nin devamı				
9-Octadecenamide	2361	-	-	1.9
Stigmasta-5,22-dien-3-ol	2376	8.0	-	-
2-Methyl-Z,Z-3,13-octadecadienol	2455	1.0	-	-
7,10,13-Hekzadekatrienoik asit	2479	1.8	-	-
Stearyl alkol	2493	-	1.3	-
Stenol	2495	2.9	-	-
$\alpha$ -Monopalmitin	2509	-	-	9.0
Palmitik asit gliserol ester	2510	-	4.1	-
2-Monopalmitin	2511	4.2	-	-
Sisteaminesulfonyk asit	2512	-	-	1.0
2-Octyl ciklopropane oktanal	2534	-	0.4	-
Octoil	2549	-	-	2.0
Diisooctilfitalaldehit	2552	1.6	-	-
2-Methyl-Z,Z-3,13-oktadekadienol	2567	0.5	-	-
9-Oktadekenoik asit	2580	0.7	-	-
$\gamma$ -Sitosterol	2658	12.1	-	-
Ethylcholest-5-en	2651	4.7	-	-
S-sulfo-sisteamine	2655	-	1.1	-
2-Methyl-octadecadienol	2679	1.0	-	-
Cholesta-4,6-dien-3-ol, 6-fluoro karboksi asit	2876	-	-	1.5
Stigmastan-3,5-dien	3078	5.8	3.0	5.5
Ergosta-4,6,22-trien-3.beta.-ol	3079	-	1.2	-
Clionasterol	3080	-	2.6	1.9
Vitamin E	3111	2.5	-	-
Campestrol	3204	1.8	8.2	1.0
Total	-	67.2	53.9	41.9

\*\* Wiley and NIST kütüphanesi kullanılarak adlandırılma yapıldı.

## 5.TARTIŞMA

Türkiye farklı iklimlere, coğrafik konuma, ekolojik faktörlere ve Asya, Avrupa ve Afrika arasında bir geçit olmasına dayanan özelliklerinden dolayı biyolojik kaynakları bakımından en zengin ülkelerden biridir. Bundan dolayı, çiçek çeşitliliği 11000'den 3700'ü yöresel olan geniş bir tür seçeneği sağlamaktadır (Şener, 2002). Bu amaçla oldukça zengin bitki örtüsüne sahip Doğu Karadeniz bölgesinin Rize-İkizdere Anzer yaylasından 2004-Haziran ayında toplanan bitkinin yaş iken zehirli olduğu ancak kurutulmuş yapraklarının ilaç olarak kullanıldığı literatürde bildirilmiştir (Davis,1965; Davis, 1988) ). Kurutulan bitkinin sap, yaprak ve çiçek kısımlarından soxhlet sistemi ile metanolik ve kloroformlu ekstraktlar elde edildikten sonra çözücü uçurulup kuru ekstraktlar DMSO ve DMSO-kloroform (9:1) karışımında çözüldü. Bitkinin uçucu bileşenleri Clevenger sisteminde su buharı destilasyonu ile elde edildi. Kloroformlu ve uçucu bileşenleri doğrudan GC-MS analizi yapılarak belirlendi. Metanolik ekstraktlar ise 2N HCl ile hidroliz edildikten sonra farklı pH'da (3, 7, 10) etil asetat ile ekstrakte edildikten sonra piridinde çözüldürüp MSTFA + %1 TMCS reaktifleri ile türevlendirildi ve GC-MS analizi yapıldı. Çalışmada türevlendirme reaktifi olarak sililasyon yapabilen ve apolar ve uçucu hale dönüştürebilen reaktifler (MSTFA + %1 TMCS ) kullanıldı. Daha çok trimetilsilil türevi bileşikler elde edilmiş olup kromatogramda türevsiz hallerinin adları alındı.

*Anemone narcissiflora* bitkisinin üç ayrı fraksiyonun yaprak, çiçek ve sap kısımlarının GC-MS analizi yapıldı. Su buharı tipi destilasyon ile elde edilen uçucu bileşenlerinin analizinde en fazla bileşenin yaprak kısmında olduğu ve bu kısmın % 74 oranında aydınlatıldığı, sap kısmında nispeten daha az sayıda bileşen olduğu bulundu. Uçucu bileşiklerin daha çok monoterpen ve seskoterpen türü bileşiklerce zengin olduğu bulundu.

*A. narcissiflora* bitkisinin kloroformlu ekstraktının daha çok yağ asitlerince zengin olduğu bulundu. Nispeten apolar bir çözücü olan kloroform lipitler için iyi bir çözücüdür. Dolayısıyla lipid fraksiyonu çözdüğünden dolayı bu fraksiyon yağ asitleri fraksiyonu olarak elde edildi. Bu fraksiyon apolar yapısından dolayı türevlendirmeye gerek kalmadan direkt olarak GC –MS verildi. Metanolik fraksiyon ise yağ asitleri, fenolik asitler ve şekerlerden oluşan üç ayrı bileşik sınıfı halinde elde edilmiş olup kafeik asit, sinamik asit gibi antioksidanca zengin ikincil metabolit ürünlerini içermektedir.

Oksidasyonu durduran veya geciktiren ajanlar olan antioksidanlar üzerine yapılan çalışmalar son 20 yılda bir hayli ilerlemiştir. Reaktif oksijen türlerine karşı bitkilerde savunma mekanizmasında rol alan bileşikler, daha çok fenolik yapıda bulunurlar (Rice-Evans vd., 1997). Antioksidan kapasitenin ölçümünde pek çok farklı metot kullanılmaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri; hidrojen verici, singlet oksijen tutucu, metal iyonlarını bağlayıcı (şelat oluşturma),  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ , ve  $OH^{\cdot}$  gibi radikalleri dismutasyona uğraticı gibi farklı mekanizmalardan ileri gelmektedir. Toplam fenolik madde miktarının ölçümünde kullanılan Folin reaktifi ile renkli kompleks oluşturmaya dayanan toplam fenolik (polifenol ve flavanoidler) madde tayini sadece metanolik ekstraktlara uygulandı. Sulu ortam reaksiyonu olduğu için folin reaktifi sadece sulu ortamda fenolik maddelerle renkli kompleks oluşturmaktadır. Bundan dolayı çalışmada sadece metanolik ekstraktların toplam fenolik madde miktarları tayin edildi. *Anemone narcissiflora*'nın özellikle yaprak kısımlarında yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu bulundu. Bitkinin çiçek kısmından iki kat fazla fenolik madde yapraklarında tesbit edildi.

Metanolik ekstraktların GC-MS değerleri bileşenler üç sınıf altında toplandı. Daha çok polar yapılı bileşikler olan fenolik asitlerden *p*-hidroksibenzoik asit ve kumarik asit zengin bir kısım ile şekerlerden Levoglucosan adı verilen bir seker bulundu..Yağ asitlerinden en fazla (%16) hegzadekanoik bulundu. Kloforomlu ekstraktlar türevlendirme yapılmaksızın GC-MS kromatogramları alındı. Kloforomlu ekstraktların yağ asitlerince zengin olduğu özellikle de *n*-Hekzadekanoik asit bakımından zengin olduğu bulundu.Çalışmada ilgi çeken bir başka özellikte Hekzadekanoik asit in hem kloroformlu hem de metanolik ekstraktlarda bulunması idi. Bu yağ asidi her iki çözücü tarafından da ekstrakte edilebildi.

DPPH sulu, etanolik veya metanolik ortamlarda bozunmadan kalabilen sentetik orijinli ve satın alınabilen tek serbest radikaldir. Tüm serbest radikaller lipit peroksidasyonunun başlamasına neden olabilirler. DPPH radikali temizleme aktivite metodu hem sulu hem de susuz ortamlarda çalışmalara çok uygun olabilen bir radikal olduğu için çalışmada özellikle tercih edilmiştir. Metanolik ekstraktlar için ortama çözücü olarak metanol ilave edilirken kloroformlu ekstraktlar için ise ortama kloroform ilave edilmiştir. Her iki ortamda da çözülebilen bir radikal olması kullanımını artırmaktadır. Çalışmada DPPH radikalının % 50'sini bozunduran ya da temizleyen ekstrakt miktarı olarak bulunun  $IC_{50}$  değeri ne kadar yüksek olursa aktivite o kadar düşük demektir. Buna göre en yüksek DPPH aktivitesine sahip bölge yine yaprak kısmıdır. Bunun sebebi

yapraklarda yüksek fenolik madde miktardan dolayı DPPH radikali temizleme aktivitesinin artmış olabileceğidir. Nitekim literatüre baktığımızda yüksek fenolik madde miktarına sahip ekstrakt'ının yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterilmektedir (Kolaylı vd. 2004 ; Küçük, vd. 2007).

Bitkinin biyolojik aktivitesi olarak ayrıca antibakteriyal özellikleri incelendi. Metanolik ve kloroformlu ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri 9 farklı suş olan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* suşları üzerinde denendi ve bulunan aktiviteler minimum inhibitör konsantrasyon (MIC, µg/mL) cinsinden tayin edildi. Metanolik ve kloroformlu ekstraktların *Bacillus cereus* hariç diğer tüm bakterilere karşı değişen MIC değerlerinde aktivite gösterdikleri tespit edildi. Uçucu bileşiklerden oluşan ekstraktların ise sadece *B. cereus* bakterisine karşı etkili olurken diğer bakterilere etkili olmadığı bulundu. Çalışmada yakaladığımız ilginç bir özellik de metanolik ve kloroformlu ekstraktların etki etmediği bakteri olan *B. cereus* sadece esansiyel olarak adlandırdığımız uçucu bileşenler tarafından inhibisyona uğramaktadırlar. Bitkinin bütünlüğü açısından önemli bir kriter teşkil ediyor. *B. cereus* sporlu gram pozitif mikroorganizma olup gıda kaynaklı enfeksiyon etkenlerinden biridir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

*A.narcissiflora* bitkisinin kloroform, metanol ve su buharı destilasyonu ile elde edilen üç ayrı fraksiyonunun bileşimi GC-MS ile aydınlatıldı. Bitkinin sap, yaprak ve çiçek kısımlarından elde edilen üç ayrı polariteye sahip ekstraktların biyolojik aktiviteleri incelendi. Biyolojik aktivite olarak antioksidan aktivitesi ve antimikrobiyal aktiviteleri incelendi. DPPH radikal temizleme aktivitesi yönünden metanolik ekstraktların oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu özeklikle yaprak ve çiçek kısımlarının serbest radikal temizleme yönünden daha etkili olduğu ve buna paralel olarak bu kısımları daha yüksek polifenol içeriğine sahip olduğu bulundu. Ayrıca her üç ayrı polariteye sahip bitkinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ancak uçucu bileşenlerin sadece *Basilleus cereus* üzerine etkili olduğu ve diğer ekstraktların *B. cereus* hariç kullanılan 8 bakteriye etkili olduğu bulundu.

Sonuç olarak *Anemone narcissiflora* subsp. *narcissiflora* bitkisinin kimyasal içerik yönünden ve *in vitro* çalışmalarda özellikle yaprak kısımlarının biyolojik etkinlik yönünden ve antikanserojen potansiyele sahip olduğu tespit edildi.

Çalışmanın antioksidan aktivite olarak tek metot kullanıldı, DPPH radikal temizleme aktivitesi. Bunun dışında başka metoduna göre değil de başka serbest radikaller üzerinde (süperoksit, peroksinitril, hidroksil gibi) denenebilir. Bu da kullanılan metotların modifiye edilerek apolar fraksiyonlara uygulanması ile gerçekleştirilebilir.

Bu çalışmanın devamında ekstraktlardaki ve esansiyel yağlardaki biyolojik aktif bileşenler ayrı ayrı belirlenme yoluna gidilmeli ve canlı denemeleri yapılmalıdır. Bulunabilecek maddeler ya da madde karışımları belki de 10-20 yıl sonrasının değerli ve ucuz antibiyotiklerinden biri olacaklardır. Ayrıca diyetle bu bitkinin tüketilebildiğinin kesin teyit edilmesini takiben halk arasında tüketilmesi tavsiye edilmelidir.

Bitkinin antioksidan etkili bileşenlerini tespit etmek için standart maddeler kullanarak HPLC ile tayinler yapılabilir. Ayrıca Clevenger sistemi yerine Head Space denen sistem ile uçucu bileşenleri daha yüksek verimde tayin edilebilirdi, ancak bu cihazlar elimizde olmadığı için sadece GC-MS ile aydınlatma yapıldı. Ayrıca bitkiden hazırlanan sulu ekstraktların kimyasal ve biyolojik yönünün incelenmesi insan beslenmesi açısından daha yararlı olabilirdi.

## 7. KAYNAKLAR

- Adams PR., 1995. Identification of essential oil components by gas chromatographyhy-Mass Spectroscopy, Allured Publishing, Carol, Stream IL, USA.
- Ahmad, I., Mehmood, Z.ve Mohammed, F., 1998. Screening of Some Indian Medicinal Plants for Their Antimicrobial Properties, Journal of Ethnopharmacology, 62 183-193.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza yayınları, Konya, 4-65.
- Amoros, M., Sauvager, L. ve Cornier, M., 1992. *In vitro* Antiviral Activity of Propolis. Apidologie, 23 231-240.
- Baugh, P., 1993. Gas Chromatography: A practical approach, Oxford University Press.
- Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Baytop, T., 2001. Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present),1st Ed. Istanbul University, 178-249, İstanbul.
- Bravo, L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism And Nutritional Significance, Nutrition Review, 56 (11) 317-333.
- Brooks, G. F., Butel J. S. ve Morse S. A., A, 1998. Medical Book. Jawetz, Melnick and Adelberg’s Medical Microbiology. Twenty-first edition. A Simon & Scuster Comp., Stamford, 218, 253.
- Bleul U., Bühler, K., Stephan R., Pospischil A. ve Braun U., 2002. Mastitis Caused By Yersinia Pseudotuberculosis In A Cow. The veterinary Record, 151 ,24 767-769.10-80.
- Cotton, C. M., 1999. Ethnobotany, Principles and Applications, John Wiley and Sons, England.
- Cowan, M. M., 1999. Plant Products As Antimicrobial Agents, Clinical Microbiological Review, 12, 4 564-582.
- Davis, P. H, Coode, M. J.ve Cullens, J., *Anemone* L. (Ranunculaceae), 1965. In : Davis, P.H. (ed.) Flora of Turkey and The East Aegean Islands, vol.(1), Edinburgh University Press, Edinburgh; 134.
- Davis, P. H., 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. (10). Edinburgh University Pres, Edinburgh.

- Edge, R., Mc Garvey, D.J., Truscott, T.G., 1997. The Carotenoids as Antioxidants-a Review, J. Photochem Photobiol. B, 41 189-200.
- Gauvin A, Ravaomanarivo H ve Smadja J., 2004. J. Chromatogr. A , 1029 279-282.
- Guliyev, V.ve Harmandar, M., 2000. Flavonoidler. Aktif Yayınevi. İstanbul.
- Chen, L.H., Boissonneault, G.A. ve Glauert, H. P., 1988. Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Research, 8, 739-748.
- Cowan, M. M., 1999. Plants Products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol.Rev., 12, 4 564-582.
- Halliwell, B., Gutteridge J. M. ve Cross, E.C., 1992. Free Radical, Antioxidants, And Human Disease: Where are we now? Journal of Laboratory and Clinical Medicine 119, 6 598-620.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Fujita, Y., Yasuraha, T., Yoshida, T. ve Okuda, T., 1989. Effects Of The Interaction Of Tannins With Co-Existing Substances, VI. Effects Of Tannins And Related Polyphenols On Superoxide Anion Radical And On 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radical, Chem. Pharm. Bull., 377 2016-2021.
- Havsteen, B. H., 2002. The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids. Pharmacology and Therapeutics, 96 67-202.
- Hausteen, B. H., 2002. The Biochemistry And Medical Significance Of The Flavonoids, Pharmacol. Exp. Ther., 96 67-202.
- Flamini G, Cioni PL ve Morelli I., 2003. Differences In The Fragrances of Pollen, Leaves, and Floral Parts of Garland (*Chrysanthemum Coronarium*) and Composition of The Essential Oils From Flowerheadand Leaves, J. Agric. Food Chem.51 2267-2271.
- Murray, B. E., 1990. The Life and Times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev. 3 46-65.
- Kolaylı, S., M. Kucuk, C. Duran, F. Candan ve B. Dinçer, 2003. Chemical and Antioxidant Properties of *Laurocerasus officinalis* Roem.(Cherry Laurel) Fruit Grown in the Black Sea Region, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7489-7494
- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, Ş. A., Ulusoy, E. ve Baltacı, C., 2007. Biological Activities of Three Different Turkish Honey. Food Chemistry, 100 526-534.
- Koneman E. L., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger PC. ve Winn WC., 1997. Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology. Fifth Ed. Lippincott, 577-603.

- Masood, M, Minocha P.K, Tiwari K. P, 1981. Phytochemistry, volume 20, Issue 7, Pages 1675–1679.
- Perez, C., Pauli, M. ve Bazerque, P., 1990. An Antibiotic Assay by the Well Agar Method. Acta Biologia et Medicine Experimentalis, 15 113-115.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M and Bruni R., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, Food Chemistry, 91 621–632.
- Slinkard, K. ve Singleton, V. L., 1997. Total Phenol Analyses, Automation and Comparison with Manual Methods, American Journal of Enol, Vitic, 2 49-55.
- Sies, H., 1991. Oxidative Stres, From Basic Research to Clinical Application, American Journal Medic, 9 31-37.
- Skoog, D. A., Holler, J. F., Nieman, T. A., 1998. Principle of Instrumental Analysisi, Fifth Edition, Kılıç, E., Közeoğlu, F., Yılmaz, H., Saunders Colloge Pub. US, Bilkim, Yay. Ankara.
- Solomons T. W.G., 2002. Uiversty of South Florida and Graig B. Fryhle; Pacific Lutheran University.
- Stoyanow F., 1972. Şifalı Bitkiler, Kipaş Dağıtımcılık, İstanbul.
- Şener, B., 2002. Bioactive Compounds From Turkish Plants, Gazi Universty, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 1st International Congress on the Chemistry of Natural Products, Trabzon.
- Tiwari, K. P, Masood, M, Rathare Y. K. S., 2003. Phytochemistry, volume 63, Issue 4, Tune, 401–407.
- Peterson, J. ve Dwyer, M., 1998. Flavonoids, Dietary Occurrence and Biochemical Activit, Nutrition Research, 18 1995-2018.
- Polyakov, N. E., Leshina, T.V., Konovalova, T. A. ve Kispert, L. D., 2001. Carotenoids as Scavengers of Free Radicals in a Fenton Reaction, Antioxidants, Pro-Oxidants, 31, 3 398-404.
- Ricci D, Fraternali D, Giamperi L, Bucchini A, Epifano F, Burini G and Curini M, 2005. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activity of The Essential Oil of *Teucrium Marum* (Lamiaceae) Journal of Ethnopharmacology, 98 195-200.
- Tepe B. T, Sokmen M, Akpulat HA, Daferera D, Polissiou M and Sokmen A., 2005. Antimicrobial and Antioxidative Activity of The Essential Oil And Various Extracts of *Cyclotrichium Origanifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. Journal of Food Engineering, 66 447-454.

- Wollgast, J.ve Anklam, E., 2000. Review on Polphemols in Theobroma Cacao, Changes in Composition During the Manufacture of Choconate and Methodology for İdentication and Quantification, Food Research International, 33 423-447.
- Weston, R. J., Mitchell, K. R., Allen, K. L., 1999. Antibacterial Phenolic Components of New Zealand Manuka Honey, Food Chemistry, 64, 295-301.
- Yen, G.C.ve Chen, H.Y., 1995. Antioxidant Activity Of Various Tea Exctacts İn Relation Their Antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry ,43 27-32.
- Yaylı N, Yaşar A, Güleç C, Usta A, Kolaylı S, Çoşkunçelebi K and Karaoğlu S., 2005. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*, Phytochemistry; 66 1741-1745.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. ve Qian, M., 2002. Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50 1619–1624.
- URL.1-2007. : <http://gokgoz65.blogcu.com/436884>, Antibiyotikler, Ocak, 2007.

## **ÖZGEÇMİŞ**

Ahmet Ahıskalıoğlu 1979 yılında Trabzon'da doğdu. 1997 yılında Trabzon Lisesi'nden mezun oldu. 1998 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Rize Su Ürünleri Bölümüne girdi. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde Yüksek Lisans programına başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.