

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**ORMANGÜLÜ (*Rhododendron*) UÇUCU YAĞ VE EKSTRAKTLARININ
KİMYASAL BİLEŞİMLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Zeynep İSKEFİYELİ

**HAZİRAN 2010
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

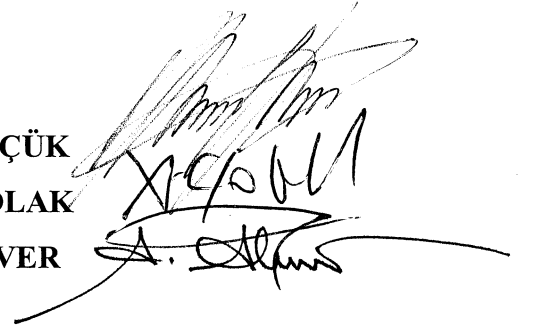
**ORMANGÜLÜ (*Rhododendron*) UÇUCU YAĞ VE EKSTRAKTLARININ KİMYASAL
BİLEŞİMLERİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

Kimyager Zeynep İSKEFİYELİ

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

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01.06.2010
Tezin Savunma Tarihi : 23.06.2010**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ahmet ÇOLAK
Jüri Üyesi : Doç.Dr. Ahmet ALVER**



Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2010

ÖNSÖZ

‘*Ormangülü (Rhododendron)* Uçucu Yağ ve Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimleri ve Biyolojik Aktiviteleri’ adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren, araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen ve bana araştırma zevki ve bilimsel düşünce disiplini aşılama için çaba gösteren, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat KÜÇÜK’e teşekkürü bir borç bilirim.

Bilimsel ve enstirümental katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI’ya ve saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya teşekkür ederim.

Numunelerimin GC-MS koşturmalarını yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet YAŞAR’a; antimikrobiyal aktivite analizlerini yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer ERTÜRK’e; teşekkür etmek isterim.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen, Arş. Gör. Nesibe Arslan Burnaz’a ve Ayça Aktaş’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Diğer yandan, çalışmalarım esnasında benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Hüseyin ŞAHİN ve Zehra CAN’a çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmam boyunca bana anlayış gösteren ve destek veren canım aileme, araştırmam süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Zeynep İSKEFİYELİ
Trabzon 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XII
SEMBOLLER DİZİNİ	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	2
1.2.1. Serbest Radikaller ve Etkileri	3
1.2.1.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri	3
1.2.1.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	4
1.2.1.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	4
1.2.1.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri	4
1.2.2. Serbest Radikallerin Temizlenmesinde Etkili Moleküller.....	4
1.3. Biyoaktif Fenolik Bileşikler	8
1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	11
1.4.1. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi	11
1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi.....	11
1.4.3. Tiyosiyanat Metodu.....	12
1.4.4. Floresans Sönme Zamanı Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini.....	12
1.4.5. Toplam Fenolik Madde Tayini	13
1.4.6. Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi	13
1.4.7. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi.....	13
1.4.8. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi.....	14
1.4.9. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi.....	15
1.4.10. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	15
1.5. Antimikrobiyal Maddeler	15
1.5.1. Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri	16
1.5.2. Antibakteriyel Maddenin Sınıflandırılması	17

1.5.3.	Antibiyotiklere Duyarlılık Deneyleri.....	17
1.5.3.1.	Dilüsyon (Seri Seyreltme) Yöntemi	18
1.5.3.2.	Difüzyon Yöntemi	18
1.6.	Enzimler.....	18
1.6.1.	Karbonik Anhidraz Enzimi.....	19
1.6.2.	Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	19
1.6.3.	Enzim Aktivitesi ve İnhibisyonu	20
1.6.3.1.	Hidrataz Aktivitesi Tayini	20
1.6.3.2.	Esteraz Aktivitesi Tayini	20
1.6.4.	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	21
1.6.5.	Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Klinik Önemi.....	21
1.7.	Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikler	21
1.7.1.	Uçucu Yağların Sınıflandırılması.....	22
1.7.1.1.	Kimyasal Bileşimlerine Göre	22
1.7.1.2.	Aromatik Özelliklerine Göre	23
1.7.1.3.	Farmakolojik ve Terapötik Etkilerine Göre.....	23
1.7.2.	Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri	24
1.7.2.1.	Destilasyon Yöntemi	24
1.7.2.1.1.	Su Destilasyonu	24
1.7.2.1.2.	Su ve Buhar Destilasyonu.....	24
1.7.2.1.3.	Buhar Destilasyonu.....	25
1.7.2.1.4.	Kuru Destilasyon	25
1.7.2.1.5.	Hidrodifüzyon.....	25
1.7.2.2.	Mekanik Yöntem (Presleme Yolu) ile Uçucu Yağ Elde Edilmesi	26
1.8.	Ekstraksiyon	26
1.8.1.	Ekstraksiyon Çeşitleri.....	26
1.8.1.1.	Sıvı-Sıvı ekstraksiyon	26
1.8.1.2.	Katı-Sıvı Ekstraksiyon.....	27
1.8.2.	Ekstraksiyon Yöntemi	27
1.8.2.1.	Organik Çözücü ile Ekstraksiyon	27
1.8.2.2.	Sabit Yağ ile Ekstraksiyon	28
1.8.2.3.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	28
1.9.	Doğal Bileşik Çalışmalarında Kullanılan Kromatografik Yöntemler	28
1.9.1.	Gaz Kromatografisi	29

1.9.1.1.	Kütle Spektrometrik Dedektör.....	31
1.9.1.2.	Alev İyonlaşma Dedektörü (FID).....	33
1.9.2.	Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	33
1.9.2.1.	HPLC’de Kullanılan Dedektörler	35
1.10.	Çalışılan Bitkilerin Özellikleri.....	37
1.10.1.	<i>Rhododendron ponticum</i> Bitkisinin Özellikleri.....	38
1.10.2.	<i>Rhododendron luteum</i> Bitkisinin Özellikleri.....	39
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	41
2.1.	Kullanılan Cihazlar	41
2.2.	Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar	42
2.3.	Bitkilerin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması	43
2.4.	Antioksidan Aktiviteler	44
2.4.1.	Asetonitril Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Miktarları.....	44
2.4.2.	Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarında DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi	46
2.4.2.1.	IC ₅₀ Değerlerinin Bulunması	46
2.4.3.	Asetonitril Ekstraktlarında FRAP Yöntemi.....	46
2.5.	Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarında Antimikrobiyal Aktivite	48
2.5.1.	Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi	48
2.5.2.	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Yöntemi	49
2.6.	Uçucu Yağların GC-MS Analizleri	50
2.7.	Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi	50
2.7.1.	Materyaller.....	50
2.7.2.	Standartlar ve Kalibrasyon	51
2.7.3.	HPLC-UV-DAD Koşulları	52
2.8.	Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri	53
3.	BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	55
3.1.	Antioksidan Aktiviteler	55
3.1.1.	Asetonitril Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Miktarları.....	56
3.1.2.	Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarda DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi	59
3.1.3.	Asetonitril Ekstraktlarında Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti.....	64
3.2.	Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarında Antimikrobiyal Aktivite	68

3.3.	Uçucu Yağların GC-MS Analizleri	73
3.4.	Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi	77
3.5.	Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri	81
4.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	88
5.	KAYNAKLAR.....	90

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çevresel ajanlar (pestisidler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler, çözücüler vb.), stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisiyle serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikaller yaşam için gereklidir; fakat yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller biyomoleküllerle kolayca reaksiyona girerek hücrelere zarar verebilecek toksik özellikte bileşikler oluşturabilir. Antioksidanlar ise serbest radikallerin etkilerini yok edici sistemlerdir. Günümüzde antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretirken, bir kısmını özellikle bitkilerden alır. Bu çalışmada ki amacımız araştırmaya değer özelliklere sahip olan *Rhododendron luteum* ve *Rhododendron ponticum* bitkilerinin asetonitrilli ekstraktlarının antioksidan aktivitesini incelemek ve bitkilerin kimyasal bileşimlerini belirlemektir. Halk arasında çokta iyi bilinmeyen bu bitki Trazon'dan toplanmıştır. Bu iki bitkinin yaprak ve çiçeklerinin asetonitrilli ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri gallik asit ve kateşin standartlarıyla, DPPH radikal temizleme aktiviteleri Trolox®, askorbik asit ve BHT standart antioksidanlarıyla, demir (III) indirgeme/antioksidan kuvveti (FRAP) Trolox® ve askorbik asit standartlarıyla ve karbonik anhidraz inhibisyon etkileri sülfanilamid ve asetazolamid standartlarıyla karşılaştırmalı olarak incelendi. Aynı zamanda bu bitkiler antimikrobiyal aktivite açısından da incelendi. Bitki ekstraktları antioksidan ve antimikrobiyal açıdan standartlara kıyasla yüksek aktivite göstermişlerdir. Antimikrobiyal aktivite özellikle Gram (-) bakterilere karşı gözlenmiştir. Karbonik anhidraz enzimi üzerine standart asetazolamitle karşılaştırılabilir bir inhibisyon tüm ekstraktlarda görülmüştür. Fenolik asit içeriği çalışmalarında ekstraktlarda gallik asit, protokatekuik asit, protokatekaldehit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit, kaffeik asit *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit bileşenleri tespit edilmiştir. Uçucu yağlarda yapılan sulu ve asitli çalışma karşılaştırması kompozisyonda ve aktivitede önemli değişikliklerin olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisinden sorumlu bileşiklerin belirlenmesi değerli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *R. ponticum*, *R. luteum*, asetonitril, ekstrakt, uçucu yağ, GC, HPLC, antioksidan, antimikrobiyal, karbonik anhidraz inhibisyonu

SUMMARY

Chemical Compositions and Biological Activities of *Rhododendron* Essential Oil and Extraks

Free radicals are formed in the organisms as a result of normal metabolism or because of various factors including pesticides, aromatic hydrocarbons, txins, stres, and radiation. Antioxidants scavenge these free radicals. Many compounds with antioxidant activity are known today. Some of these are made by our body as a defense system against free radicals, and some are obtained by diet from plants. In the current study, acetonitrile extracts of *Rhododendron luteum* and *Rhododendron ponticum* are investigated for chemical composition determination as well as bioactivity evaluation. Not very well known in public, the plants are collected in Trabzon. Acetonitrile extracts of leaves and flowers were investigated for antioxidant activity with DPPH scavenging, ferric reducing/antioxidant power (FRAP) and total phenolic content determinations comparatively with standart antioxidants BHT, vitamin C and Trolox, and carbonic anhydrase inhibitory activity was measured in comparison with acetazolamide. The samples were also tested for antimicrobial activity. The extracts showed high antioxidant and antimicrobial activity compared to the standards. Gram (-) bacteria were specifically susceptible to the extracts. High CA inhibitory activity was observed in alll the extracts. The extracts contained the phenolic acids gallic acid, protocatechuic acid, protocatechaldehyde, p-OH-benzoic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid and synapic acid. Essential oils obtained with normal and acidified methods showed changes with respect to both chemical composition and biological activity. Carbonic anhydrase inhibitory components of these plants deserve further study.

Key Words: *R. ponticum*, *R. luteum*, acetonitrile, extract, essential oil, GC, HPLC, antioxidant, antimicrobial, carbonic anhydrase inhibition

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması	6
Şekil 2. E vitamini (5,7,8-trimetiltokol [α -tokoferol])' nin formülü.....	8
Şekil 3. BHT (2,6 di-tert-butil-4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu.....	8
Şekil 4. Fenolik bileşiklere birkaç örnek	9
Şekil 5. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	12
Şekil 6. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS•+) radikalinin formülü	14
Şekil 7. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü.....	14
Şekil 8. Genel bir gaz kromatografi sistemi	30
Şekil 9. Bir kuadrupol kütle analizörünün şematik diyagramı	32
Şekil 10. Diyot serili dedektörün (DAD) şematik diyagramı	36
Şekil 11. Bir HPLC-MS enstrümanının yapısı	37
Şekil 12. <i>Rhododendron ponticum</i> görünümü	39
Şekil 13. <i>Rhododendron lluteum</i> görünümü	40
Şekil 14. Normal Clevenger ve AHC Clevenger yöntemiyle elde edilen uçucu verimi.....	55
Şekil 15. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit konsantrasyonu–absorbans grafiği.....	56
Şekil 16. Folin-Ciocalteu yöntemine göre ekstraktların gallik asit eşdeğeri (GAE, μ g/mL).....	57
Şekil 17. Numunelerin GAE (μ g/mL) değerlerinin numune konsantrasyonu ile ilişkisi.....	57
Şekil 18. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kateşin konsantrasyonu–absorbans grafiği.....	58
Şekil 19. Folin-Ciocalteu yöntemine göre ekstraktların kateşin eşdeğeri (CAE, μ g/mL).....	58
Şekil 20. Numunelerin CAE (μ g/mL) değerlerinin numune konsantrasyonu ile ilişkisi.....	59
Şekil 21. <i>R. ponticum</i> çiçek asetonitril ekstraktının seyrelme oranı–absorbans grafiği.....	60
Şekil 22. <i>R. ponticum</i> yaprak asetonitril ekstraktının seyrelme oranı – absorbans grafiği.....	60
Şekil 23. <i>R. luteum</i> çiçek asetonitril ekstraktının seyrelme oranı–absorbans grafiği	61

Şekil 24.	<i>R. luteum</i> yaprak asetonitril ekstraktının seyrelme oranı–absorbans grafiği.....	61
Şekil 25.	Asetonitril ekstraktlarının ¼ seyreltilen numunelerinin %DPPH temizleme değerleri	62
Şekil 26.	<i>R. luteum</i> çiçek normal uçucu yağının konsantrasyon–absorbans grafiği.....	63
Şekil 27.	<i>R. luteum</i> çiçek AHC (asitli) uçucu yağının konsantrasyon–absorbans grafiği.....	63
Şekil 28.	<i>R. luteum</i> çiçek normal ve AHC (asitli) uçucu yağlarının IC50 değerleri	64
Şekil 29.	FRAP yöntemine göre C vitamini konsantrasyonu–absorbans grafiği	65
Şekil 30.	Ekstraktların FRAP değerleri (µM)	65
Şekil 31.	Ekstrakt konsantrasyonu–FRAP değeri ilişkisi	66
Şekil 32.	FRAP yöntemine göre Trolox konsantrasyonu–absorbans grafiği.....	66
Şekil 33.	Ekstraktların TEAC değerleri (µM).....	67
Şekil 34.	Ekstrakt konsantrasyonu–TEAC değeri ilişkisi.....	67
Şekil 35.	Asetonitril ekstraktlarında TEAC–TF (GAE) ilişkisi.....	68
Şekil 36.	Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon testi) açısından en çok etki gösteren ekstraktlar	69
Şekil 37.	Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon testi) açısından en çok etkilenen mikroorganizmalar	70
Şekil 38.	Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (MIC) açısından en çok etki gösteren ekstraktlar	72
Şekil 39.	Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (MIC) açısından en çok etkilenen mikroorganizmalar	72
Şekil 40.	<i>R. luteum</i> çiçeklerinin normal Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS kromatogramı	74
Şekil 41.	<i>R. luteum</i> çiçeklerinin asitli (AHC) Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS kromatogramı	74
Şekil 42.	Standart olarak kullanılan 8 fenolik asitin HPLC-UV kromatogramı.....	77
Şekil 43.	Standart olarak kullanılan 7 fenolik asitin HPLC-UV kromatogramı	78
Şekil 44.	<i>R. ponticum</i> çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı.....	78
Şekil 45.	<i>R. ponticum</i> yapraklarının asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı.....	79
Şekil 46.	<i>R. luteum</i> çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı.....	79
Şekil 47.	<i>R. luteum</i> yapraklarının asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı.....	80
Şekil 48.	Standart olarak kullanılan asetazolamidin konsantrasyon–CA-I %kalan aktivite grafiği.....	82

Şekil 49.	<i>R. ponticum</i> çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği.....	82
Şekil 50.	<i>R. ponticum</i> yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği	83
Şekil 51.	<i>R. luteum</i> çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği.....	83
Şekil 52.	<i>R. luteum</i> yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği.....	84
Şekil 53.	Standart olarak kullanılan asetazolamidin konsantrasyon–CA-II %kalan aktivite grafiği.....	84
Şekil 54.	<i>R. ponticum</i> çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-II % kalan aktivite grafiği.....	85
Şekil 55.	<i>R. ponticum</i> yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı –CA-II %kalan aktivite grafiği.....	85
Şekil 56.	<i>R. luteum</i> çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-II % kalan aktivite grafiği.....	86
Şekil 57.	<i>R. luteum</i> yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-II % kalan aktivite grafiği.....	86
Şekil 58.	<i>Rhododendron</i> asetonitril ekstraktlarının insan karbonik anhidraz I enzimine karşı IC ₅₀ değerleri.....	87
Şekil 59.	<i>Rhododendron</i> asetonitril ekstraktlarının insan karbonik anhidraz II enzimine karşı IC ₅₀ değerleri.....	87

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Karbonik anhidraz izoenzimleri	19
Tablo 2. Denemelerde kullanılan cihazlar	41
Tablo 3. Çözeltiler ve hazırlanışları	42
Tablo 4. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar	43
Tablo 5. FRAP testi için hazırlanan tüpler.....	47
Tablo 6. Fenolik bileşiklerin çalışıldığı dalga boyları	51
Tablo 7. HPLC elüsyon gradient programı.....	53
Tablo 8. Dört numunenin ve iki standardın BCA aktivitesine etkileri	54
Tablo 9. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon testi).....	68
Tablo 10. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (minimum inhibisyon konsantrasyonu, MIC)	71
Tablo 11. <i>R. luteum</i> çiçeklerinin normal ve asitli Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri.....	73
Tablo 12. <i>R. luteum</i> çiçeklerinin normal Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS analizi sonuçları	75
Tablo 13. <i>R. luteum</i> çiçeklerinin asitli (AHC) Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS analizi sonuçları	76
Tablo 14. Fenolik bileşenlerin tutulma zamanı ve numunelerin pik alanları.....	81

SEMBOLLER DİZİNİ

C18	: Oktadesil
C8	: Oktil
CGC	: Kapiler Gaz Kromatografisi
CGC-MS	: Kapiler Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
CH₃CN, ACN	: Asetonitril
CI	: Kimyasal İyonlaştırma
CID	: Çarpışmadan kaynaklanan ayrışma
DAD	: Diyot Serili Dedektör
DC	: Doğru Akım Voltajı
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ECD	: Elektron Yakalama Dedektör
EI	: Elektron İmpakt İyonlaştırma
ESI	: Elektrosprey iyonlaştırma
ESI-MS	: Elektrosprey İyonlaştırma- Kütle Spektrometrisi
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
H₃PO₄	: Fosforik asit
HCl	: Hidroklorik Asit
HPLC	: Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	: Yüksek-Performanslı Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometri
IC₅₀	: %50 İnhibisyon Konsantrasyonu
IgG	: İmmüoglobülin
kV	: Kilo Volt
LC	: Sıvı Kromatografisi
LC-DAD	: Sıvı Kromatografisi- Diyot Serili Dedektör
LC-ESI-MS	: Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonlaştırma- Kütle Spektrometrisi
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
LOD	: Dedeksiyon Limiti
MDA	: Malondialdehit

MS	: Kütle Spektrometrik Dedektör
NP	: Normal faz
Ppm	: Milyonda kısım
RF	: Radyo frekansı
ROS	: Reaktif Oksijen Türü
RP	: Ters Faz
RP-LC	: Ters Faz-Sıvı Kromatografisi
RP-LC-DAD	: Ters Faz-Sıvı Kromatografisi- Diyot Serili Dedektör
RSD	: Bağlı standart sapma
SIM	: Tek iyon izleyen (Single ion Monitorization)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole- Görünür Bölge
VIS	: Görünür

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Vücudumuz normal fonksiyonlarını yerine getirmek için enerji üretirken, aynı zamanda milyonlarca serbest radikalin oluşmasına sebep olurlar. Bu serbest radikallerin artmasına sebep olan birçok etken vardır. Bu etkenlerden bazıları, kimyasal maddeler, çevre kirliliği, UV ışınları, X-ışınları, ilaçlar, virüsler, stres, sanayi atıkları, egzoz gazları ve sigara dumanı vs. olarak örneklendirilebilir. Ayrıca modern gıdalar, şeker ve yağ miktarı fazla olan gıdalar, alkol ve hatta yoğun egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla birlikte serbest radikallerin miktarının da artmasına sebep olmaktadır. Bu etkenler sonucu oluşan serbest radikaller, vücuttaki hücreleri olumsuz yönde etkiler. Bu durumda antioksidanlar da hücreye zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girerek bunların başlattığı zincir reaksiyonu durdurur ve böylece vücudumuzdaki hayati bileşenlerin zarar görmesini engeller. Son yıllarda sentetik antioksidanların yan etkilerinin görülmeye başlaması nedeniyle besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitkisel kaynaklı antioksidanlara ilgisi artmıştır. Artan bu ilgi, bütün dünyada bitkisel tedavinin desteklenmesini ve önemsenmesini sağlamıştır.

Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar flavonoidler başta olmak üzere sinamik asit türevleri, kumarinler, tokoferoller, organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik maddelerdir (Harborne, 1994). Fenolik bileşikler antioksidan olarak, insan vücudundaki çeşitli nedenlerle oluşmuş serbest radikalleri temizleme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, ağır ve radyoaktif metalleri şelatlama ve otooksidasyonu önleme konusunda da fenolik bileşikler oldukça etkilidirler. Başka bir deyişle bunlar, çeşitli reaktif oksijen türlerini hücrelerden uzaklaştırarak metabolizmayı zinde tutarlar. Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000).

Yapılan bu çalışmada, Trabzon'dan toplanan *Rhododendron* familyasına ait *R.ponticum* ve *R.luteum* olarak anlandırılan her iki bitkinin çiçek ve yapraklarının asetonitril ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin yanı sıra elde edilen esansiyel yağlarının kimyasal bileşik içeriği araştırıldı. Ayrıca, bitkilerin çiçek ve yaprak

kısımlarının karbonik anhidraz enzim aktiviteleri de incelendi. Daha önce zencefilde tauguchi yöntemi kullanılarak yanı farklı parametreler ile çalışma yapılmıştı. Bu çalışma sonucunda kullanılan çözücülerden asetonitrilin veriminin düşük olmasına rağmen biyoaktivitesinin oldukça yüksek olduğu ortaya çıktı. Biz de bu çalışmamızda önceki çalışmaları referans alarak bunu daha net bir şekilde ortaya koymaya çalıştık.

1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir yada daha fazla eşleşmemiş elektronu bulunan oldukça reaktif ve stabil olmayan atom ve moleküllerdir (Akkuş, 1995). Bu stabil olmayan durumun yarattığı enerji, organik veya inorganik kimyasallar, lipitler, karbohidratlar, proteinler ve DNA gibi komşu moleküllerle reaksiyona girerek serbest hale gelir. Serbest radikaller dış yörüngelerindeki elektron açığını reaksiyona girdiği komşu molekülden alırken, elektronunu kaybeden komşu molekül kararsız hale geçer ve böylece yeni bir serbest radikal oluşmuş olur. Etkileşim böyle devam ederek sürekli serbest radikale dönüşüme neden olan bir reaksiyon (otokatalitik reaksiyon) başlar.

Oksijen canlı organizmada ATP yapımı için gereklidir. Hücreler oksijenden enerji meydana getirirken az miktarda da olsa zararlı yan ürünler (reaktif oksijen türevleri-serbest oksijen radikalleri) oluştururlar. Ayrıca çevresel faktörlerden kaynaklanan toksik maddelerle etkileşim sonucu serbest oksijen radikalleri kaçınılmaz bir şekilde oluşmaktadır. Bunun yanında bu radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Eğer bu radikaller savunma mekanizmasının kapasitesini aşarlarsa oksidatif stres oluşmakta ve hücrelerin lipit, protein, DNA, enzim ve karbohidrat gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olmaktadır (Akkuş, 1995).

Çevremizde sıkça karşılaşılan serbest radikal kaynaklarına; sigara, alkol, uyuşturucu, radyasyon, stres, hava kirliliği gibi birçok örnek verilebilir. Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport sisteminde elektron sızıntısıdır. Serbest radikaller, aerobik metabolizma sırasında ya da organik maddelerin çürümesi, boyaların kuruması ve plastik maddelerin işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde, oksijenin kısmi redüksiyonu ve oksijen türlerinin reaksiyonları ile oluşabilmektedir.

1.2.1. Serbest Radikaller ve Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membranın permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bronşit, Parkinson hastalığı, gebelik preeklampsisi, çeşitli kanser hastalıkları, alkolik karaciğer hastalığı, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur.

1.2.1.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L^{\cdot}) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO^{\cdot}) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.

Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.

1.2.1.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler.

1.2.1.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH[•]) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H₂O₂) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir.

1.2.1.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi sonucu çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, behçet hastalığı, çeşitli deri ve göz hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıkta ve yaşlılıkta serbest radikal üretiminin arttığı, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu gösterilmiştir.

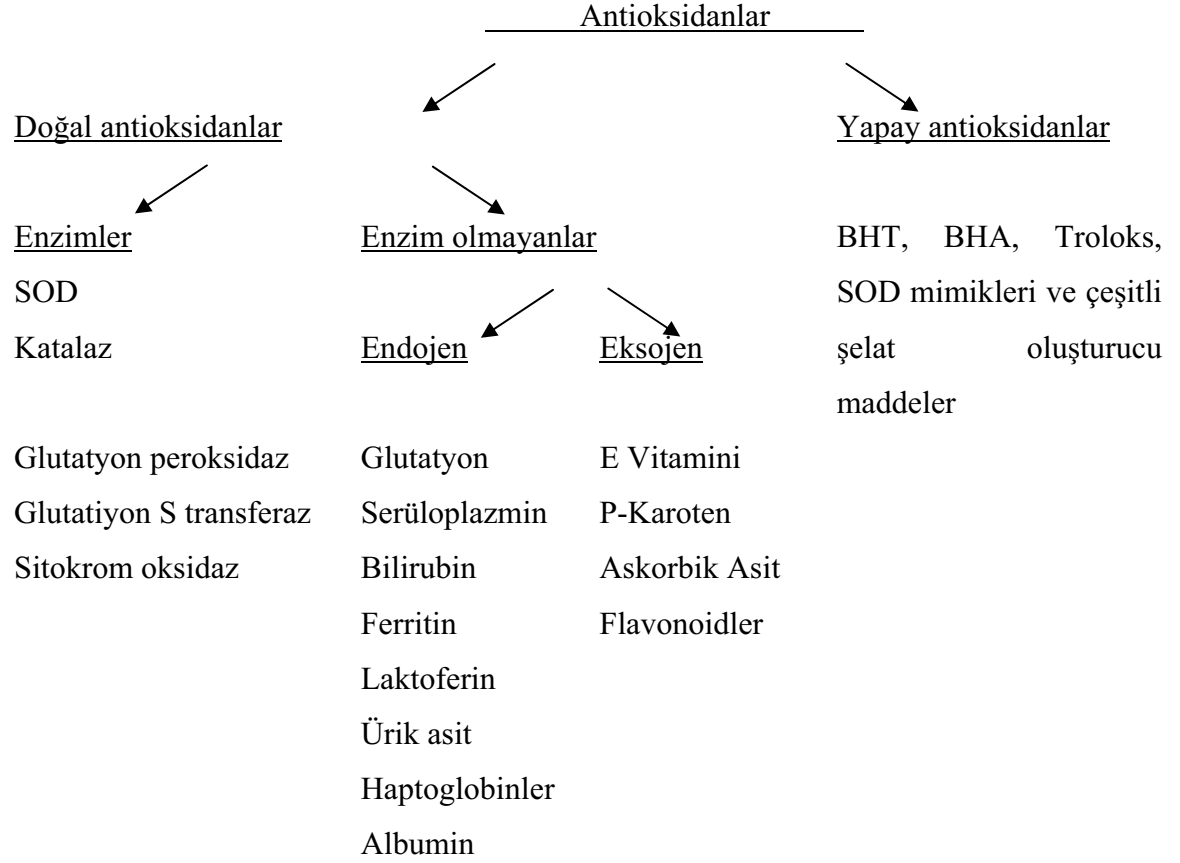
1.2.2. Serbest Radikallerin Temizlenmesinde Etkili Moleküller

Serbest radikaller potansiyel olarak toksik oldukları için organizmalar bunları etkisiz hale getirmek amacıyla savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bu savunma sistemleri kısaca

“antioksidanlar” olarak adlandırılırlar. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girip onları etkisiz hale getirerek, kanser, kalp hastalıkları, diyabet ve komplikasyonları bastırarak olmak üzere birçok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları önleyen, yok eden veya etkilerini azaltan moleküllerdir.

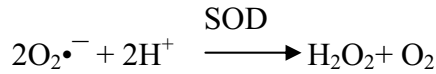
Antioksidanları öncelikle doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar (ilaçlar) şeklinde sınıflandırmak daha doğru olacaktır. Doğal antioksidanlar, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Endojen antioksidanlar, enzimler ve enzim olmayanlardır. Katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidroperoksidaz enzimlere; melatonin, seruloplazmin, transferin ve miyogloblin ise enzim olmayanlara örnek olarak verilebilir. Endojen antioksidanlar buldukları ve etkinliklerini yerine getirdikleri yerlere göre de hücre içi (intraselüler), membranal ve hücre dışı (ekstraselüler) antioksidanlar olarak üç sınıf altında toplanabilir.

Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanlarıdır. Vitamin olan eksojen antioksidanlar; *-tokoferol* (vitamin E), *-karoten*, Askorbik asit (vitamin C) ve Folik asit (folat) tir. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar; ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri ve Troloks örnek olarak verilebilir. Gıdaların korunmasında en çok kullanılan sentetik antioksidantlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propilgallat (PG) ve ter-bütül hidrokinon (TBHQ)'dur. Ayrıca Tokoferoller de gıdalarda antioksidant olarak kullanılır. Bunların düşük etkisi, yüksek maliyeti olmasına rağmen tokoferol gibi alternatif, doğal ve güvenilir daha fazla gıda antioksidantlarının tanımlanması gerekmiştir.

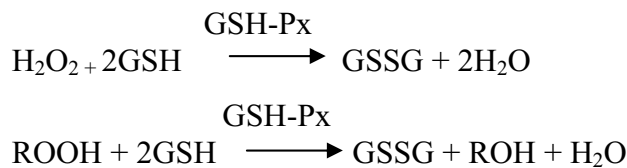


Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması

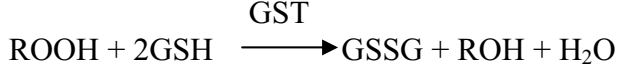
Enzimatik antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD), organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim olup oksijenin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizler.



Katalaz (CAT), yüksek konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksitin dismutasyonunu katalizler. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hücre içinde düşük konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerini indirger.



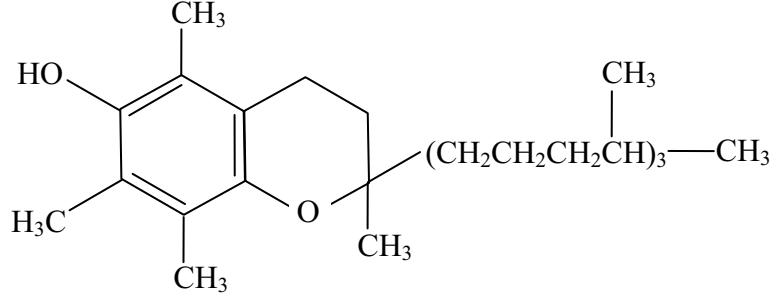
Glutasyon redüktaz (GSH-R), yükseltgenmiş glutasyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü sağlar. Glutasyon-S-transferazlar (GST), başta araşidonik asit ve lineloat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı, selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması oluştururlar.



Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ise solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksidi (O_2^-) detoksifiye eder (Akkuş, 1995).

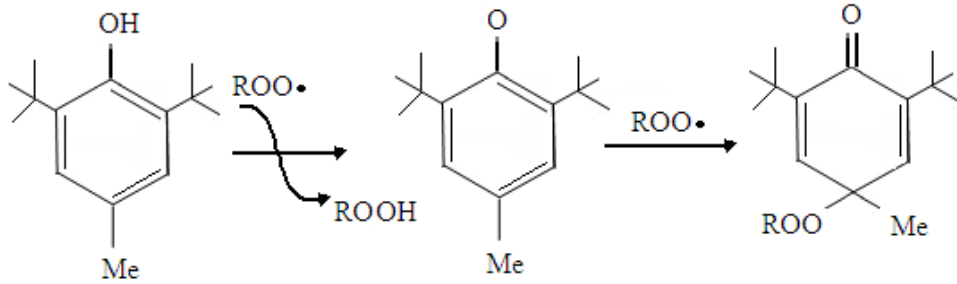
Enzimatik olmayan endojen antioksidanlardan glutasyon (GSH) bir peptit olup hücre içinde en önemli antioksidan moleküldür ve hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur. Melatonin (MLT) en zararlı serbest radikal olan hidroksil serbest radikalini (OH^\bullet) ortadan kaldıran güçlü bir antioksidandır ve günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Ürat; hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler ve C vitamininin oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır. Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Albümin LOOH ve HOCl toplayıcısıdır ve plazma osmotik basıncını düzenler. Aynı zamanda kan, bilirubin, hormon, aminoasit, steroid, yağ asitleri ve ilaçların taşınmasında rol oynar.

Süperoksit radikali dışında diğer bir indirgeyici hücre sel ajan olan askorbik asit (C vitamini), zincir kırıcı antioksidan etki gösteren ve okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutasyon tarafından yeniden indirgenebilen α - *tokoferol* (E vitamini), radikal toplayıcı etkisi bulunan β -*karoten* (A vitamini) ve polifenoller gibi moleküller insan ve hayvan organizmasında sentezlenemeyen bitkiler tarafından sekonder metabolit olarak üretilen maddeler olup radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında son derece etkili birer antioksidandırlar ve etkinliklerini enzimatik olmayan yolla sürdürürler (Chen vd., 1988; Edge vd., 1997). Bunlardan E ve A vitaminleri membranda bulunan antioksidanlardır.



Şekil 2. E vitamini (5,7,8-trimetiltokol [*α*-tokoferol])' nin formülü

Süperoksit anyonunun temizlenmesinde en etkili antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi olup glutasyon, flavonoidler ve çeşitli polifenoller de etkin rol oynamaktadır. Sentetik olarak üretilen ve çoğunlukla antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılan Trolox, rutin, butillenmiş hidroksi toluen (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi antioksidanlar da vardır. Peroksi radikaliyle iki aşamada etkileşerek onu çok daha az reaktif ürünlere dönüştüren 2,6 di-tert-butil-4 metil fenol (butillenmiş hidroksi toluen [BHT]) önemli sentetik antioksidandır.

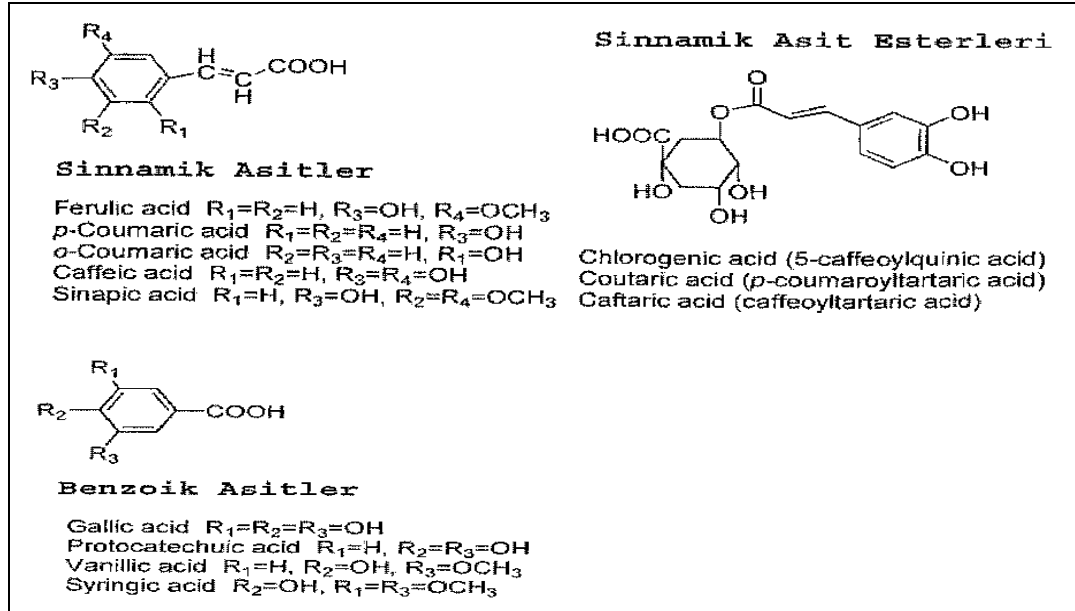


Şekil 3. BHT (2,6 di-tert-butil-4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu

1.3. Biyoaktif Fenolik Bileşikler

Bitkiler normal metabolizma sırasında yaralanma, enfeksiyon, uv radyasyonuna maruz kalma gibi durumlarında ikincil metabolitler olarak fenolik bileşikleri sentezlerler. Fenolik bileşikler fenil alanin ve tirozinden türetilirler. Bitki fenolikleri arasında basit fenoller, fenolik asitler (benzoik asit ve sinamik asit türevleri), kumarinler, flavonoidler, stilbenler, hidrolizlenebilir kandanse taninler, lignanler ve ligninler bulunur. Bu bileşikler bitkide fitoaleksinler olarak, polen taşıyıcıları çekmek için, renklenme amacıyla,

antioksidanlar olarak, ve uv ışık gibi zararlardan korunmada rol oynarlar. Bunlar gıdalarda tat belirleyen bileşiklerin başında gelmektedirler. Fenolik bileşiklere birçok örnek verilebilir. Şekil-4'te sadece bizim yararlandığımız fenolik bileşikler verilmiştir. Bunların diğerlerinden farkı karboksil grubunun olmasıdır.



Şekil 4. Fenolik bileşiklere birkaç örnek

Flavonoidler bitkilerden metanol, etanol veya su ile ekstrakte edilebilen biyolojik aktiviteleri en fazla çalışılmış olan bileşik grubudur. 1936 yılında limon kabuğundan elde edilen flavon bileşiklerin P-vitamini adı altında kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması flavonoidlere verilen önemi arttırdı.

Flovanoidler önceleri çiçeklerin sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renklerinden sorumlu pigmentler olarak biliniyorlardı. Genellikle meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak ve dallarda bulunmaktadır. Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciriyle birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren difenil propan yapısı teşkil eder. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması nedeniyle, flavonoidler alt sınıflara ayrılırlar. Bu sınıflardan birisi, fenil gruplarının propan zincirine 1,3 pozisyonlarında bağlanmasıyla oluşan kalkonoidlerdir ve en basit üyesi kalkondur. Hetero halkanın oluşmasıyla meydana gelen trisiklik sistem hetero halkanın, yükseltgenme derecesine bağlı olarak iki farklı yapıda bulunabilirler. Bunlar flavon ve flavan'dır.

Genellikle flavon türevlerine flavonoidler, flavan türevlerine ise flavanoidler denir. 1,2 difenil propan iskeletinde propan zincirinin uçtaki karbon atomunun oksijen atomu üzerinden aromatik halka ile halkalı yapı oluşturması sonucu oluşan hetero halkalı trisiklik yapıya izoflavan denir. İzoflavan halkasının modifikasyonuna bağlı olarak izoflavon meydana gelir. Fenil halkalarının propan iskeletine 1,1 pozisyonunda bağlanmasıyla oluşan 1,1 difenil propan iskeleti içeren bileşiklere neoflavonoidler denir. Görüldüğü gibi difenil propan iskeleti içeren bileşikler aromatik halkanın pozisyonlarına göre flavonoidler, izoflavonoidler ve neoflavonoidler olarak 3 ana sınıfa ayrılır. Flavonoidlerin yapılarındaki C₃ sisteminin oluşturduğu heterosiklik halka değişik yükseltgenme derecelerinde bulunabilir. Hetero halkanın yükseltgenme derecesine bağlı olarak bilinen flavonoid sınıfları aşağıdadır:

Flavonlar, flavonoller, flavononlar, flavononoller, flavon-3-oller, flavon-3,4-dioller, antosiyanidinler, kalkonlar, dihidrokalkonlar, avronlar'dır. Son üç sınıf yapı benzerliğinden flavonoidler sınıfına dahil edilmiştir. Flavonoidler kurutulmuş bitkilerden ekstrakte edilirler. Taze bitkilerde enzim etkisini önlemek için bitkinin çözücünde (genellikle etanolde) kaynatılması (1-2dk) gerekir. İzoflavon, flavanon, dihidroflavanol, polimetillenmiş flavon ve flavonollerin ekstraksiyonu benzin, kloroform, eter veya etil asetat gibi çözücülerde yapılabilir. İzolasyonları seçici ekstraksiyon yöntemiyle sağlanır. Farklı çözücülerde polaritenin artış sırası ile bitki örneği ekstrakte edilir.

Kan damarlarının kılcal damar duvarlarına olumlu etkileri vardır. Eritrosit oluşumunu ve lökosit miktarını artıran etkiye sahiptirler. Flavonoidler kalp kuvvetlendirici maddelerdir. Nabzı normalleştirme özelliğine sahiptirler. Karaciğere yararlı, safra salgısını arttırıcı, karaciğerin barbitürat ve arsenik gibi bileşiklere karşı detoksifikasyonuna etki ettikleri açıklanmıştır. Antioksidan, antimikrobiyal, antiülserojenik, antiviral, hepatoprotektif, hipolipidemik ve iltihaba karşı etkiye sahiptirler. Vücuttaki lipid peroksidasyonu gibi fizyolojik aktivitelerin doğal ürünü olan radikaller, organizmanın doğuştan kazandığı çok hassas donanımla oksidan antioksidan dengesi bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması membran lipitleri, proteinler ve canlıda patolojik olayların gelişmesine yol açar.

1.4. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidanlar oksidatif stresle, prooksidanların gıdalarda, çevrede ve organizmada meydana getireceği hasarla mücadelede kullanılmaktadırlar. Maddelerin bu amaçla kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla birçok antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında en yaygın kullanılanlarını şu şekilde sıralayabiliriz.

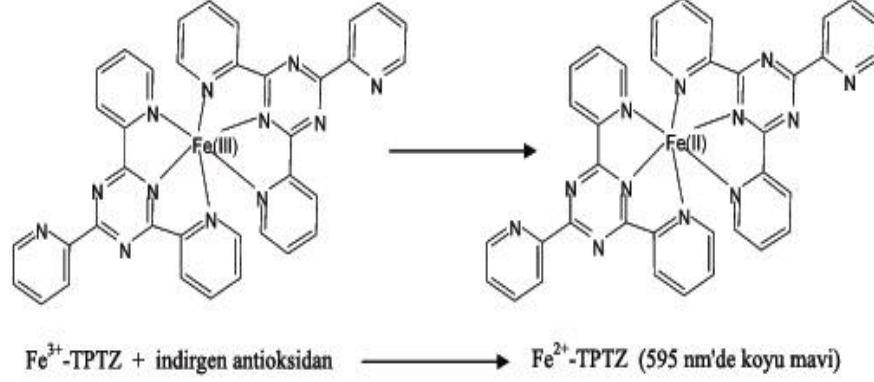
1.4.1. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

Lipit peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için kullanılan pek çok yöntem mevcuttur. MDA, lipit peroksidasyonunun ikincil ürünlerinden en iyi bilinenidir ve hücre duvarı hasarının belirlenmesinde indikatör olarak kullanılabilir. Son yıllarda, Ohkawa vd. (1979)'nin ortaya koyduğu yöntemlerden biri bir miktar değiştirilerek uygulanmaktadır. Yöntem, karaciğer doku homojenatı, Fe^{+2} ve C vitamini muamele edilerek oluşturulan Fenton reaksiyon karışımında ortaya çıkan ve bir lipid peroksit ürünü olan MDA'nın sıcak ve asidik ortamda tiyobarbiturik asit ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan bu renkli kompleks 532 nm'de maksimum absorpsiyon oluşturur. Tayinde antioksidan aktivite köre göre MDA oluşumunu %50 inhibe eden madde miktarları (IC_{50}) cinsinden verilir. %50 İnhibisyonu en az konsantrasyonda sağlayabilen madde miktarını veren madde antioksidan aktivite yönünden en etkili olanıdır. MDA oluşumunun engellenmesi antioksidan aktivitenin varlığını gösterir.

1.4.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan metoda göre indirgeme kuvveti özütün dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup Fe^{+3} Fe^{+2} indirgenmesi ile meydana gelen renk değişimi 700 nm'de takip edilerek belirlenir. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit ile karşılaştırılmak suretiyle yorumlanır. Güncel olarak kullanılan FRAP metodunda 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ)'in $Fe(III)$ tuzu kullanılmaktadır. Bu yöntemle redoks potansiyeli 0.7 V'tan daha düşük olan bileşikler antioksidan olarak test edilebilmektedir. Polifenolik antioksidanlarda hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteyi

etkilemektedir. FRAP yöntemi H transferi ile radikal temizleyen özellikle tiol ve proteinlerin antioksidan kapasitesini ölçmemektedir.



Şekil 5. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu

1.4.3. Tiyosiyanat Metodu

Bu metod ise linolenik asit, Tween-20 ve fosfat tamponu ile oluşturulan emülsiyon ortamında bulunan doymamış bir yağ asidi olan linolenik asidin 40 °C'de 140 saat oksijen ile inkübasyonunda oluşan lipid peroksidin miktarının ölçümü esasına dayanmaktadır. Yüksek absorbans düşük antioksidan aktiviteyi, düşük absorbans ise yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir. Ortamda bir antioksidan maddenin varlığında lipid peroksid ürünü oluşamaz ve konsantrasyonu dolayısıyla absorbansı düşük çıkar.

1.4.4. Floresans Sönme Zamanı Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Chang vd., (2001) tarafından kullanılan bu metod modifiye edilmiştir. Silika jelden hazırlanmış ve flöresans özelliğe sahip aluminyum-silikajel tabakalara özüt emdirilip kurutulduktan sonra plaka linolenik asit emülsiyonuna daldırılır, tamamen kurutulur ve UV-lamba (254 nm) altında bekletilir. Bu sırada oksijenin de etkisi ile linolenik asit emülsiyonunda önce kararmalar ve sonra parlak lekeler oluşur. Oluşan bu parlak lekelerin kaybolma zamanı antioksidan varlığına bağlıdır ve antioksidan maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

1.4.5. Toplam Fenolik Madde Tayini

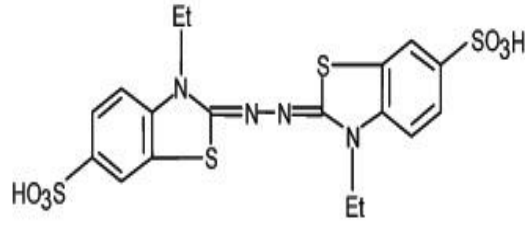
Metot, suda ve diğerk organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-menekşe renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorban oluşturur (Slinkard ve Singleton, 1977). Bu metod aslında numunenin indirgeme kapasitesini ölçmesine rağmen adı bunu yansıtmamaktadır. Yani yöntem aslında bir antioksidan tayin yöntemidir.

1.4.6. Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi

Erel (2004) tarafından gerçekleştirilen bu yöntem, modifiye edilerek yapılmaktadır. Fe^{+2} -*o*-dianisidin kompleksinin standardize çözeltisi, standardize H_2O_2 çözeltisi ile Fenton tipi bir reaksiyon vererek OH radikalini oluşturur. Oluşan bu kuvvetli ROS (reactive oxygen species = reaktif oksijen türleri) ler, radikal düşük pH'larda indirgenmiş renksiz *o*-anisidin moleküllerini, sarı-kahverengi dianisidil radikallerine yükseltir. Dianisidil radikalleri üzerinden başlayan bu oksidasyon sonucu dianisidil radikalleri de kendi aralarında reaksiyona girerek büyük kompleksler oluşturur, diğerk oksidasyonlara neden olur ve zincirleme oksidasyon reaksiyonları gerçekleşerek renk giderek koyulaşır. Fakat ortama katılan ve antioksidan özellik gösteren bir madde bu oksidasyon reaksiyonlarını durdurmaya çalışır ve dolayısıyla rengin de koyulaşmasını engeller. Bu reaksiyon spektrofotometri ile 444 nm'de gözlenebilir. Renk oluşumunun bastırılması, Trolox ile ayarlanır.

1.4.7. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi

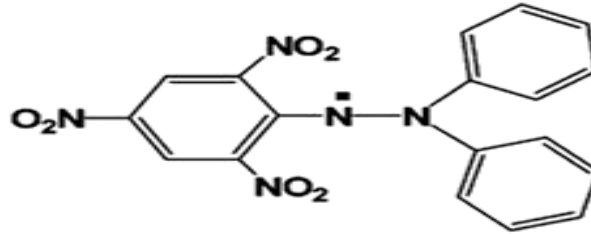
Bu yöntem Özcan Erel (2004) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemin esası ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)) molekülünün H_2O_2 ve metmyoglobinle mavi-yeşil renkli $ABTS^+$ radikaline dönüşmesi ve bu dönüşümün 734 nm'de fotometrik olarak gözlenmesine dayanmaktadır. Antioksidan mevcudiyetinde bu dönüşüm engellenmektedir.



Şekil 6. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS•+) radikalinin formülü

1.4.8. DPPH Radikali Temizleme Aktivitesi

DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm'de maksimum absorbans oluşturmaktadır (Cuendet vd. 1997). 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 $\mu\text{g/mL}$ cinsinden belirlenmekte ve IC_{50} 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. Bu metod radikal temizleme aktivite tayinlerinde kolaylığı ve kısa sürmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 7. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

1.4.9. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

Bu yöntem β -fikoeritrin (β -phycoerythrin [β -PE]) adlı bir prob maddesinin floresansının, peroksil ve hidroksil radikalleri varlığında sönüme uğraması ve ortamdaki antioksidanların bu olayı geciktirmesine ilişkindir. β -PE'den kaynaklanan floresanstaki azalışın şiddeti onun peroksil radikalinden gördüğü hasarın miktarını göstermektedir. Numunedeki antioksidan floresanstaki bu düşüşü yavaşlatmakta ya da durdurmaktadır (Apak vd. 2004).

1.4.10. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

CUPRAC yöntemi, diğer antioksidan aktivite tayin yöntemlerine göre daha hızlı, basit ve kullanışlıdır; radikal kromojen reaktiflerin pahalılık, güç temin edilebilirlik ve kararsızlık sorunlarından arınmıştır. Cu(II)-neokuproin reaktifi ılımlı bir yükseltgen olduğundan gıda maddelerinde bolca bulunan sitrat ve glukoz gibi bileşenlerle tepkime vermeksizin sadece antioksidanları yükseltgen ve reaksiyon ürünü Cu(I)-neokuprin kelatının 450 nm'deki absorbansı okunarak sonuç verilir. Yöntem, tiyol (-SH) tipi antioksidanlarla çabuk ve net sonuçlara ulaşır. CUPRAC, fizyolojik pH'lara yakın olan pH=7 ortamında yürütülür; dolayısıyla fizyolojik koşulları yansıtma şansı daha fazladır. Uygun çözücü seçimiyle hem hidrofilik, hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilir (Apak vd. 2005).

1.5. Antimikrobiyal Maddeler

20. yüzyılın başlarına kadar insan organizmasına zarar vermeden mikroorganizmaları etkilemenin imkansız olduğu düşünülüyordu. M.Ö 2500 yıllarında bilincinde olmadan antimikrobik tedavi yöntemleri kullanılmış ve bu devirde enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılan bitki kökleri, şarap ve küf gibi maddeler olumlu sonuçlar vermiştir. 1600'lü yıllarda Güney Amerika'da, insanlar cinchora bitkisinin kabuğunu yiyerek sıtımadan korunmuşlar, ipeka bitkisinin kök ekstresini kullanarak amipli dizanteri hastalığını tedavi etmişlerdir. Cinchora bitkisinin kabuğunda kinin, ipeka bitkisinin köklerinde ise emetin bulunduğu belirlenmiştir. 20. yüzyıldan itibaren patojen

mikroorganizmalar hakkında bilgiler arttıkça enfeksiyon hastalıkları ile savaş da bilinçli olarak sürdürülmüştür. 1854-1915 yılları arasında Paul Ehrlich, bir arsenik bileşiği olan arsfenamini ile sifilizi, tripan kırmızısı boyası ile Afrika uyku hastalığını tedavi etmeyi başarmıştır. 1927 yıllarında Almanya'da kimya endüstrisi alanında çalışan Gerhard Domagk ve ekibi, çeşitli boyaların patojen bakterilere etkinliğini ve hayvanlardaki toksik etkisini araştırmaları sırasında, deri boyamada kullanılan prontosil kırmızısı adlı boyanın hayvanlara toksik olmadığını, stafilokok ve streptokoklara etkili olduğunu saptamışlardır ve bu bulgunun 1935 yılında yayınlanmasından bir yıl sonra prontosil kırmızısının vücutta sülfanilamide dönüştüğü ve antibakteriyel aktiviteyi bu maddenin sağladığı anlaşılmıştır.

1929 yılında S. Alexander Fleming tarafından bulunan ve bu yıllarda toksik etkileri nedeniyle kullanım alanına giremeyen penisilin 1940 yılında kullanılır hale Ernest Chain ve Howard Florey tarafından getirilmiştir. Penisilin 2. Dünya Savaşı'nda yara enfeksiyonlu birçok askerin hayatını kurtarmıştır. Son yıllarda antibakteriyel etki alanı daha genişlemiş ve toksik etkisi az olan, mikroorganizmaları öldürücü ya da mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösteren birçok antibiyotik ve antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olup tümüyle sentetik olan (kimyasal yolla sentez edilen) kemoterapötik maddeler üretilmiştir.

1.5.1. Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri

Antimikrobiyal bir maddede olması gereken en önemli özellik seçici toksisitedir. Kemoterapide kullanılan antimikrobiyal madde düşük konsantrasyonlar da bile etkili olup çok az toksik olmalıdır. Böyle bir etkinin ortaya çıkabilmesi için antimikrobiyal maddenin hedef olarak memeli hücrelerinden çok mikroorganizmalar seçilmelidir. Bakteriler prokaryot, memeli hücreler ökaryottur. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örneğin; sefalosporinler, sülfonamidler...) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptir. Virüsler konak hücreye integre olduklarından, konağa zarar vermeden virüsü etkilemek olanaksızdır. Virüslere etkili ilaçların seçici toksitesinden hiç söz edilemez. Mantarlarda ökaryot hücre yapısında ve memeli hücrelerine benzerler. Bu nedenle antimikrobiyal maddeler için seçici toksiteden söz edilemez.

Antimikrobiyal maddeler etkili olabildikleri mikroorganizma cins sayısının az yada çok oluşuna bağlı olarak, dar yada geniş spektrumlu şeklinde tanımlanır. En dar

spektrumlu 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 yada mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının beklenemeyeceği acil durumlarda geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler (karbapenemler, kinolonlar...) kullanılır. Bazı bakteri ve mantar türleri tarafından oluşturulan, mikrobisid veya mikrobiyostatik etki gösteren maddelere antibiyotik denir. Mikrobisid maddeler mikroorganizmaları öldürücü, mikrobiyostatik maddeler ise mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösterirler.

1.5.2. Antibakteriyel Maddelerin Sınıflandırılması

Antibakteriyel maddeler bakteriler üzerine beş farklı yoldan etki eder:

- 1-) Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu
 - Beta-laktam antibiyotikler, penisilinler, glikopeptid antibiyotikler
- 2-) Sitoplazma zarının fonksiyon ve yapısının bozulması
 - Polimksinler
- 3-) Protein sentezinin inhibisyonu
 - Amino glikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolid antibiyotikler
- 4-) Nükleik asit sentez ve fonksiyonlarının bozulması
 - Kinonlar, rifamisin, nitrofurantoin
- 5-) Kimyasal yapılarıdaki benzerlik yolu ile metabolizmanın bozulması
 - Sülfonamidler

1.5.3. 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.

Dilüsyon (Seri Seyreltme) Yöntemi
Difüzyon Yöntemi

1.5.3.1. Dilüsyon (Seri Seyreltme) 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.

1.5.3.2. 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 farkı antimikrobiyal maddelerin bir tek konsantrasyonunun etkinliği denenir. Disk-difüzyon yöntemine benzeyen, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) belirlenmesini sağlayan E-testi (dereceli antibiyotik şeridi yöntemi) kantitatif yöntem olarak kullanılır.

1.6. Enzimler

Enzim, protein yapısında olan, doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenebilen, hücre çoğalması, enerjinin veya besinlerin çevreden alınması ve enerjinin dönüşümü, metabolitlerin taşınması ve kısaca metabolizma olarak tanımlanan bütün hücre fonksiyonlarının gerçekleştirilmesi için gerekli olan biyolojik katalizörlerdir. Enzimler peptit zincirleri halinde temel yapı elemanları amino asitlerden oluşur ve kendilerine özel üç boyutlu yapıya sahiptir. Bu yapıları üzerinde substrat denilen molekülleri bağlayabilen ve katalitik etkinlik gösterebilen bölgeleri vardır. Kendilerine özel yapıları ile enzimler genel katalizörlerle karşılaştırıldıklarında oldukça önemli ve endüstriyel potansiyel taşıyan

özelliklere sahiptir. Bunlardan önemlilerinden birkaçı; yüksek düzeylerde reaksiyon hızları göstermeleri, ılımlı reaksiyon şartlarında biyokimyasal reaksiyonları katalizlemeleri ve oldukça yüksek düzeylerde reaksiyon ve substrat özgünlüğü göstermeleridir.

1.6.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz enzimi mikroorganizmalardan, yüksek yapılı canlılara kadar dağılım gösteren bir enzimdir. Organizmada; CO₂ taşınması, üre döngüsü, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, elektrolit sekresyonu, sindirim, hücrelerdeki iyon değişimi gibi olaylarda rol alır. Karbonik anhidraz (II) safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tübüler ve tükürük bezi kanallarının epitelyum hücrelerinde bol miktarlarda sentezlenir. Canlılarda α , β , γ olmak üzere 3 farklı karbonik anhidraz karakterize edilmiştir. Memelilerde α tipi vardır. Doku dağılımları, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı olan 14 karbonik anhidraz izoenzimi vardır. Çeşitli hastalıklarla doğrudan ilişkilidir. Karbonik anhidraz izoenzimleri Tablo-1’de verilmiştir.

1.6.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Tablo 1. Karbonik anhidraz izoenzimleri

İzoenzim	Hidrataz Aktivitesi	Hücre İçi Yerleşim
CA-I	Düşük	Sitozol
CA-II	Yüksek	Sitozol
CA-III	Çok Düşük	Sitozol
CA-IV	Yüksek	Plazma membranı
CA-V	Orta-Yüksek	Mitokondri
CA-VI	Orta	Tükürük
CA-VII	Yüksek	Sitozol
CARP-VIII	Yok	Sitozol
CA-IX	Yüksek	Plazma membranı
CARP-X	Yok	Sitozol
CA-XI	Yok	Sitozol
CA-XII	Düşük	Plazma membranı
CA-XIII	Düşük	Sitozol
CA-XIV	Yüksek	Plazma membranı

1.6.3. Enzim Aktivitesi ve İnhibisyonu

Karbonik anhidraz enziminin literatür de iki aktivitesi mevcuttur. Bunlar, hidrataz ve esteraz aktiviteleridir. CA enzim aktiviteleri belirlenirken hidrataz ve esteraz aktivitesi ölçümleri yapılır. Bu çalışmada esteraz aktivitesi yöntemi uygulanmıştır.

1.6.3.1. Hidrataz Aktivitesi Tayini

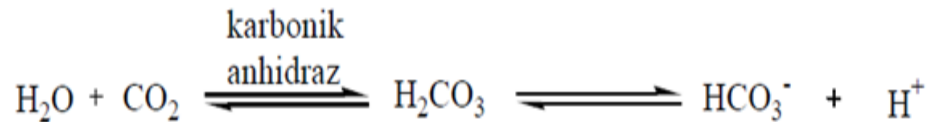
Bu metod Maren ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve zamanla üzerinde bazı değişiklikler yapılmıştır. Metodun temelinde ortamda substrat olarak bulunan CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺'un ortamın pH'sını 10'dan 7,4'e düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

$$E\ddot{U} = \frac{t_0 - t_n}{t_n}$$

EÜ: Enzim ünitesi

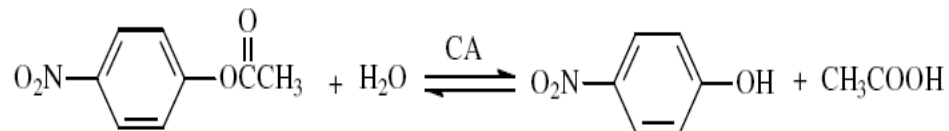
t₀: Enzimsiz denemede ölçülen süre

t_n: Numune mevcudiyetinde ölçülen süre



1.6.3.2. Esteraz Aktivitesi Tayini

Bu yöntemde de, karbonik anhidraz p-nitrofenil asetatı hidroliz ederek oluşan p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun 348 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi ve buradan aktivitenin hesaplanması temel alınmıştır.



1.6.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri aromatik ve heterosiklik sülfonamidler, inorganik, metal kompleks anyonlarıdır.

1.6.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Klinik Önemi

Karbonik anhidraz enzimi inhibitörleri tıpta antişlakom, antitiroid, ve antikanser özellikleriyle kullanılmaktadır. Günümüzde şlakom hastalığında göz tansiyonunun düşürülmesinde karbonik anhidraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu bileşikler dorzolamid ve brinzolamidtir. Karbonik anhidraz inhibitörleri ayrıca epilepsi ve diğer bazı nörolojik hastalıklar, gastrit, yüksek seviyede idrar söktürücü özelliğiyle, osteoporozda ve tümör tedavisinde kullanılmaktadır.

Karbonik anhidraz inhibitörleri aynı zamanda PET ve MRI görüntüleme sistemlerinin gelişmesinde gelecek vadeden ve çalışma konusu olan bileşiklerdir. Sülfonamidler birçok bakterinin gelişmesini durdurmaktadır ve sıtma mikrobusunun karbonik anhidraz aktivitelerini inhibe ederek öldürülmesinde kullanılması amaçlanmaktadır.

1.7. Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikler

Uçucu yağlar, bitkilerden ya da bitkisel droglardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, su buharı ile sürüklenebilen ve kolaylıkla kristalleşebilen uçucu özellikte, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır. Uçucu yağlar açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabildiklerinden bunlara uçucu yağ veya eterik yağ denilmektedir. Bunun yanı sıra parfüm sanayisinde sıkça kullanıldıkları için esans olarakta adlandırılırlar. (Ceylan vd, 1987). Uçucu yağlar bitkinin tüm organlarında veya bitkinin belirli bir organında bazen de bir organın belirli dokularında da bulunabilir. Uçucu yağın bitkide ya protoplazmada ya da hücre çeperinin özel bir tabakasında oluştuğu ileri sürülmekle birlikte glikozitlerin hidrolizi yoluyla da meydana gelebildiği belirlenmiştir (Baytop, 1999; Baytop, 1972; Özyurt, 1992). Birçok sekonder metabolitler olan uçucu yağları normal büyüme gelişim dönemlerinde ya da patojen saldırılara karşı

veya strese tepki olarak üretmektedirler (Skocbusic, 2006). Uçucu yağların bitkilerde neden oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Bazı araştırmacılara göre artık ürün olarak kabul edilen uçucu yağlar, koruyucu ajanlardır ve bitkinin yaralanması sonucu meydana gelen reçinelerin çözünmesini sağlarlar. Uçucu yağların böcekleri kaçırma ya da çekmek için oluştuğunu düşünenlerde vardır. Buna bağlı olarak ya bitkiyi korurlar, ya da tozlaşmaya yardımcı olurlar (Baytop, 1986). Uçucu yağlar taze iken genellikle renksiz veya açık sarı renklidir. Fakat karanfil yağı gibi sarıdan kahverengiye veya papatya yağı gibi yeşilden maviye kadar değişik renkte olanları da vardır. Uzun süre saklamada, ışık ve oksijenin etkisi ile oksitlenerek bazıları koyulaşıp reçineleşebilir. Bu durumda genellikle bir koku değişimine ve yağın kalitesinin azalmasına sebep olur. Bu nedenle yağlar serin bir yerde ve ışıktan korunmak için koyu renkli şişelerde saklanmalıdırlar (Burt, 2004; Baytop, 1972; Özyurt, 1992; Tanker, 1990). Fiziksel özellikleri yönünden birbirlerine genellikle benzerler ve genel olarak kırılma indisleri yüksektir. Optikçe aktifirler ve yağların polarize ışığı spesifik olarak çevirmeleri yağı tanıtmaya yarayan önemli özelliklerden birisidir, kırılma indisinde polarize ışığı çevirmede meydana gelen değişimler, yağın saflığının bozulduğunu gösterir. Uçucu yağlar su ile karışmayan maddeler oldukları halde, kokularının suya geçmesine yetecek oranda suda çözünürler. Petrol eteri, benzen, eter, etanol, hegzan gibi organik çözücülerde çözünürler (Özyurt, 1992; Tanker, 1990). Uçucu yağları tanımak için bitkisel doku kesitlerinde ve drog tozlarında Sudan III boyası kullanılır. Bu boya uçucu ve sabit yağlara turuncu bir renk vermektedir. Kesitler bir süre ısıtıldığında ya da sulu etanol ile yıkandığında yağ damlacıkları kaybolursa uçucu yağ, kaybolmuyorsa sabit yağ olduğu anlaşılmaktadır. Bugüne kadar araştırılan 300 bitki familyasından % 30 'dan fazlasının uçucu yağ içerdikleri anlaşılmıştır. Aromatik bitkilerde uçucu yağ oranı % 0,01 ile % 20 arasında değişkenlik göstermektedir (Baytop, 1972).

1.7.1. Uçucu Yağların Sınıflandırılması

1.7.1.1. Kimyasal Bileşimlerine Göre

Uçucu yağların kompozisyonunu oluşturan kimyasal maddeleri, terpenik maddeler, aromatik maddeler, düz zincirli hidrokarbonlar ile azot ve kükürt taşıyan bileşikler diye dört grup altında toplayabiliriz. Günümüzde uçucu yağların yapısında 2000'den fazla kimyasal bileşiğin bulunduğu gösterilmiş olup, bunların % 90'ı terpenik maddelerden

oluşmuştur. Yapılarında bugün 150 'den fazla monoterpen, 1000 kadar seskiterpen ile diterdenler bulunmuştur. Bunların yanında alkoller (benzin alkol, sinnamik alkol, sitronellol), organik asitler (asetik asit, benzoik asit, sinnamik asit), fenoller (karvakrol, kativol, timol), ketonlar (kafur, karbon, pul egon), aldehitler (benzaldehit, sinnamik aldehit, sitral), esterler (benzin benzoat, bornil asetat, granit asetat), fenol esterleri (anetol, öjenol, saf rol), ve diğer bileşikler (sülfür, nitrojen, kumarin) bulunmaktadır. Uçucu yağların kendisine has kokusu ve tadı, tarpanların oksitlenmesi ile oluşan oksijenli türevlerden ileri gelir (Dorman, 2000; Ceylan, 1987).

1.7.1.2. Aromatik Özelliklerine Göre

Uçucu yağlar koku ve tat özelliklerine göre de sınıflandırılabilirler. Buna göre uçucu yağlar; “aromatik” (çok kokulu ve tadı iyi olanlar), “aromatik-aroma” (kokulu ve acı tadı olanlar), “aromatik-acria” (kokulu ve tadı keskin olanlar) diye üçe ayrılır (Ceylan, 1987).

1.7.1.3. Farmakolojik ve Terapötik Etkilerine Göre

Uçucu yağlar farmaside farmakolojik ve terapik etkilerine göre de gruplandırılır. Uçucu yağların sinir yatıştırıcı, deriyi kızartan, uyarıcı, balgam söktürücü, öksürüğü kesen, idrar söktürücü, midevi, safra sökücü, solucan düşürücü ve antiinflamatuvar, antiseptik, antibiyotik, antifungal, antioksidan, sedatif etkilerine göre bir gruplandırmaya tabii tutulurlar (Zeybek, 2002; Bağci, 2005). Uçucu yağların çoğu toksak etki gösterir. Mukozayı tahriş eder, sinir sistemini uyuşturur. Toksak etki lipitlerde erimelerinden ve hücre içine girerek plazmayı bloke etmelerinden ileri gelir. Uçucu yağların birden fazla maddeden oluştuğu dikkate alınır, aynı uçucu yağın değişik amaçlarla kullanılması da doğal sayılır. Bugün uçucu yağlar yerine, daha çok içindeki terpenik veya aromatik etken maddeler ilaç olarak kullanılmaktadır.

1.7.2. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Uçucu yağlar bitkilerden, miktarlarına ve bileşenlerinin özelliklerine bağlı olarak ve diğer bir yönden de uçucu yağ elde edilecek bitki kısmına göre değişik şekillerde elde edilir.

1.7.2.1. Destilasyon Yöntemi

Destilasyon yöntemi, bitki materyallerindeki bütün uçucu maddeleri buharlaştırma ve yoğunlaştırma yoluyla ayırma yöntemidir. Bu yöntem ucuz ve kolay olup uçucu yağı kolaylıkla veren bitkiler için uygulanır. Genellikle çiçekler doğrudan, yapraklar hafif ufalandıktan sonra, kök vs. ise küçük parçalara ayrıştırıldıktan sonra destile edilirler. Bitkiler çok ince toz haline getirilmemelidir. Portakal çiçeği, gül, lavanta, anason, karanfil, nane, kekik, adaçayı gibi bitkilerde bu yöntem uygulanır. Uçucu yağların elde edilmesinde beş tip destilasyon yönteminden faydalanılır.

1.7.2.1.1. Su Destilasyonu

Kuru bitki materyali destilasyon aygıtı içinde sıcak su ile kaynatılır. Oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağ soğutucuda yoğunlaştırılarak bir kaptan toplanır. Kaptan su ve yağ tabakası ayrılır ve uçucu yağ alınır. Geleneksel olarak uçucu yağ üretiminde kullanılan imbikler ve laboratuvar tipi Clevenger aygıtı bu yöntem için kullanılır.

1.7.2.1.2. Su ve Buhar Destilasyonu

Hem kuru hem de taze bitkisel materyale uygulanabilir. Bu metotta bitki doğrudan doğruya sıcak su ile değil, buharla temas etmektedir. Maserasyona tabi tutulmuş materyalden su buharı geçirilerek uçucu yağlar ayrıştırılır. Su buharı başka bir yerde elde edilir ve bir boru yardımıyla maseratin içine yöneltilir. Yüksek ısı ile parçalanma olasılığı böylece ortadan kalkmış olur. Su buharı ile sürüklenerek soğutucu ünitesine gelen uçucu yağlar yoğunlaşarak toplama kabında birikir.

1.7.2.1.3. Buhar Destilasyonu

Daha çok taze bitki materyallerine uygulandığından ve bu taze materyal yeterince su taşıdığından materyal Maserasyona tabi tutulmaz ve Destilasyon kazanının ızgarası üzerine konan materyalin içersinden doğrudan sıcak su buharı geçirilir. Basınç ile taze bitki parçalarına yöneltilen buhar, yağ damlacıklarını da beraber sürükleyerek toplama kabına getirir ve toplama kabında biriktirilir.

1.7.2.1.4. Kuru Destilasyon

Bazı droglar kuru kuruya ısıtıldıkları zaman uçucu maddeler kısmen oldukları gibi kısmen de parçalanarak distile olurlar. "Pirojenasyon" adını alan bu işlem özel çelikten yapılmış imbiklerde uygulanır. Materyal odun ya da dal ise küçük parçalar halinde kazanlara doldurulur ve yüksek sıcaklıkta havasız ortamda kuru kuruya destile edilir. Destilasyon ürünleri soğutucudan geçirilerek toplama kabında toplanır.

1.7.2.1.5. Hidrodifüzyon

Bitkisel dokulardaki uçucu yağın bir kısmı yüzeyde bulunurken, bir kısmı da iç kısımlarda bulunur. Yüzeye yakın yerlerdeki uçucu yağ buhar ile almak kolaydır. Yüzeye yakın olmayan bölgelerdeki uçucu yağ ise ancak difüzyon işleminden sonra yüzeye ulaşır. Hidrodifüzyon işlemi endüstride normal buhar destilasyonunun aksine buharın bitkisel materyal dolu kazana üstten verilmesi ve alttan çıkan buharın yoğunlaştırılması şeklinde uygulanır. Hidrodifüzyonun getirdiği birtakım avantajlar vardır. Özellikle kazanın yüklenmesi ve boşaltılması işlemleri düşünüldüğünde kullanım kolaylığına sahiptir. Sadece düşük basınçta ıslak buhar kullanılır. Destilasyon süresi kısadır, daha az buhar harcadığı için daha az masraflıdır. Destilasyon süresinin kısa olmasından ve riflaks olayı gerçekleşmediğinden dolayı yağın bileşikleri hidrolize uğramazlar. Üretilen yağların fiziksel özellikleri standart değerlere uygunluk gösterir.

1.7.2.2. Mekanik Yöntem (Presleme Yolu) ile Uçucu Yağ Elde Edilmesi

Bazı droglardan destilasyon yöntemi ile uçucu yağ elde edilmek istendiğinde droglardaki uçucu yağ bozulmaktadır. Bu nedenle bu tip droglardan mekanik yöntemle yağ elde edilmektedir. Bu yolla genel olarak portakal, limon, bergamot ve mandalina gibi turunçgil meyve kabuklarından uçucu yağ elde etmeye uygundur. Mekanik yöntemle uçucu yağ elde etmek için preslerde sıkma veya benzeri cihazlar kullanılır. Bu şekilde elde edilen usareler genel olarak berrak değildir. Bunları berraklaştırmak için; uygun bir filtreden süzülür santrifüj yapılarak içindeki partiküllerden ayrılır, alkol ilave edilerek veya ısıtılarak bulanıklık yapan maddeler uzaklaştırılır. Bu şekilde soğuk presle uçucu yağ elde edilir.

1.8. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon bir çözelti ya da süspansiyon içindeki organik maddeyi, çözen fakat çözelti ya da süspansiyondaki çözgen ile karışmayan bir başka organik çözgen yardımıyla ayırmaktır. Kimyada bilinenin aksine bir saflaştırma değil ayırma yöntemi olarak kullanılır. Asidik, bazik ve nötral organik bileşiklerin ayılmasında ya da saflaştırılmasında kimyasal aktif ekstraksiyon yöntemi kullanılır. Buna göre asidik bir madde uygun bir baz ile, bazik maddede uygun bir asit ile tepkimeye sokularak tuz oluşturulur ve su fazına çekilmesi sağlanır. Her ekstraksiyondan sonra nötral yapıdaki bileşik organik fazda kalacak ve sulu faz ayırma hunisinin alt kısmında yer alacaktır (URL-1, 2006).

1.8.1. Ekstraksiyon Çeşitleri

1.8.1.1. Sıvı-sıvı ekstraksiyon

Sıvı-sıvı ekstraksiyon'da ayırma hunisi kullanılır. Bu yöntem iki sıvının yoğunluk farkından yararlanılarak uygulanır. Karışım ayırma hunisine konulduğunda yoğunluğu küçük olan sıvı üstte, büyük olan ise altta toplanır. Yoğunlukları birbirine yakın olan maddeler kolay ayrılmaz. Bu durumda su fazını, NaCl gibi bir tuzla doyurup yoğunluğunu arttırmak gerekir ya da ayırma hunisini çalkalayarak ayrılma sağlanır. Su içindeki organik maddeyi, organik çözücü fazına alabilmek için ayırma hunisi çalkalanırken çalkaladıkça

oluşan gazın çıkması için musluk hafifçe açılır. Gaz çıkışı bitene kadar bu işlem devam ettirilir. Daha sonra üstteki faz musluğun hizasına gelinceye kadar alt faz huniden boşaltılır. Sonra üst faz üst kapaktan alınır. Çünkü bu faz da musluktan akıtılırsa altta az da olsa kalmış olan diğer madde üst faza karışıp safsızlık oluşturabilir.

1.8.1.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyon

Katı-sıvı ekstraksiyon başlıca doğal ve biyolojik örneklerle ilgili uygulamalarda kullanılır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda katının içerdiği maddelerden biri veya bir bölümü uygun bir çözügen ile ekstrakte edilir. Katıların ekstraksiyonu genellikle uzun zaman aldığı için sürekli ekstraksiyon yöntemleri tercih edilir. Maddenin katı içinden diffüzyonu yavaş bir işlem olduğu için katı örnek ince toz haline dönüştürüldükten sonra ekstrakte edilmelidir. Böylece maddenin çözügenle daha fazla teması sağlanır. Katı-sıvı ekstraksiyonda ise Soxhlet Ekstraktörü denen bir cihaz kullanılır.

1.8.2. Ekstraksiyon Yöntemi

Bitkisel materyalden etken maddeleri elde etmek için çözücüler kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Ekstraksiyon yöntemi kullanılan çözücü maddenin cinsine göre üç farklı şekilde yapılabilmektedir.

1.8.2.1. Organik Çözücü ile Ekstraksiyon

Bitkisel materyal, uçucu yağ kolaylıkla çözebilen benzen, heksan, petrol eteri, kloroform gibi kaynama noktası düşük organik çözücülerle eritilir. Organik çözücünün alçak basınçta uçurulması ile bir miktar (sabit yağ, boya maddeleri, mum vs.) yabancı madde içeren uçucu yağ elde edilir ki bu karışıma konkrem denir. Konkrem, önce alkolle muamele edilir ve sonra vakum distilasyonu ile alkol uçurulur Böylelikle absölü (absolute) adı verilen, pahalı ve kullanılması kolay bir yağ elde edilmiş olur.

1.8.2.2. Sabit Yağ ile Ekstraksiyon

Uçucu yağ miktarının az olduğu ve diğer distilasyon yöntemlerinin uygun olmadığı durumlarda kullanılır. Bu yöntemde bitkisel materyal bir sabit yağ ile belli bir süre temasta bırakılır. Zamanla uçucu yağ sabit yağa geçer. Bu işlem soğuk yağ veya sıcak yağ ile yapılmaktadır. Özellikle parfümeri endüstrisinde kullanılan bir yöntemdir.

1.8.2.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Son yirmi yılda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SC) artan bir ilgi ile bilinen ekstraksiyon metotlarına karşı ilginç alternatif bir metot olarak dikkat çekmektedir. SC, destilasyon, Soxhlet, sıvı ekstraksiyon ve sıvı kromatografisi gibi diğer metotlarla başarılabilen üstünlükleri sağlayan yeni bir metottur. Bu metot da çözgen tüketimi ve basamak sayısı azalmakta, analiz süresi kısalmaktadır. Çözgen tüketimi hacminin azaltılması sadece yüksek fiyatlardan kaçınmak açısından değil, çevreye verilme problemi bakımından da önemlidir. Süperkritik akışkanların önemli özelliği çözme gücünün, yoğunluktaki değişimler yolu ile kontrol edilebilmesidir. Farklı polarite ve molekül boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanımı ile ekstrakte edilebilmektedir. Ayrıca SC akışkan hızı, süperkritik akışkanda moleküllerin difüzyon katsayıları bir sıvı ortamındakinden daha fazla olması nedeni ile yüksektir. Bu metot kolaylıkla otomatikleştirilebilmekte ve kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle birleştirilebilmektedir (URL-2, 2004). Gıda ve ilaç endüstrisinde, değerli ve ortam koşullarına duyarlı hammaddelerin SC kullanılacak akışkanın seçimi son derece önemlidir. Bu seçimde, hammaddenin akışkan içinde çözünürlüğü; kimyasal kararlılığı; ekonomik ve kolay bulunabilen bir akışkan olması ve akışkanın toksik, patlayıcı ve yanıcı olmaması gibi sorunları göz önünde tutulmalıdır.

1.9. Doğal Bileşik Çalışmalarında Kullanılan Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbiriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılmasıdır. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen

hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Bu iki faz öyle seçilir ki numunenin bileşenleri hareketli faz ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecelerde dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla sadece yavaşça hareket ederler. Öte yandan sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler ise hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilen ayrı bantlar içinde ayrılırlar (Skoog vd., 1998).

Ayrırma mekanizmalarına göre ve ayırıcı materyale göre çeşitli kromatografi teknikleri vardır.

Ayrırma mekanizmalarına göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

- a) İyon değiştirme kromatografisi
- b) Jel filtrasyon kromatografisi
- c) Adsorpsiyon kromatografisi
- d) Partisyon kromatografisi
- e) Affinite kromatografisi

Ayırıcı materyale göre kromatografi çeşitleri şunlardır:

a) Düzeyssel kromatografi:

İnce tabaka kromatografisi

Kağıt kromatografisi

b) Kolon kromatografisi:

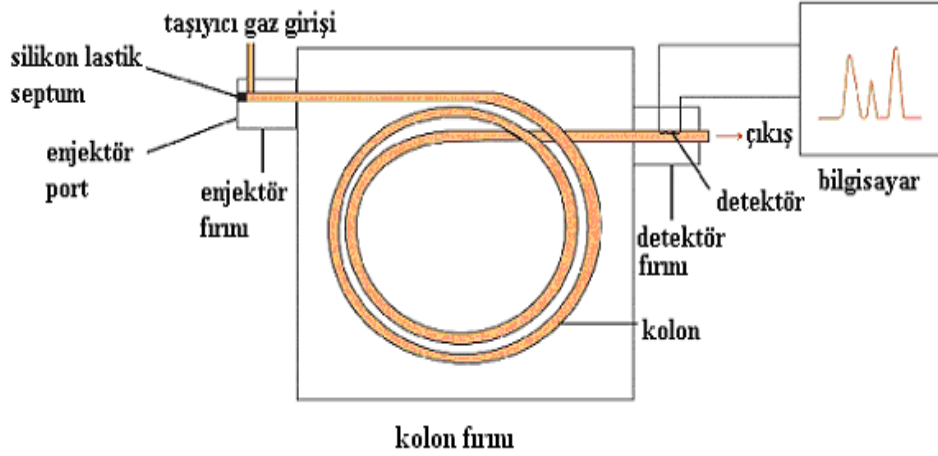
Gaz kromatografisi (GC)

Likit kromatografisi (LC)

Yüksek performans likit kromatografisi (HPLC)

1.9.1. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi uçucu organik bileşikleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Tipik bir modern gaz kromatografisi sistemi bir gaz hareketli faz kaynağı, bir enjeksiyon portu, sabit faz içeren bir ayırma kolonu, bir dedektör ve bir veri kayıt sisteminden oluşmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Genel bir gaz kromatografi sistemi

Kolon boyunca numuneyi ilerletmek için hareketli faz olarak genellikle hidrojen, helyum ya da azot gibi kimyaca inert gazlar taşıyıcı gaz olarak kullanılır. Gaz akış hızını sabit tutmak için akış metreler ve basınçölçerler kullanılır. Kapiler gaz kromatografisi (CGC), günümüzde uygulanan en yaygın gaz kromatografi (GC) formudur. CGC’de küçük iç çaplı (milimetrenin onda birkaçı) kapiler sabit faz ile kaplıdır. Çoğu kapiler kolonlar dışı poliimidle kaplı eritilmiş silikadan yapılmıştır. Bu kolonlar esnekler ve bu sayede çok uzun bir kolon küçük bir bobin halinde sarılabilir. Organik bileşikler kolonda hareketli faz ve sabit faz arasında farklı dağılım davranışlarından dolayı ayrılırlar. GC kolonlarında en yaygın sabit fazlar polisiloksanlardır ki onlara fazın polaritesini değiştirmek için çeşitli substituent gruplar eklenir. En apolar sabit faz polidimetilsiloksandır, ki fenil ve/veya siyanopropil grupları polimerin üzerine eklenerek daha polar yapılabilir. Çok polar analitler için polietilen glikol (örneğin Carbowax 20M) yaygın bir şekilde sabit faz olarak kullanılır (URL-3, 2006).

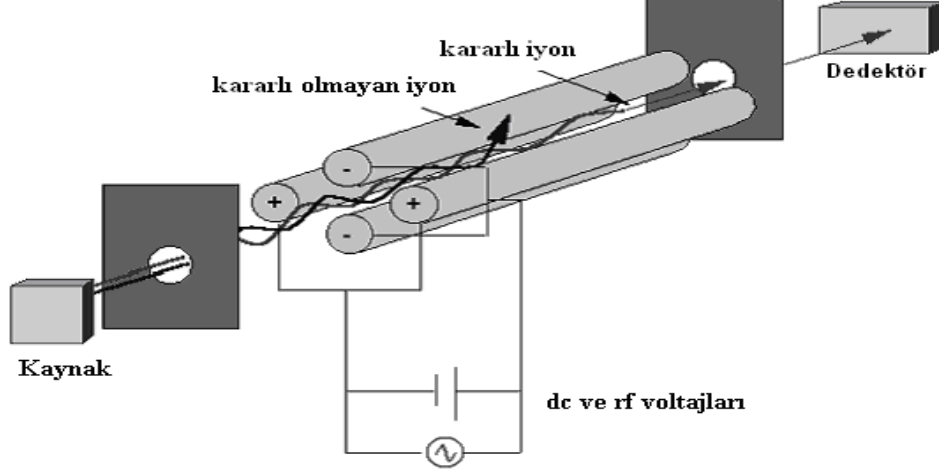
Kolon sıcaklığı hızlı bir şekilde artıp azalabilen bir fırının içinde tutulur. Sıcaklık arttıkça kaynama noktası düşük olan bileşikler yüksek olanlardan daha erken kolondan ayrılırlar. Bundan dolayı sıcaklık ve önce de ifade edilmiş olan sabit faz etkileşimleri gerçekte iki ayrı ayırma kuvvetleridir. Enjeksiyon sistemi için iki önemli gereksinim vardır. Enjeksiyon kromatografik bant genişlemesine neden olmamalı ve analiz edilecek numune kolonun içine kalitatif ve kantitatif değişime uğramadan taşınmalıdır (Sandra, 2004). GC vasıtasıyla geniş çeşitlilikte bileşikler ve numuneler analiz edilebildiği için çeşitli enjektörler geliştirilmiştir. Enjektörler evrensel ve seçici olmak üzere ikiye bölünebilir. Evrensel enjektörler; a) direkt, b) split- splitless, c) kolonda soğuk ve e)

sıcaklık programlı buharlaşma (PTV) enjektörleridir (Sandra, 2004). En yaygın enjeksiyon sistemi split-splitless enjeksiyondur ve mevcut çalışmada da bu enjeksiyon kullanıldığı için yalnızca bu enjeksiyon metoduna özetle değinilecektir. Kapiler gaz kromatografisinde kapiler kolonun düşük numune hacminden dolayı ve bant genişlemesinden kaçınmak için split enjeksiyon yaygın şekilde kullanılır. İki enjeksiyon valfi sayesinde buharlaşma bölümünde hem taşıyıcı gaz hem de taşıyıcı gaz ile numune buharlarını içeren gaz karışımının akışı düzenlenir. Buharlaşma bölümü 250–300 C'e kadar ısıtılan bir cam veya kuartz tüp (6–12 cm uzunluğunda, 3–4 mm i.d.)'den oluşmaktadır. Split enjeksiyonun en önemli dezavantajı numunenin çoğu ayrılma ve kaydetmeden önce sistemden çıktığı için duyarlılığının sınırlı olmasıdır. Bu yüzden gerektiğinde duyarlılığı yüksek olan splitless enjeksiyon kullanılır. Bu durumda split valfi enjeksiyon esnasında kapatılır ve buharlaşma bölümünden kolona gönderilir (Sandra, 2004). Dedektörün amacı kolonda ayrılmalarından sonra hareketli fazdaki analitlerin varlığını kaydetmektir. Dedektör bir bileşiğin varlığı tespit edildiğinde elektrik sinyali oluşturma kapasitesine sahiptir. Sinyal var olan analitin miktarıyla doğru orantılıdır. Dedektörün en önemli özellikleri duyarlılık, dinamik aralık ve seçiciliktir. Kromatografide koşturma esnasında bilgisayar dedektör sinyalinden bir grafik üretir. Bu grafiğe kromatogram denir. Bir bileşik GC kolonundan dedektöre elue edildiğinde kromatogramda oluşan pik, üretilen sinyali temsil eder. Kromatogramda x-ekseni alıkonma zamanını, y-ekseni sinyalin şiddetini (bolluk) gösterir. GC'de kullanılan pek çok dedektör tipleri içinde en önemlileri alev iyonlaşma dedektörü (FID), elektron yakalama dedektörü (ECD) ve kütle spektrometrik dedektördür (MS).

1.9.1.1. Kütle Spektrometrik Dedektör

Kütle spektrometresi yüklü moleküler iyon veya fragmentler olarak analitlerin kaydedilmelerine dayanan bir spektrometrik tekniktir. Kütle spektrometreleri temel olarak üç parçadan oluşurlar ki bunlar iyonlaşma kaynağı, kütle analizci ve dedektördür. Kütle spektrometresinin iyonlaşma kaynağında analit molekülleri iyon haline dönüştürülür. Bu genellikle elektron impakt (EI) veya kimyasal iyonlaştırma (CI) sayesinde gerçekleştirilir. Bileşikler tek tek GC kolonundan elue edildikçe elektron iyonlaşma bölgesine girerler. Burada elektron akışıyla bombardımana uğratılırlar ki, bu onların fragmentleri halinde bölünmelerine sebep olur. Bu fragmentler orijinal molekülün büyük ya da küçük parçaları olabilir. Fragmentler gerçekte belli kütlelere sahip yüklü iyonlardır. Fragmentin yüküne

bölünen kütlesi yük/kütle (m/z) oranı olarak adlandırılır. Çoğu fragmentler +1 yüküne sahip oldukları için m/z genellikle fragmentin molekül ağırlığını temsil eder (Baugh, 1993).



Şekil 9. Bir kuadrupol kütle analizörünün şematik diyagramı

GC'de en yaygın kullanılan analizörlerden biri de kuadrupoldur. Kuadrupol analizci (Şekil 9) bir kare tutucu içinde tutulan dört silindirik metal çubuktan ibarettir. Karşılıklı çubuklar elektriksel olarak birbirine bağlıdır; bir çift, değişebilir doğru akım kaynağının pozitif ucuna, diğer çift ise negatif ucuna bağlanır (Skoog vd., 1998). Çubuklar arasındaki bölgede elektrostatik alan üretilip salınarak bir doğru akım voltajı (DC) ve bir radyo frekansı (RF) çubuklara uygulanır (URL-4, 2006). İyonlar, çubuklar arasındaki kuadrupolden aşağıya geç ederler. Doğru akım voltajına radyo frekansı bolluğunun oranına bağlı olarak iyonlar elektrik alanda bir salınım kazanırlar. Doğru kütle/yük oranına sahip olmayan iyonlar (ya çok küçük ya da çok büyük) kararsız bir salınıma maruz kalırlar ve çubuklara saldırırlar. Doğru kütle/yük oranına sahip olan iyonlar ise sabit bolluğun kararlı salınımına maruz kalırlar. Bu iyonlar çubuklara çarpmadan analizci boyunca geçer ve dedektöre ulaşırlar. Böylece özel iyonlar seçilebilir veya değişen voltajlarla taranabilirler. Kuadrupoller m/z 'lerin bir oranı gözleninceye kadar diğer birinin baştan sona çevrimi için programlanabilir (Baugh, 1993). Bu saniyede pek çok defa gerçekleşir. Oranların her bir çevrimi bir tarama olarak ifade edilir. Günümüzde m/z 20 ve m/z 400 arasındaki iyonların taranması 1-100 s içinde gerçekleşebilir. Bilgisayar her bir tarama için bir grafik kaydeder. x-Ekseni m/z oranını ve y-ekseni tarama esnasında kaydedilen her bir fragment için şiddeti

(bolluk) temsil eder. Bu şekilde oluşturulan grafiğe kütle spektrumu denir (Baugh, 1993). Sistemin kütle aralığı değişken RF/DC oranıyla ayarlanır. Operasyon kütle aralığı genellikle 1000'dir fakat bu tip kütle analizcileri ile 4000'in üstüne gayet makul olarak çıkarılabilir. Pek çok bileşiğin kütle spektrumu bilinir ve bunlar GC-MS enstrümanı kütüphanesinde mevcuttur. Kütüphane, örneğin spektrumu ile mevcut spektrumları karşılaştırarak sonuçları benzerliklerin istatistiksel bir ifadesi olarak bildirir.

1.9.1.2. Alev İyonlaşma Dedektörü (FID)

Alev iyonlaşma dedektörü, gaz kromatografide en yaygın biçimde kullanılan dedektördür. Kolondan gelen gaz, hidrojen ve hava ile karıştırılıp elektrik çakmağı ile tutuşturularak alev meydana getirilir. Hidrojen /hava alevinde yakılan organik bileşiklerin birçoğu iyon ve elektronlar meydana getirir. Bunlar alevden elektrik akımının geçmesine yardımcı olurlar. Bekin ucu ile üzerinde bulunan toplayıcı elektroda birkaç yüz voltluk potansiyel uygulanırsa 10-12 amper kadar akım oluşur. Bu akım bir işlemsel yükselticiye ölçüm için gönderilir. Alev iyonlaşma dedektörü, dedektöre birim zamanda giren karbon sayısına cevap verdiği, yani dedektör sinyali, aleve giren maddenin derişimiyle değil verdiği C atomları sayısı ile orantılı olduğu için, kütleduyarlı dedektördür.

Karbonil, alkol, halojen ve amin gibi fonksiyonel gruplar alevde hiç iyon vermez, ya da çok az iyon verirler. Ayrıca yanmayan H₂O, CO₂, SO₂, ve NO_x gibi gazlara da duyarlı değildir. Bu özellikler alev iyonlaşma dedektörünü, su ve azot veya kükürt gazları ile kirlenmiş birçok organik maddenin tayininde çok uygun bir dedektör haline getirmektedir. Alev iyonlaşma dedektörünün suya karşı duyarlı olmayışı bu dedektörü özellikle doğal sulardaki kirleticilerin tayininde yararlı hale getirmektedir. Dedektörün duyarlılığı çok yüksektir (10-13 g/s), doğrusal çalışma aralığı geniştir (~107) ve gürültüsü azdır. Genellikle dayanıklıdır ve kolay kullanılabilirler. Alev iyonlaşma dedektörünün sakıncası ise numuneyi parçalıyor olmasıdır.

1.9.2. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel v.b. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin

ayrılma ve belirlenmesi için uygulanan analitiksel bir tekniktir. Numunelerdeki bileşikler sıvı hareketli faz ve sabit faz arasında dağılım davranışlarındaki farklılıklardan dolayı kolon boyunca farklı hızlarda göçerler. HPLC enstrümanları bir hareketli faz deposu, bir pompa, bir enjektör, bir ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), bir kolon ısıtıcısı, bir dedektör ve bir integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal alıcısı içerirler. Tipik bir HPLC çalışması bir lineer değişim kullanarak karıştırılan iki çözücü ve kolon boyunca belli bir akış hızını içerir. Çözücülerin değişikliği ve ilaveler ayırmanın seçiciliğini optimize etmek için kullanılır. Çözücülerin bulunduğu hareketli faz depoları kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır (Skoog vd., 1998). Pompa yüksek basınçta sabit serbest-vuruş akışı sağlar ve ayırma esnasında çözücülerin çeşitli kompozisyonlarına programlanabilir. Akış hızı kolonun iç çapına bağlıdır; kolonda küçük iç çapı küçük akış hızı gerektirir. Analitik HPLC için tipik olarak 0,5–5 ml/dk akış hızı 400 bar'a kadar çalışan pompalar tarafından üretilebilir. Genellikle modern LC için en faydalı ve yaygın kullanılan örnek verme düzeneği bir enjeksiyon valfinin kullanımına bağlıdır. Bu valfler akışın önemli derecede bozulmaksızın basınçlı kolonun içinde numunenin tekrarlanabilir girişi için kullanılır. Valfli enjeksiyon hızlı, tekrarlanabilir ve özellikle 400 bar'a kadar %0.2'den daha az hata ile numune hacminin (60 ml'den birkaç mililitrelere kadar) geniş bir aralıkta operatör bağımsız olarak dağıtımına müsaade eder (URL-5, 2006). HPLC ile ayırmalar farklı operasyon tipleri kullanılarak başarılıdır. Özel bir uygulama için seçilen tip, ayrılacak analit(ler)in özelliklerine bağlı olacaktır (Lindsay, 1987). Çoğu HPLC ayırmalar dağılıma tipinde çalışılır. Dağılıma kromatografisi hareketli ve sabit fazlarının bağlı polarlığına bağlı olarak iki temel forma ayrılabilir (Skoog, 1998). Normal faz (NP) durumunda, sabit faz hareketli fazdan daha polardır ve en az polar analitler ilk elue edilirler. Analit tutunması hareketli fazın polaritesi arttıkça azalır. Ters faz kromatografide (RP), sabit faz hareketli fazdan daha az polardır. En polar analitler ilk elue edilirler ve analitin tutunması hareketli fazın hidrofobikliği arttıkça azalır. Yaklaşık olarak tüm HPLC analizlerinin %80'i RP tipinde çalışılır. Ters faz kolonlar silikondan modifiye edilirler. Silika jelde modifiye olan Oktal (C8) ve oktadesil (C18) en yaygın kullanılan fazlardır. HPLC kolonlar (genelde 3-5 m) dar bir boyut dağılımına sahip küçük partiküllerden oluşur ki bunlar apolar fonksiyonel grupların kullanımıyla modifiye edilirler. Mikro partiküllü materyaller yüksek basınçta kolon boyunca pompalanan hareketli fazı gerekli kılarlar. Kolonlar laboratuarda hazırlanabilir fakat çoğu analistler ticari olarak hazır

kolonlar satın alırlar. Analitik kolonun bozulmalardan korunması için bir koruyucu kolon, kolon ile enjeksiyon aletinin arasına kurulur. Farklı boyutlardan kolonlar kullanılabilmesine rağmen, günümüzde 100–250 mm boyunda, 3–5 mm iç çaplı 5 m sabit faz materyaliyle paketlenmiş kolonlar çoğu uygulamalar için mantıklı bir zamanda yeterli ayırımı sağlamaktadır. Son otuz yılı aşkındır pek çok LC detektörler çeşitli ilkelere dayandırılarak geliştirilmiştir. Fakat yine de yalnızca onlardan yaklaşık on iki tanesi LC analizleri için etkin bir şekilde kullanılır ve bunların da yalnızca dördü yaygın kullanımdadır. LC analizinde kullanılan baskın detektörler UV detektör (sabit ve değişebilen dalga boyu), refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometredir (URL-6, 2006). Mevcut çalışmada yalnızca UV ve MS detektörler kullanıldığı için burada yalnızca onlar tartışılacak.

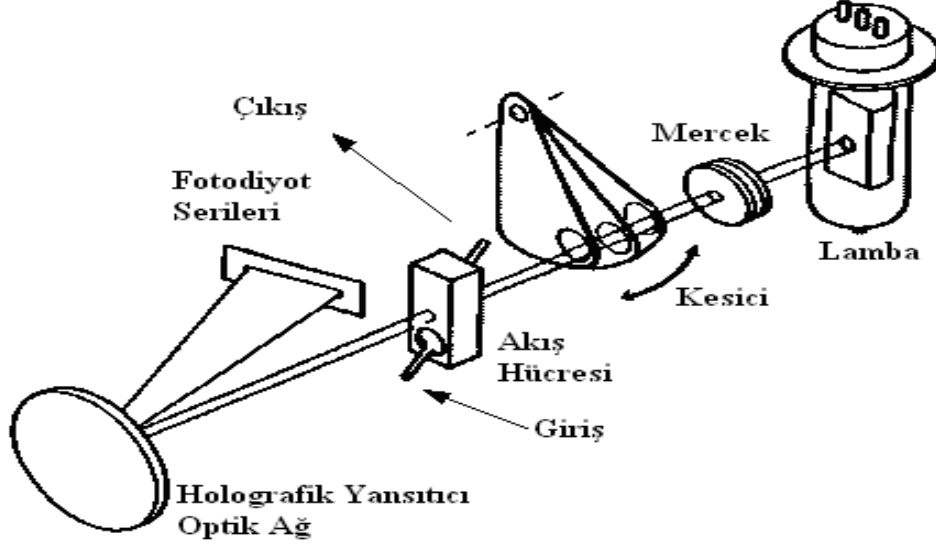
1.9.2.1. HPLC’de Kullanılan Dedektörler

HPLC donanımında olan dedektörler, örnek bileşenlerini tayin ederken ölçtükleri fiziksel özelliklere göre sekiz çeşittir (URL-7, 2006).

A) Ultraviole / Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviolet / Visible dedector - UV/VIS): Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür. Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm’den 800 nm’ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (VIS) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltiden sürekli olarak ışın geçerken analitler tarafından ışının bir kısmı absorbe edilebilir. Bu gerçekleştiğinde geçen ışın bir prizmanın içinden geçtiğinde bir spektrum üretilir ve bu absorpsiyon spektrumu olarak adlandırılır. Bir enerji absorpsiyonunun sonucu olarak atomlar ve moleküller düşük enerjili seviyeden (başlangıç ya da temel hal) daha yüksek bir seviyeye (uyarılmış hal) geçer. Absorbe edilen elektromagnetik enerji uyarılmış ve temel haller arasındaki enerji farkına eşittir (Jaffé ve Orchin, 1964). Tipik UV-VIS spektrofotometre, bir ışık kaynağı, bir monokromator, bir dedeksiyon hücresi ve bir dedektör içerir. Işık kaynağı genellikle spektrumun UV bölgesinde elektromagnetik enerjiyi yayan bir döteryum lambasıdır. İkinci bir ışık kaynağı olan tungsten lamba ise spektrumun VIS bölgesindeki dalga boyları için kullanılır.

B) Fotodiyot Array Dedektörü (Photodiode array dedector: PDA veya DAD): uv/vis dedektörden farkı, 512 elementden oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga

buyundaki absorpsiyonu eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır.



Şekil 10. Diyot serili dedektörün (DAD) şematiği diyagramı

C) Floresans Dedektörü (Fluorescence dedector-FLD): Organik maddelerin yaklaşık %15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. Kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup, duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre yaklaşık 10^3 kat fazladır.

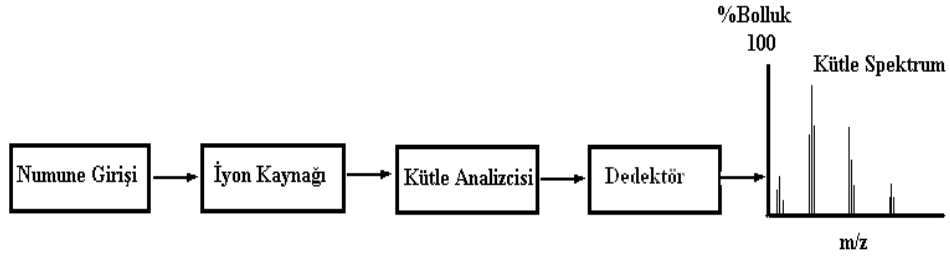
D) İletkenlik Dedektörü (Conductivity dedector-CDD): İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve kation analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir bu sebeple kolon fırını içerisinde çalışmalıdır. Kullanılan mobil fazın iletkenliği ne denli düşük olursa oluşan gürültü de o denli düşük olur.

E) Refraktif İndeks Dedektörü (Refractive index dedector-RID): Kırılma indisi ölçülür. Sıcaklıktan etkilenir. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terkeder. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılır.

F) Elektrokimyasal Dedektör (Electrochemical dedector-ECD): Elektroaktif maddeler analizlenebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltenebilir

veya indirgenabilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik tayin sırasında oluşan elektrik akımıdır.

G) Kütle Dedektörü (Mass dedector-MS): Yüksek-performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometri (HPLC-MS) oldukça çok yönlü bir enstrümantal tekniktir. HPLC-MS'in GC-MS'e nispeten başlıca avantajı çok daha geniş bir yelpazede bileşiklerin analizini gerçekleştirebilme kapasitesine sahip olmasıdır. Yüksek polarite gösteren veya yüksek molekül ağırlıklı termal olarak kararsız bileşikler hatta proteinler bile rutin şekilde HPLC-MS kullanılarak tamamen analiz edilebilirler. Temel enstrüman örnek girişi (bir sıvı kromatografisi), iyonlaşma bölümü, kütle analizci ve dedektör içerir eder.



Şekil 11. Bir HPLC-MS enstrümanının yapısı

H) Evaporatif Işık Dağıtıcı Dedektör (Evaporative light scattering dedector-EL)

1.10. Çalışılan Bitkilerin Özellikleri

Ormangülü, fundagiller (Ericaceae) familyasından *Rhododendron* cinsinin 800 kadar türünü içeren çiçekli bitkilerin ortak adıdır. *Rhododendron* kelimesi yunanca kökenli olup, rhodo= gül ve dendron =ağaç kelimelerinden oluşan “Gülağacı” anlamına gelir (Genaust, 1976; Mchoy, 1994). Değişik çiçek ve yaprak yapılarına sahip olan ormangülleri herdem yeşil olabildikleri gibi yaprak da dökülebilirler. Karadeniz sahillerinde halk dilinde bu bitkileri içeren bala “Deli Bal”, ormangüllerine ise “Ağu”, “Komar”ve “zifin” denilir (Kayacık, 1966). Ormangülleri (*Rhododendron*) batıdan doğuya doğru artan bir yoğunlukla, Karadeniz sahilindeki ormanlarda ya da ormanlar arasındaki açıklıklarda yetişmektedir. Ormangüllerinin yatay yöndeki dağılışı alanları dışında, dikey yöndeki dağılışı alanları da son derece geniştir. Ormangülleri deniz seviyesine yakın alanlarda

yayıllı gösteribildikleri gibi, deniz seviyesinden 5000 metrelik yüksekliklere kadar erişebilmektedir. Rhododendron'ların ana yayılış bölgesi ise, Kuzeydoğu Asya ve kısmen de Kuzey Amerika'dır. Güney Amerika ve Afrika'da bulunmadığı gibi Avrupa'da türce çok fakirdir. Türkiye'de ki türler

Ormangülleri Türkiye'de Karadeniz Bölgesinin bol yağış alan dağlık kısımlarında bulunur. Doğal olarak yetişen 5 ormangülü türü vardır. Ayrıca birçok melez ormangülü taksonu tespit edilmiştir.

Sarı çiçekli ormangülü (*Rhododendron luteum*) Batı, Orta ve Doğu Karadeniz

Mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron ponticum*) Bütün Karadeniz sahili boyunca

Kafkas ormangülü (*Rhododendron caucasicum*) Rize, Trabzon, Artvin

Pembe çiçekli ormangülü (*Rhododendron smirnowii*) Rize, Artvin

Beyaz çiçekli ormangülü (*Rhododendron ungerii*) Artvin

Ormangülleri hakkında pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar özellikle zehir etkileriyle ilgilidir. Bu etkiler daha çok ballar üzerinde gözlenmiştir. Araştırmalara göre ormangüllerini ziyaret eden arıların yaptığı ballarda *Ericolin* ve *Andromedotoxin* glikozitleri bulunduğundan, bu balı yiyenlerde zehirlenmeler görülmüştür. Ayrıca başka bir çalışmada *Rhododendron ponticum* nektarından elde edilen balın zehirlenmeye yol açtığı tespit edilmiştir. Benzer zehirlenme vakalarına bitkiyi yiyen keçilerde (Frape ve Ward, 1993). Ve koyunlarda rastlanmıştır (Higgins, 1985; Black, 1991). Ormangüllerinin köklerinin sahadan temizlenmesi için birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan mücadelelerin istenilen neticeler vermemesi üzerine bu bitkilerden yararlanma düşüncesi ile birçok çalışma yapılmıştır. Ormangülü odunlarının Yonga Levha imalatı için teknolojik açıdan uygun olduğunu fakat hammadde temini ve hazırlanması konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiği sonucuna varıldı (Karacalıoğlu, 1974; Öktem, 1982). Bitkinin yapraklarındaki furfural miktarını belirleyen bir çalışmada *Rhododendron ponticum* yaprağının nem yüzdesinin yüksek, pentozan yüzdesinin düşük olması ve hammadde hazırlama güçlükleri nedeniyle çözücü ve kimyasal ara madde olarak kullanılan furfural üretimi için uygun olmadığı sonucuna varılmış (Demeli ve Küçük, 1987).

1.10.1. *Rhododendron ponticum* Bitkisinin Özellikleri

3-4 m'ye kadar boylanabilen herdem yeşil bir çalıdır. Yapraklar deri gibi sert, tam kenarlı, geniş şerit veya eliptik, ender olarak da uzun yumurta biçimindedir ve sapa doğru

daralır. 8-12 cm.uzunluğunda, 2.5-4 cm genişliğinde olup üst yüzü parlak koyu yeşil, alt yüzü soluk yeşil renkli ve tüysüzdür. Mayıs-haziran aylarında açan çiçekler sürgünlerin ucunda bileşik salkım halindedir. Çiçekler mor renkli olup, yukarı taraflarında kahverengi lekeleri vardır. Lübnan, İspanya, Kafkasya ve Türkiye'de doğal olarak yetişir. Herdem yeşil yaprakları ve gösterişli çiçekleri dolayısıyla park ve bahçelerde yetiştirilen pek çok kültüvarı vardır.



Şekil 12. *Rhododendron ponticum* görünümü

1.10.2. *Rhododendron luteum* Bitkisinin Özellikleri

4 m'ye kadar boy yapan, kışın yaprağını döken, sık dallı bir çalıdır. Sürgünlere çok sıralı sarmal dizilmiş olan yapraklar yumurtamsı, geniş ters mızrak biçimde olup ayanın kenarı kirpikli ve ince dişli, her iki yüzü de tüylüdür. Yapraklanmadan önce açan sarı renkli çiçekler keskin kokulu olup 5 cm çapındadır. Bileşik salkım halindeki çiçek kurulları sürgün uçlarında yer alır. Orta ve Doğu Avrupa, Türkiye ve Kafkasya'da yayılış gösterir. Çiçekleri ve sonbaharda kırmızı renk alan yapraklarından dolayı parklarla bahçelerde yetiştirilir.



Şekil 13. *Rhododendron luteum* görünümü

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Cihazlar

Denemelerde kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Denemelerde kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Mikropipet	Isotherm
Öğütücü (Blender)	Waring Commercial Blendor /New hartford, conn. USA.
UV spektrofotometre	UV-Vis LaboMed ve LKB Ultraopec K4053
Rotary evaporatör (Döner vakum buharlaştırıcısı)	Bibby R100
Su banyosu	Bibby R 100B
Gömleklili ısıtıcı	Barnstead-Electrothermal ve Claude lyons Hoddesdon Hertz
Isıtlıcılı magnetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001 K
Liyofilizatör	Christ (alpha 1-4 LD plus)
Kurutma makinesi	Fantom
Derin dondurucu	Bosch
Vorteks karıştırıcı	Heidof
Santrifüj	Universal 320 R Hettich/Zentrifugen
Filtre	RC 0,45 µm
Soğutucu	Polyscience (temperature controller)

2.2. Kullanılan Çözeltiler ve Kimyasallar

Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
0.2 N Folin-Ciocalteu Reaktifi	2N’lik hazır satın alınan çözeltiden saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır.
%7,5’lik Na ₂ CO ₃ çözeltisi	7,5g Na ₂ CO ₃ 100 mL saf suda çözülerek hazırlanır.
Stok Kateşin	10 mg kateşin 10 ml saf suda çözülür (1mg/ml).
Stok Gallik asit	10 mg gallik asit 10 ml metanolde çözülür (1mg/ml).
100 µM DPPH çözeltisi	0,0029 mg DPPH 100 ml metanolde çözülür.
Stok Troloks®	10 mg trolox 10 ml etanolde çözülür (1 mg/ml).
Stok Askorbik asit (C vitamini)	10mg askorbik asit 10 ml saf suda çözülür (1mg/ml).
2M HCl	605 ml alınır ve saf su ile 1000 ml’ye tamamlanır.
3mM p-nitrofenolasetat	108 mg PNFA tartılıp, 4 ml asetonada çözülür. Manyetik karıştırıcıda hızla karışan 196 ml saf su üzerine yavaşça damlatılır.
50 Mm pH:7,4 Tris-SO ₄ tamponu	1,5138 g tris(hidroksimetil)-aminometan tartılıp 200 ml suda çözülüp, 1 N H ₂ SO ₄ ile pH: 7,4 ‘e ayarlanır. Çözelti 250 ml’ye seyreltilir.
10 mM sulfanilamid çözeltisi	0,0035 g tartılıp 2 ml asetonitrilde çözülür. Daha sonra 40 µM’a asetonitril ile seyreltilir. (10 mM çözeltiden 100 µL → 1000 µL; bu çözeltiden 100 µL → 2500 µL)
10 mM asetazolamid çözeltisi	0,0045 g tartılıp 2 ml asetonitrilde çözülür. Daha sonra 40 µM’a asetonitril ile seyreltilir. (10 mM çözeltiden 100 µL → 1000 µL; bu çözeltiden 100 µL → 2500 µL)
0,1 M NaOH (A)	0,100 g NaOH 25 ml saf suda çözülür (0,1 M).
10 mM TPTZ (B)	0,0468 g TPTZ, 40 mM 25 mL HCl’de çözülür.
20 mM Fe ₃ Cl ₃ .6H ₂ O (C)	0,0811 g Fe ₃ Cl ₃ .6H ₂ O 15 mL saf suda çözülür.
FRAP reaktifi	A, B ve C çözeltileri sırasıyla; 10:1:1 oranında karıştırılır. (FRAP reaktifi taze hazırlanmalı ve kullanımdan önce 37 °C’ye ısıtılmalıdır.)

Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Madde Adı	Firması
Asetik asit	Merck
Benzoik asit	Sigma
BHT	Merck
Kafeik asit	Sigma
Klorogenik asit	Sigma
DPPH	Calbiochem
Etanol	Merck
Fe ₃ Cl ₃ .6H ₂ O	Sigma
Ferulik asit	Fluka
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Fluka
Gallik asit	Sigma
Gentisik asit	Sigma
HCl	Merck
Kateşin	Sigma
Metanol	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck
NaOH	Merck
P-KumariK asit	Sigma
P-Hidroksi benzoik asit	Sigma
Protokatekhu aldehit	Fluka
Protokatekhuik asid	Sigma
Sinapik asit	Sigma
Siringik asit	Sigma
TPTZ	Calbiochem
Trolox®	Aldrich
Vanilik asit	Sigma

2.3. Bitkilerin Toplanması ve Ekstraktların Hazırlanması

Bu çalışmalarda kullanılan *Rhododendron luteum* ve *Rhododendron ponticum* 2009'un baharında Trabzon'dan toplandı. Bu bitkilerin her birinin çiçek ve yaprak kısımları özenle birbirinden ayrıldı. Ayrılan bu yaprak kısımlarından yaklaşık 13'er gram tartıldı.

Numunelerin tartımı: Tartımlar plastik bir beher yardımıyla Ohaus Explorer Pro EP 214C adlı terazide yapıldı. Tartılan numuneler arada bölmesi olan temiz plastik kaplara konularak donduruldu.

Liyofilize işlemi: Buzluktaki numuneleri alıp suyunu uçurmak için Liyofilizatöre konuldu ve 10 gün sürede liyofilize edildi.

Parçalama İşlemi: Liyofilize edilen bu numuneler önce küçük parçalara parçalandı. sonra havan yardımıyla mümkün olduğu kadar toz haline getirildi. Her birinden birer gram tartılıp, tüplere aktarıldı.

Ekstraksiyon İşlemi: Tüplerin her birine 10 ml asetonitril ilave edildi, ağızları parafilm ile dikkatlice kapatıldı ve 60 C°'de 30 dakikada bir vortexleyerek 3 saat boyunca shakerda ekstraksiyon yapıldı.

Çözeltilerin Eldesi: Ekstraksiyonu biten numuneler iyice vortexlendikten sonra şırınga yardımıyla sıvı kısım çekildi ve ayrı ayrı 0,45 µm'lık Minisart RC 25 filtresinden geçirilerek berrak çözeltiler elde edildi. Elde edilen çözeltiler tüplere alınarak oda sıcaklığında muhafaza edildi.

GC İçin Numune Hazırlığı: GC' de sadece Rhododendron luteumun çiçek kısmı çalışıldı ve bu çalışma hidrolizli ve hidrolizsiz olmak üzere iki şekilde yapıldı. Öncelikle 500'şer gram olarak iki tartım alındı. Bu numuneler ayrı ayrı iki balona konuldu. Balonların birine 1lt su diğerine 1lt 2M'lık HCL ilave edildi. Özellikle asitli olan balon bir magnetik karıştırıcı yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra balonlar clevenger düzeneğine konuldu. Bu işlem 5 saat sürdü ve bu yağlar düzenekteki hegzanlara birikti. Elde edilen uçucu yağların bir kısmı GC'ye verildi. Geri kalanı azot gazından geçirilip konsantrasyonları belirlendi sonuçta da antioksidan ve antimikrobiyal testlerde kullanıldı.

HPLC İçin Numune Hazırlığı: HPLC için kullandığımız numuneler ekstraksiyon sonucu elde ettiğimiz numunelerden alınmıştır.

2.4. Antioksidan Aktiviteler

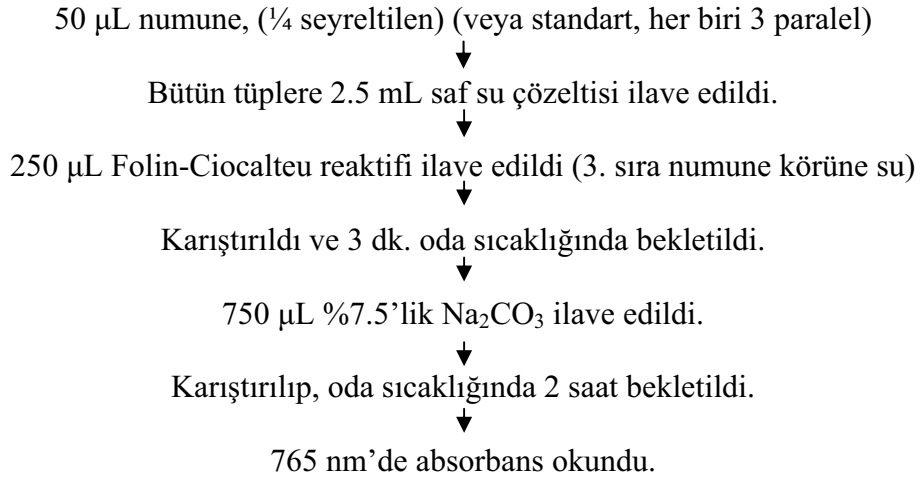
2.4.1. Asetonitril Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Miktarları

Yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifleri ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor-

menekşe renkli kompleks 765 nm’de maksimum absorbans oluşturur (Slinkart ve Singleton, 1977).

Asetonitrilli ekstraktlar içindeki toplam fenol miktarları, aşağıdaki yöntem uygulanarak kolorimetrik olarak tayin edildi. Bunun için; öncelikle standartlardan gallik asit ve kateşin 1mg/ml konsantrasyonunda ve bunlardan 5 farklı konsantrasyonda (1- 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,625 mg/mL) hazırlandı. Numunelerde ise iki (stok ve 1/10 seyreltilmiş) konsantrasyonla hazırlandı. Diğer gerekli reaktifler de şu şekilde hazırlandı.

Yöntem



Yukardaki şemada da gösterildiği gibi öncelikle 50 µL ‘lik her bir numune/standart belirtilen tüplere sırasıyla pipetlendi sonra her bir tüpü 2.5 mL saf su ilave edildi ve Folin-Ciocaltaeu reaktifi eklendi, vortekslendi, oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından, 750 µL (%7,5’lik) Na₂CO₃ eklenerek tekrar vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 765 nm’de absorbanslar spektrofotometrede okundu.

Toplam fenolik madde miktarı gram ya da mL numune başına µg olarak ifade edilir

(Örneğin : µg Gallik asit eşdeğeri / gram kuru ekstrakt, µg GAE/g, veya µg kateşin eşdeğeri / 100 g orjinal kuru numune, µG CE/100 g kuru numune).

2.4.2. Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarında DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

Bu yöntemle kararlı bir radikal olan DPPH^{*} (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)'in numune ortamındaki davranışları incelendi. Elde edilen ekstraktlar (numuneler) ve standartlar (BHT, Troloks, Askorbik asit) değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Standartlar 0,5 - 0,25 - 0,125 mg/ml'lik; numuneler ½ ve ¼ seyreltik konsantrasyonda hazırlandı. Öncelikle gerekli tüplere numuneler pipetlendi sonra numune çözeltileri üzerine eşit hacimde (750 µL) DPPH^{*} çözeltisi, eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda DPPH^{*}'in maksimum absorptans verdiği 517 nm'de absorptanslar okundu. Hesaplamalarda paralellerin ortalaması alınarak kör değerleri bu ortalamadan çıkarıldı. Bulunan absorptanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC₅₀ değerleri mg/mL cinsinden hesaplandı.

Uçucu yağlarda da aynı prosedür uygulandı. Konsantre çözücü (hegzan) tekrar çözülerek 500 µg/ml stok hazırlandı. Stok ve 1/1 seyrelterek 5 farklı konsantrasyonda çalışıldı.

2.4.2.1. IC₅₀ Değerlerinin Bulunması

IC₅₀ radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. IC₅₀ değerinin bulunması için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekir. Bu nedenle çalışmalarda 3 farklı konsantrasyonda ölçüm yapıldı. Numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorptans ölçümleri yapıldı ve absorptanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorptansın yarısına karşılık gelen yani absorptansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı IC₅₀ değerini vermektedir. IC₅₀ değeri mg/mL veya mM gibi birimlerle ifade edilmektedir.

2.4.3. Asetonitril Ekstraktlarında FRAP Yöntemi

Oyaizu (1986) tarafından geliştirilen yöntemle göre indirgeme kuvveti, numunelerin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermekte olup Fe⁺³ Fe⁺² indirgenmesi ile meydana gelen Fe⁺², 595 nm'de absorptans veren K₃(Fe)CN₆ renkli kompleksini oluşturur. Bu yöntem için önce ekstraktların ve standartların (Askorbik asit [C vitamini],

Troloks) belli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Sonra C vitamini ve Troloks adım adım seyreltilerek 3 farklı konsantrasyon (1000- 500- 250 μM) elde edildi. Numuneler de 1/1 seyreltilerek 2 konsantrasyonda hazırlandı.

Metodun Uygulanışı:

Tablo 5. FRAP testi için hazırlanan tüpler

Test Çözeltileri	Kalibrasyon Standartları					Referans Standart	Numuneler					
	C1	C2	C3	C4	C5	T	1	2	3	4	5	6
Reaktif körü	C1R	C2R	C3R	C4R	C5R	TR	1R	2R	3R	4R	5R	6R
Numune körü	C1K	C2K	C3K	C4K	C5K	TK	1K	2K	3K	4K	5K	6K
Test3	C13	C23	C33	C43	C53	T3	13	23	33	43	53	63
Test 2	C12	C22	C32	C42	C52	T2	12	22	32	42	52	62
Test 1	C11	C21	C31	C41	C51	T1	11	21	31	41	51	61

K: Numune körü, FRAP reaktifi yerine 3.0 mL asetonitril kullanıldı.

R: Reaktif körü, numune yerine 100 μL numune çözücüsü (numuneler için asetonitril) kullanıldı.

C: C vitamini (Askorbik asit), 1000, 500, 250 μM . Stok Askorbik asit çöz. için 176 mg/L ya da 17.6 mg/100 mL (0.0176 g/100 mL) 1000 μM 'a eşdeğer sudaki çözeltisi.

T: Trolox, 500 μM , 0.0125 g / 100 mL (=125 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

$\text{Abs}_{595\text{nm}}$ [Askorbik asit]'e karşı grafiğe geçildi. FRAP değeri aşağıdaki gibi hesaplandı:

FRAP değeri = (Numune absorbansının karşılık geldiği [Askorbik asit] x 2) μM

İşlemler:

FRAP reaktifi taze hazırlandı.

Test çözeltileri hazırlandı.

Spektrofotometre çalıştırıldı, dalga boyu 595 nm`ye ayarlandı.

Test 1, Test 2 ve Test 3 Reaktif körü sıralarına tek tek 3.0 mL FRAP reaktifi aktarıldı.

Numune körü sırasına (12 tüp) 3.0 mL asetonitril aktarıldı.

Test 1, Test 2 ve Test3 ve Numune körü sıralarına 100 μL test çözeltileri ve Reaktif körü sırasına 100 μL asetonitril 30 saniyede bir pipetlendi ve vortekslendi.

İlk pipetlenen tüpten başlanarak 20. dakikası dolan tüp alınıp, plastik küvete aktarıldı ve absorbans 595 nm`de okundu. Tüpler arası süre 20 saniyeye ayarlandı. Reaktif körü sırası pipetlemede olduğu gibi en sona bırakıldı.

Reaktiflerin Hazırlanması:

FRAP çalışma reaktifi: A, B ve C çözeltileri ayrı ayrı hazırlanarak karıştırıldı .

A: 150 mL 300 mM asetat tamponu, pH=3.6, pH ayarlaması asetik asitle yapıldı. Bunun için 2.586 mL derişik (%99.5) asetik asit alınıp, hacim saf suyla 40 mL`ye tamamlanıp, 0.1 M NaOH (0.100 g/25 mL) ile pH=3.6`ya ayarlandı, hacim suyla 45 mL`ye tamamlanarak üzerine 105 mL etanol ilave edildi.

B: 15 mL 10 mM TPTZ'nin [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ, MW:312.33 g/mol) nin 40 mM HCl deki çözeltisi hazırlandı. Bunun için 0.0468 g TPTZ / 5.5 mL 40 mM HCl hazırlandı, sonra üzerine 10.5 mL etanol ilave edildi.

C: 15 mL 20 mM FeCl₃.6H₂O çözeltisi; 0.0811 g FeCl₃.6H₂O / 5.5 mL saf suda çözülerek, üzerine 10.5 mL etanol ilave edildi.

Toplam hacim = A+B+C = 180 mL (20 numune için)

M HCl: 82 µL der. (%37) HCl / 25 mL saf suda

[der. HCl: 12.2 M (%37); der. HAc: 17.4 M (%99.5)]

2.5. Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarında Antimikrobiyal Aktivite

Numunelerin antibakterital ve antifungal kapasitelerini belirlemek amacıyla iki yöntem uygulanmıştır. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemede kullanılırken, minimum inhibisyon konsatrasyonu (MIC) tayin yöntemi ise metanol ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek üzere kullanılmıştır.

2.5.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi

Bütün test mikroorganizmaları Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edildi. Test edilen yedi bakteri ve iki maya-benzeri mantar: *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. Testte kloroform ekstraktlarında çözücü olarak kloroform kullanılarak hazırlanan 500 µg/mL konsantrasyondaki test çözeltileri kullanıldı.

Bu testte her bir mikroorganizma Mueller Hilton (MH) (Difco, Detroit, MI) broth'da süspansiyon haline getirilip yaklaşık mL'de 10^6 koloni oluşturan birime kadar seyreltilmiştir. Hazırlanan süspansiyonlar MH agar ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, MI) üzerine serilmiş ve kurutulmuştur. Maya benzeri mantarlar olan *C. albicans* ve *C. tropicalis* için SDA kullanılmıştır. Agar üzerinde steril bir mantar delici ile 5 mm çapında kuyucuklar delinmiş ve bu kuyucuklara 100 µL numune aktarılmıştır. 35 °C'de 18 saat inkübasyonu takiben antimikrobiyal aktivite test organizmalara karşı meydana gelen inhibisyon alanları ölçülerek belirlenmiştir. Cefotaxime (Fortum) (10µg) standart antibakteriyel olarak ve Triflucan (5µg) standart antifungal referans olarak kullanılmıştır. Testler çift paralel çalışılmış ve sonuçlar inhibisyon alanının çapı cinsinden ifade edilmiştir: (-): < 5.5 mm; (+): 5.5-10 mm; (++) : 11-15 mm; (+++) : >16 mm.

2.5.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Yöntemi

Bütün test mikroorganizmaları Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsünden temin edildi. Test edilen yedi bakteri ve iki maya-benzeri mantar: *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. Testte kullanılan ekstraktların 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltilerini hazırlanmak için dimetil sülfoksitte (DMSO) çözüldü. Seyreltmeler de aynı çözücü ile yapıldı.

Antimikrobiyal aktivite seyreltmeler yapılarak inhibisyonu sağlayan minimum numune konsantrasyonunu (MIC, µg/mL) belirleyerek değerlendirildi. Antibakteriyel test Mueller-Hinton broth'da (MH) (Difco, Detroit, MI) pH 7.3'te, antifungal test tamponlanmış Yeast Nitrogen Base'de (Difco, Detroit, MI) pH 7.0'de gerçekleştirildi. MIC değeri büyümenin olmadığı en düşük numune konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Testler çift paralel çalışılmıştır. Ampicillin standart antibakteriyel, fluconazole standart antifungal referans olarak kullanılmıştır. Çalışmada dimetil sülfoksit (DMSO) çözücü kontrolü olarak test edilmiştir.

2.6. Uçucu Yağların GC-MS Analizleri

Toplanan *Rhododendron luteum* çiçekleri bir soğutucu yardımıyla Clevenger aparatlarında saf suyla ve asitle ekstrakte edildi. Sistemde biriken yağlar, (0,5 mL) HPLC n-hegzan'da çözülerek alındı ve küçük cam şişelere aktarıldı. Şişelerin ağzı sıkıca kapatılıp bantlandı ve +4 °C'de saklandı. Analiz sırasında, bir mikrolitre (1µL) ekstrakt doğrudan GC-MS cihazına enjekte edildi.

GC-MS analizleri Agilent-5973 MS sistemiyle donatılmış Agilent-6890 GC sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İyon tuzağı dedektörlü kütle spektrometresi, elektron çarpışma iyonizasyonu altında (70 eV) tüm durumu taramak için kullanıldı. Analizler için HP-5 kapiler (30mx0.32mm i.d. film kalınlığında 0.25 mm) kromatografik kolonu kullanıldı. 1mL/min akış oranında Helyum taşıyıcı gaz olarak kullanıldı. Enjeksiyonlar, 230°C'de bölünmemiş durumda gerçekleştirildi. Hegzandaki (HPLC derecede) bir mikrolitre (1µL) esansiyel yağ çözeltisi; başlangıçta 60 °C'de 2 dakika ve sonra arttırılarak 260°C'de 5 °C/ dakika ısıtma rampasında, daha sonra da 260°C'de 20 dakika tutulan kolonla enjekte ve analiz edildi. Ayrılmış bileşenlerin bağıl yüzde miktarları, bilgisayar donanımlı entegratörle toplam iyon kromatogramlarından hesaplandı. Yağ bileşenleri, kendi kütle spektrumlarıyla kütle spektrum kütüphanelerinin (NIST, Wiley and HPCH) bileşenleri karşılaştırılarak tanımlandı.

2.7. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi

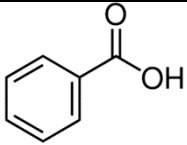
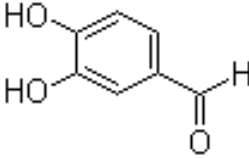
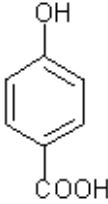
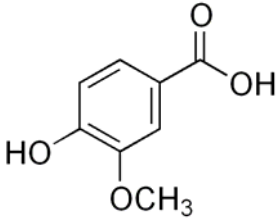
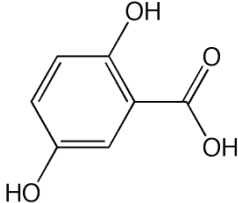
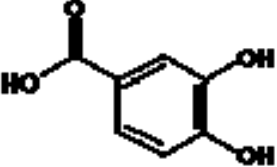
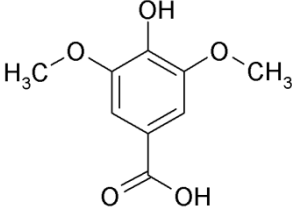
2.7.1. Materyaller

Analitik derecede fenolik standart olarak gallik asit, protokatekuik asit, protokatekhu aldehit, gentsik asit (2,5-dihidroxy benzoik asit), p-OH benzoik asit, vanilik asit, klorogenik asit, kafeik asit, siringik asit, p-koumarik asit, benzoik asit, ferulik asit, sinapik asit kullanıldı. LC-DAD deneylerinde ve numune hazırlamada kullanılan HPLC derecede asetonitril, metanol ve asetik asit Sigma-Aldrich'den satın alındı. HPLC şırınga filtreleri (13 mm, 0.2 µm, PVDF) Whatman (Clifton, NJ, USA)'dan satın alındı.

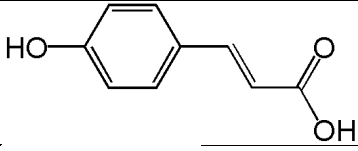
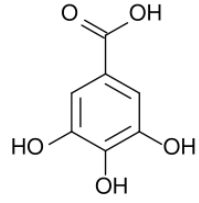
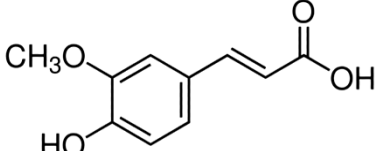
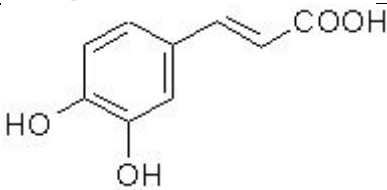
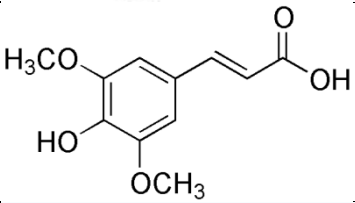
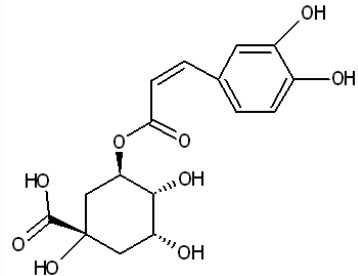
2.7.2. Standartlar ve Kalibrasyon

Tüm stok çözeltiler %40'lık metanolde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Aşağıdaki Tablo-6 fenolik bileşiklerin çalışıldığı dalga boylarını göstermektedir.

Tablo 6. Fenolik bileşiklerin çalışıldığı dalga boyları

Bileşen	Formül	Çalışılan dalga boyu(nm)
Benzoik asit		240
Protokatekhu aldehit		280
p-OH Benzoik asit		260
Vanilik asit		260
Gentisik asit (2,5-dihidroxy benzoik asit)		324
Protokatekhuik Asit		260
Siringik asit		274

Tablo 6'nın devamı

Bileşen	Formül	Çalışılan dalga boyu(nm)
p-koumarik asit		308
Gallik asit		274
Ferulik asit		324
Kafeik asit		324
Sinapik asit		324
Klorogenik asit		324

2.7.3. HPLC-UV-DAD Koşulları

RP-HPLC-UV-DAD analizleri Agilent (Waldbronn, Almanya)'den bir diyot serili dedektör ile donanımlı 1100 seri ve DAD 1200 seridir. Enstrüman Chemstation programı ile (Agilent) kontrol edildi. Tüm analizler için bir C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; waters spherisorp ODS2) kullanıldı. Hareketli faz (A) %2 asetik asitin sudaki çözeltisi ve (B) 50/50 asetonitril/su içindeki %0,5 asetik asitin çözeltilerinden

oluşmaktaydı. Enjeksiyon hacmi 20 L olarak kullanıldı. Akış hızı 1/2 ml.dk⁻¹ idi ve dedektör 240, 260, 274, 280, 308,nm’lerde ve bunlara ek olarak UV spektrum 200-400 nm aralığında kaydedildi. Elüsyonda takip edilen gradient Tablo 7’da verilmiştir.

Tablo 7. HPLC elüsyon gradient programı

Zaman (dk)	B (%)	C (%)	D (%)	Akış (mL/dk)	Basınç
0,00	5,0	95,0	0,0	1,200	275
5,00	17,0	83,0	0,0	1,200	275
14,00	17,0	83,0	0,0	1,200	275
17,00	30,0	70,0	0,0	1,200	275
18,00	15,0	85,0	0,0	1,200	275
20,00	5,0	95,0	0,0	1,200	275
22,00	5,0	95,0	0,0	1,200	275
23,00	95,0	5,0	0,0	1,200	275
25,00	95,0	5,0	0,0	1,200	275
26,00	10,0	0,0	90,0	1,200	275
30,00	10,0	0,0	90,0	1,200	275
33,00	5,0	95,0	0,0	1,200	275
35,00	5,0	95,0	0,0	1,200	275

B: % 0,5 Asetik Asit; Asetonitril / su (50/50)

C: %2 Asetik Asit (suda)

D: % 100 Asetonitril

2.8. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri

Bu çalışmada sülfanilamid ve asetozolamid olmak üzere iki standart hazırlandı ve gerekli seyreltmeler yapılarak üç konsantrasyonda çalışıldı. Numunelerin her biri ise 1/20000, 1/40000 ve 1/80000 oranlarında seyreltilerek hazırlandı. Substrat pipetlemesi 20 sn. arayla yapıldı. Pipetlemelerin nasıl yapıldığı Tablo-8’de verilmiştir.

Tablo 8. Dört numunenin ve iki standardın BCA aktivitesine etkileri

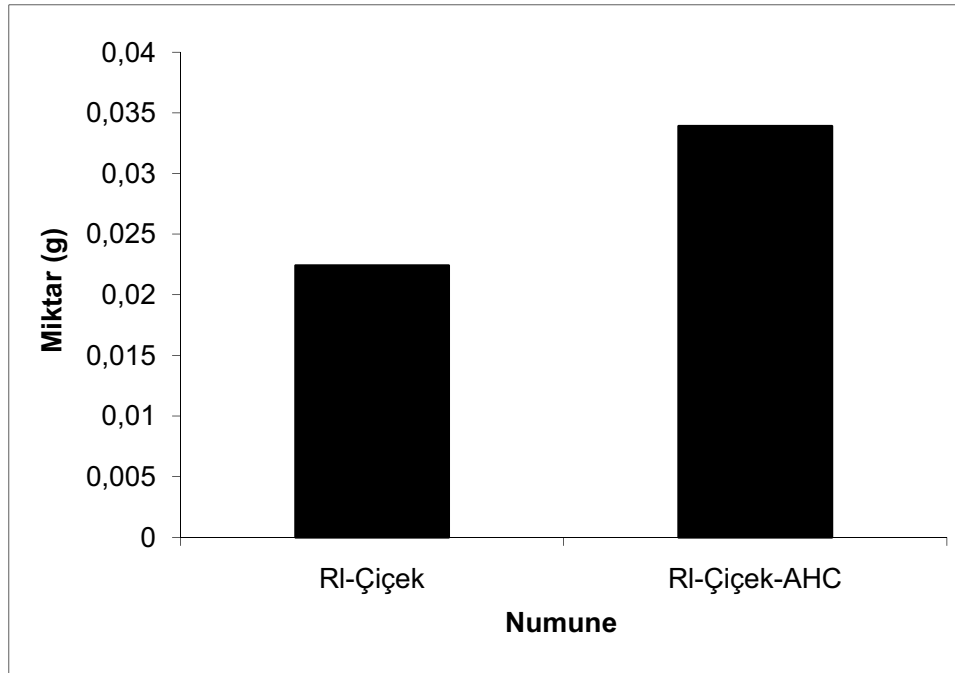
	A	B	C	D	E	F	G	N1	N2
Tampon (μL)	-	1000	-	-	1000	1000	1000	1000	1000
Su (μL)	1000	-	1000	1000	-	-	-	-	-
Numune (μL)	-	-	-	200	200	-	200	200	200
Numune Çözcüsü (μL)	-	-	-	-	-	200	-	-	-
Su (μL)	200	200	200	-	-	-	-	-	-
Vortex ile karıştırma									
Enzim (μL)	300	-	-	-	300	300	-	300	300
Su (μL)	-	300	300	300	-	-	-	-	-
Tampon (μL)	-	-	-	-	-	-	300	-	-
Vortex ile karıştırma 5 dakika inkübasyon									
Substrat (μL)	-	-	1500	-	-	1500	1500	1500	1500
Su (μL)	1500	1500	-	1500	1500	-	-	-	-
Son Hacim (μL)	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000
Vortex ile karıştırma									

- A: Enzimden kaynaklanan absorban
B: Tampondan kaynaklanan absorban
C: Substrattan kaynaklanan absorban
D: Numuneden kaynaklanan absorban
E: Substrat körü.
F: Numune körü.
G: Enzim körü.
N1 ve N2: Paraleller

Pipetlemeye başladıktan 25 dakika sonra da bir taraftan 348 nm'de absorbanları okundu.

3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

Çalışmada *Rhododendron ponticum* ve *Rhododendron luteum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının asetonitril ekstraktları ve *R. luteum*'un çiçeklerinin sulu ve asitli ortamda Clevenger sistemiyle elde edilen uçucu yağları elde edilmiş, numunelerde antioksidan, antimikrobiyal ve karbonik anhidraz enzim inhibisyonu aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca hazırlanan ekstrakt ve uçucu yağların kimyasal kompozisyonu HPLC-UV ve GC-MS kromatografik yöntemleriyle çalışılmıştır. Normal ve asitli ortamda (Asit hidrolitik/katalitik: AHC) elde edilen uçucu yağlarda işlemlerin verim üzerine etkisini belirlemek üzere verim hesabı yapılmıştır (Şekil 14).



Şekil 14. Normal Clevenger ve AHC Clevenger yöntemiyle elde edilen uçucu verimi

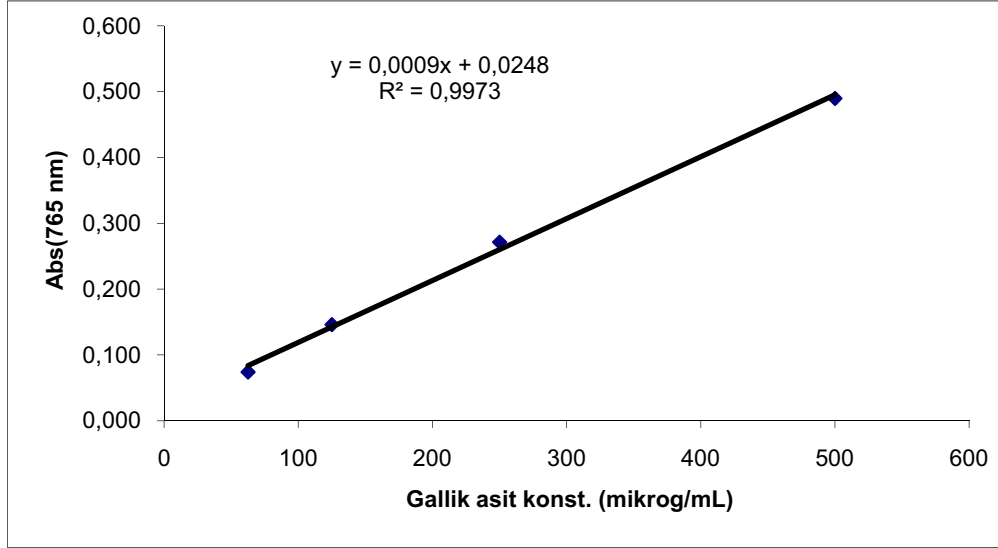
3.1. Antioksidan Aktiviteler

İki bitkinin çiçek ve yaprak kısımlarından elde edilen numunelerin antioksidan potansiyelini belirlemek üzere numunelerde DPPH radikal temizleme aktivitesi, Folin-

Ciocalteu yöntemine göre toplam fenolik madde miktarı ve demir (III) indirgeme / antioksidan güç (FRAP) aktivitesi standart antioksidanlar butillenmiş hidroksi toluen (BHT), C vitamini ve Trolox karşılaştırma amaçlı kullanılmak suretiyle çalışılmıştır.

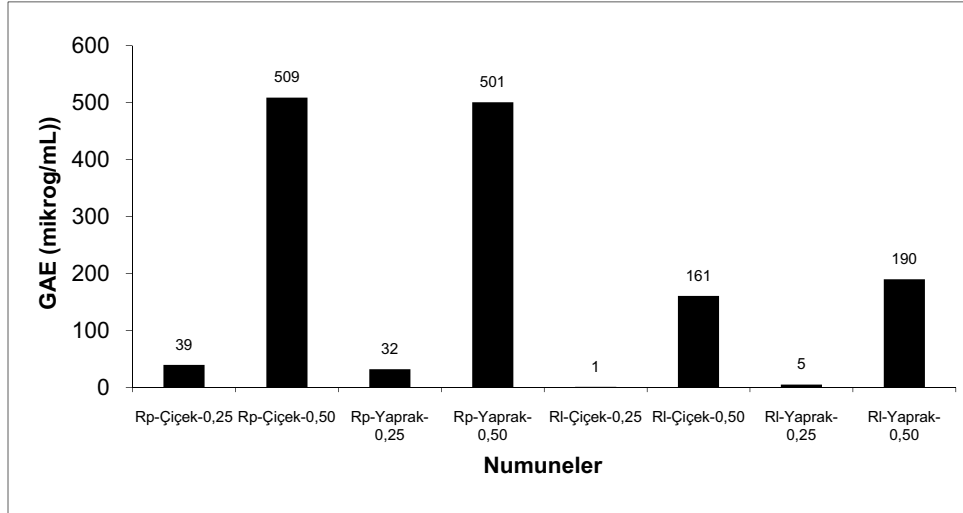
3.1.1. Asetonitril Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Miktarları

Ormangülü çiçek ve yapraklarının asetonitril ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde Folin-Ciocalteu toplam fenolik madde tayin yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde standart olarak gallik asit ve kateşinin değişen konsantrasyonları kullanılarak absorbans ölçümlerine dayalı kalibrasyon grafikleri elde edildi (Şekil 15 ve 18).



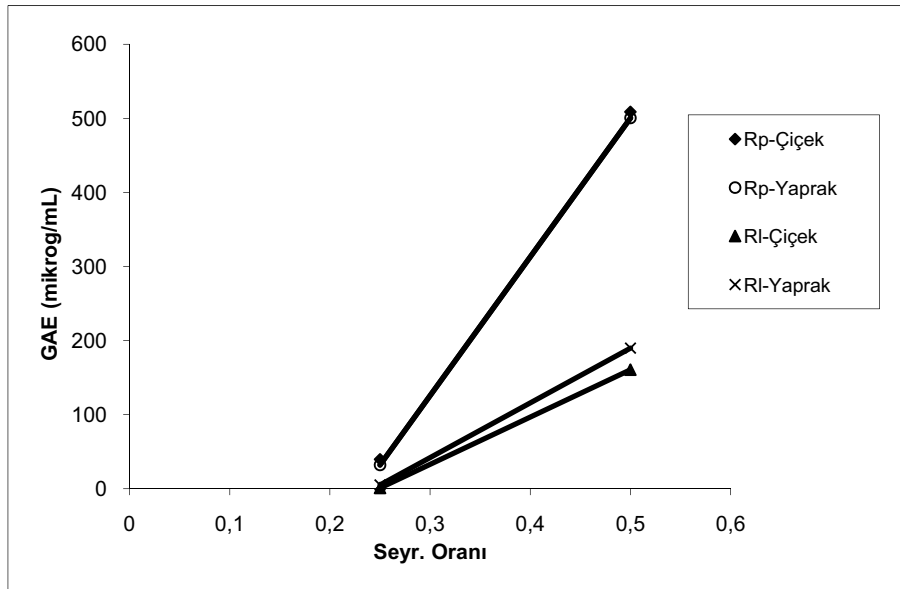
Şekil 15. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit konsantrasyonu-absorbans grafiği

Gallik asit standart grafiğinde elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak numunelerdeki fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak $\mu\text{g/mL}$ cinsinden ifade edildi (Şekil 16).



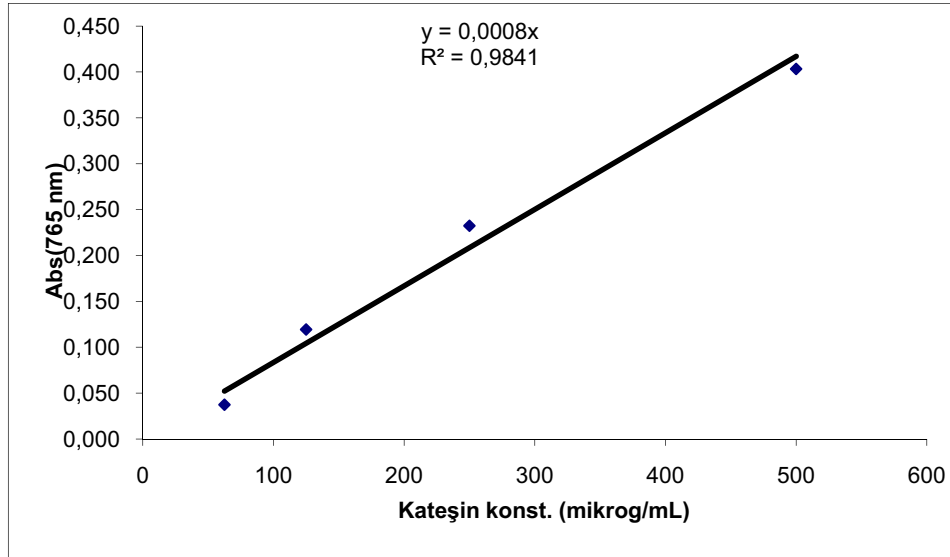
Şekil 16. Folin-Ciocalteu yöntemine göre ekstraktların gallik asit eşdeğeri (GAE, $\mu\text{g/mL}$)

Numunelerin fenolik içeriklerine GAE cinsinden bakıldığında çiçek ekstraktlarının yaprak ekstraktlarına göre daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Numuneler arası karşılaştırma aynı zamanda mor ormangülünün (komar) sarısına (zifin) göre daha yüksek fenolik bileşik içerdiği görülmektedir. Yapılan bu çalışmada iki farklı ekstrakt konsantrasyonunda deneme yapılmış, sonuçlar konsantrasyonun etkisinin görülmesi için seyrelme oranı – GAE olarak grafiğe geçilmiştir (Şekil 17). Konsantrasyondaki artışa fenolik bileşimin eşlik ettiği görülmektedir.

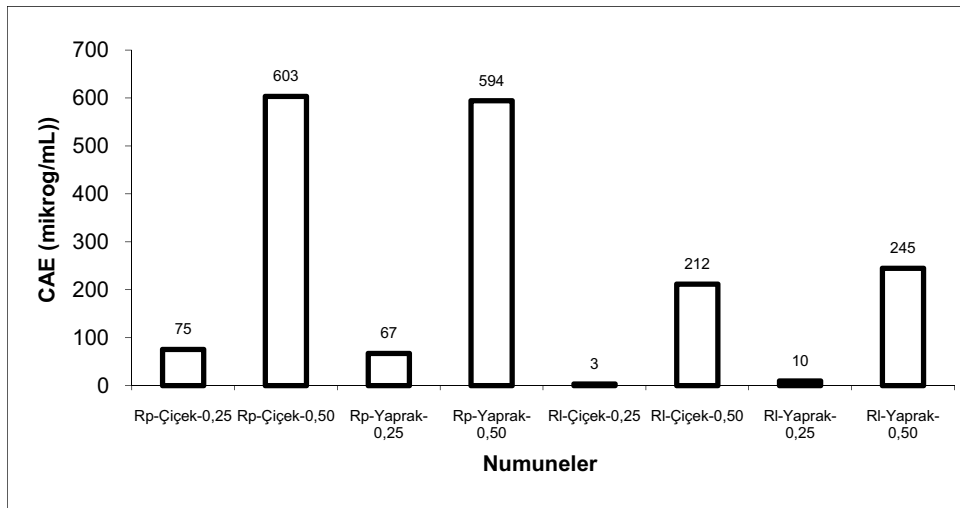


Şekil 17. Numunelerin GAE ($\mu\text{g/mL}$) değerlerinin numune konsantrasyonu ile ilişkisi

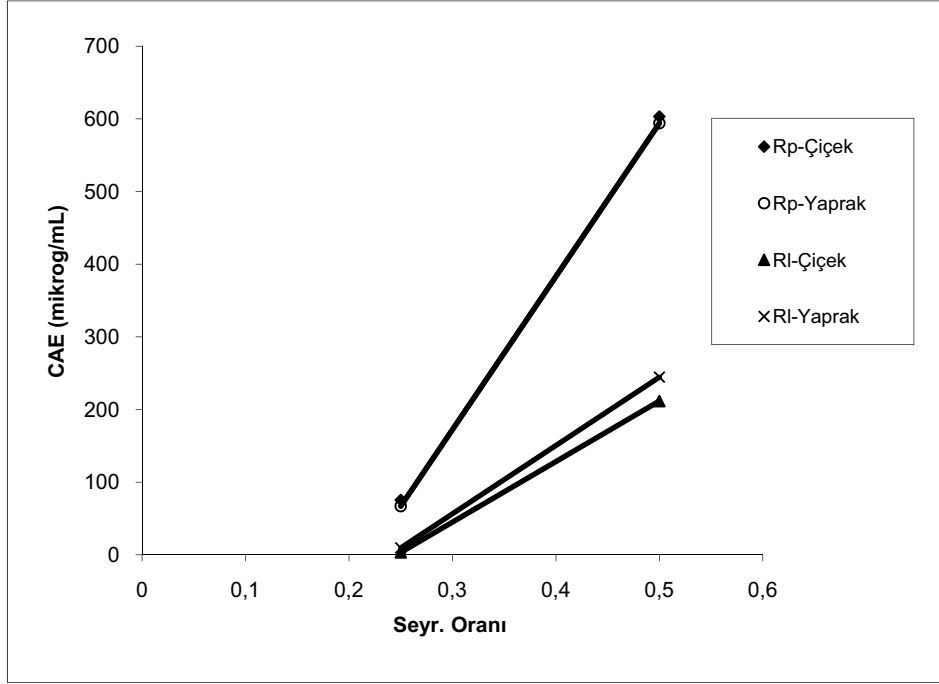
Fenolik asit tayininde gallik asitin yanında literatür verileriyle ve daha sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi için kateşin standart olarak kullanıldı ve benzer özellikler kateşin standart grafiğine dayalı hazırlanan CAE–numune grafiklerinde de gözlendi (Şekil 18 ve 19).



Şekil 18. Folin-Ciocalteu yöntemine göre kateşin konsantrasyonu–absorbans grafiği



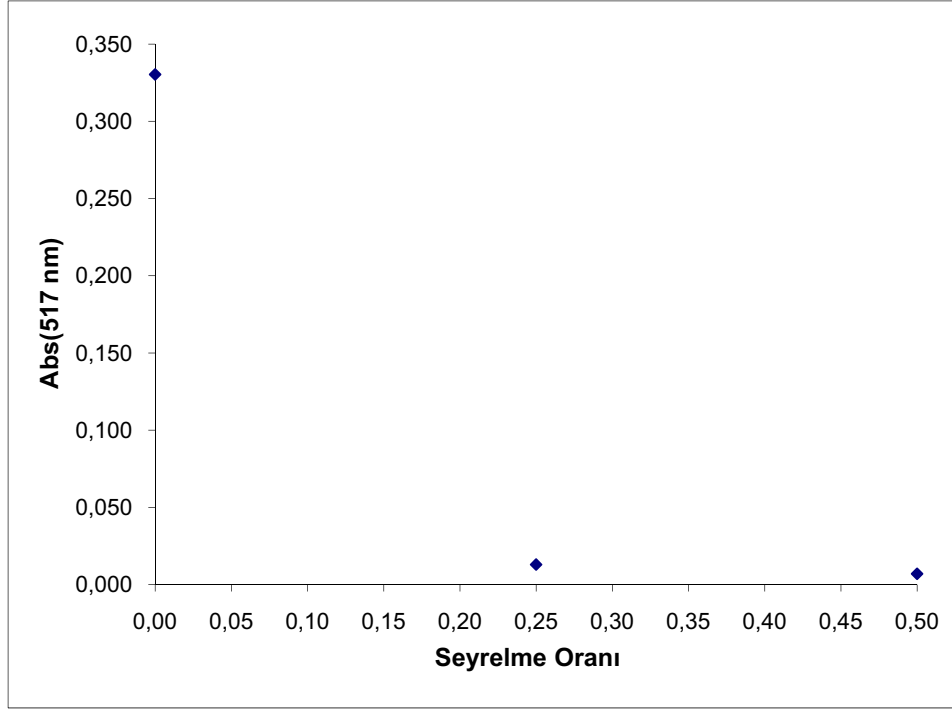
Şekil 19. Folin-Ciocalteu yöntemine göre ekstraktların kateşin eşdeğeri (CAE, µg/mL)



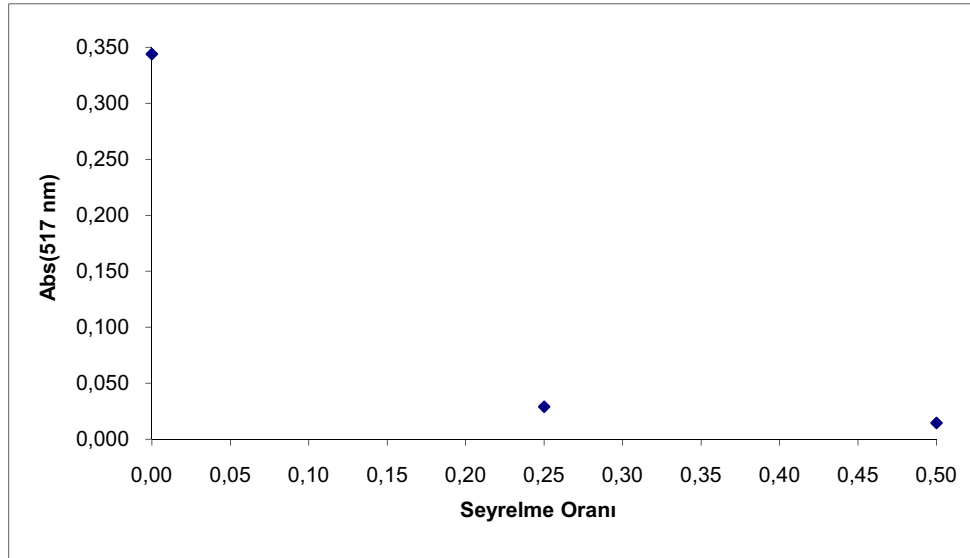
Şekil 20. Numunelerin CAE ($\mu\text{g/mL}$) değerlerinin numune konsantrasyonu ile ilişkisi

3.1.2. Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarda DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

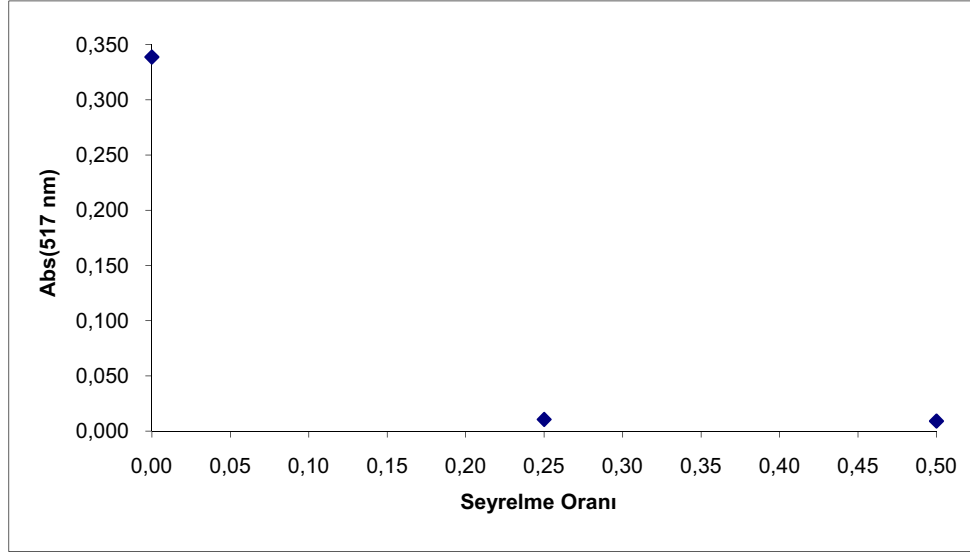
Ormangülü çiçek ve yapraklarının asetonitril ekstraktlarının ve sadece sarı çiçekli ormangülünden elde edilen uçucu yağların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde DPPH temizleme aktivitesi tayin yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde eşit hacimdeki numune çözeltileri ve DPPH çözeltisi karıştırılıp inkübasyon sonrası 517 nm de yapılan absorbans ölçümleri aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır (Şekil 21, 22, 23 ve 24). Karşılaştırma amacıyla standart olarak BHT, C vitamini ve Trolox kullanıldı.



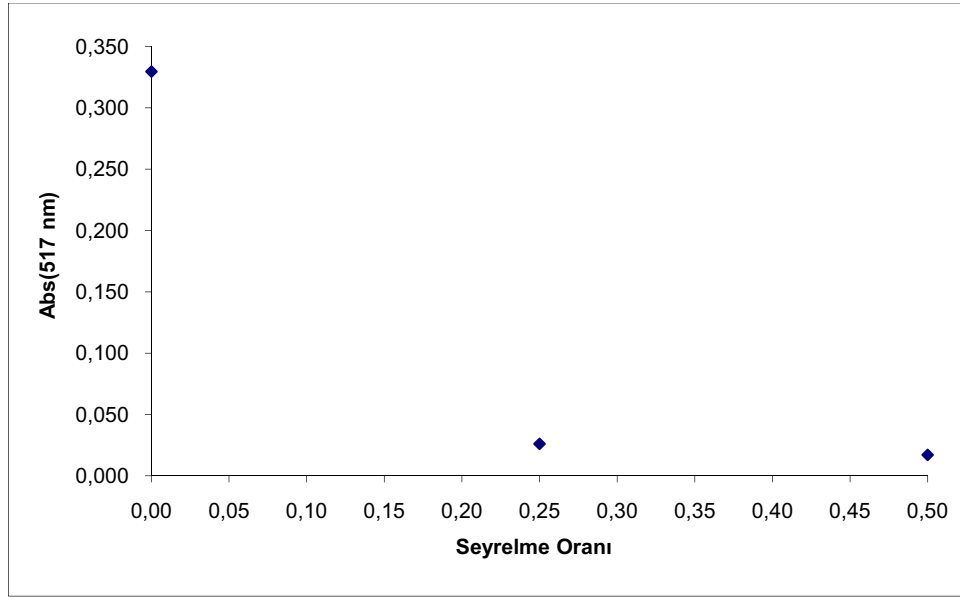
Şekil 21. *R. ponticum* çiçek asetonitril ekstraktının seyrelme oranı-absorbans grafiği



Şekil 22. *R. ponticum* yaprak asetonitril ekstraktının seyrelme oranı - absorbans grafiği

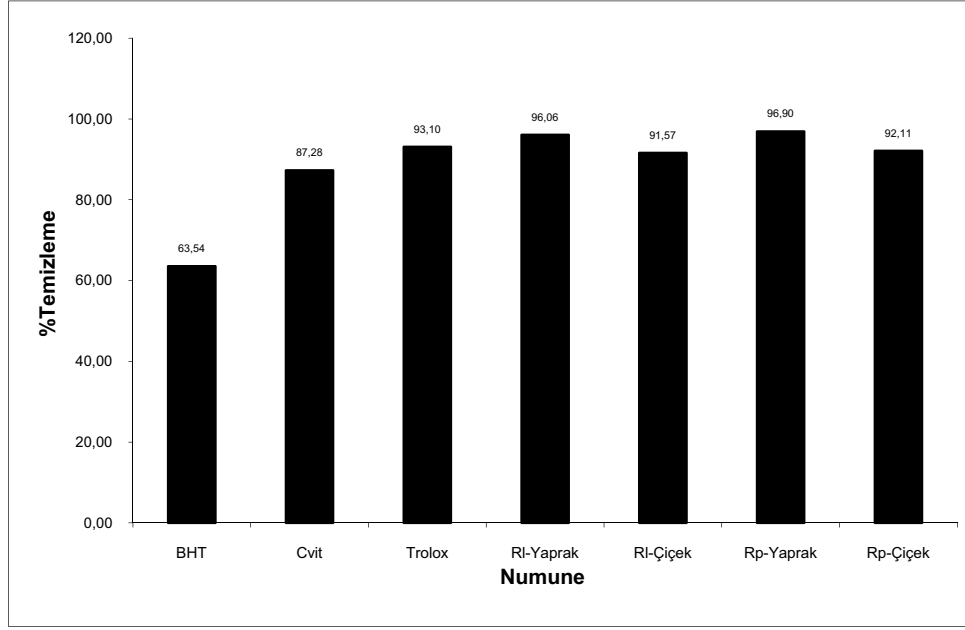


Şekil 23. *R. luteum* çiçek asetonitril ekstraktının seyrelme oranı-absorbans grafiği



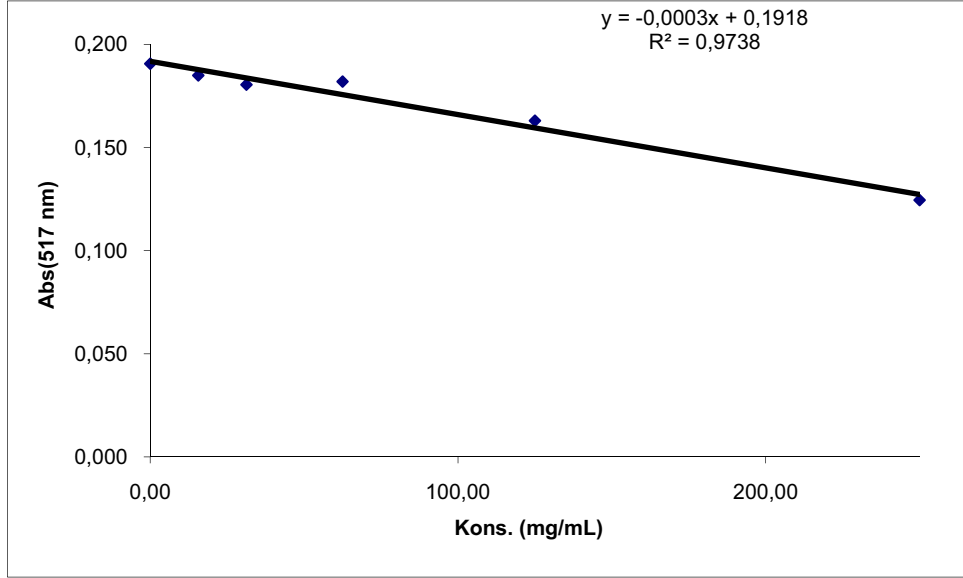
Şekil 24. *R. luteum* yaprak asetonitril ekstraktının seyrelme oranı-absorbans grafiği

Çalışılan numune seyrelme oranlarında DPPH miktarları çok düştüğü için IC_{50} değerlerine dayalı bir karşılaştırma yerine seyreltik çalışılan numunelerin meydana getirdiği %temizleme değerleri hesaplanmış ve karşılaştırmalarda kullanılmıştır (Şekil 25).

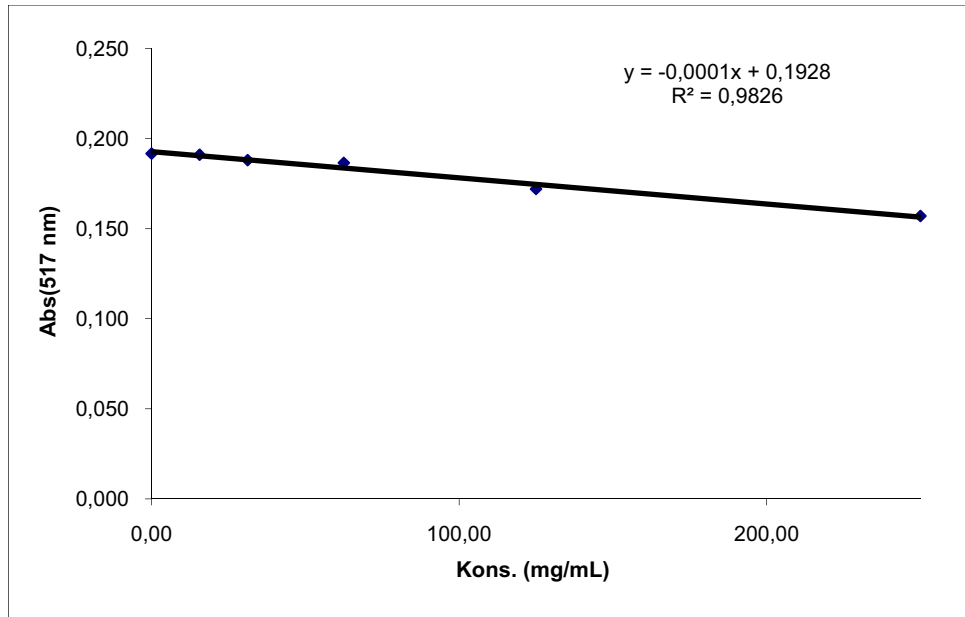


Şekil 25. Asetonitril ekstraktlarının $\frac{1}{4}$ seyreltilen numunelerinin %DPPH temizleme değerleri

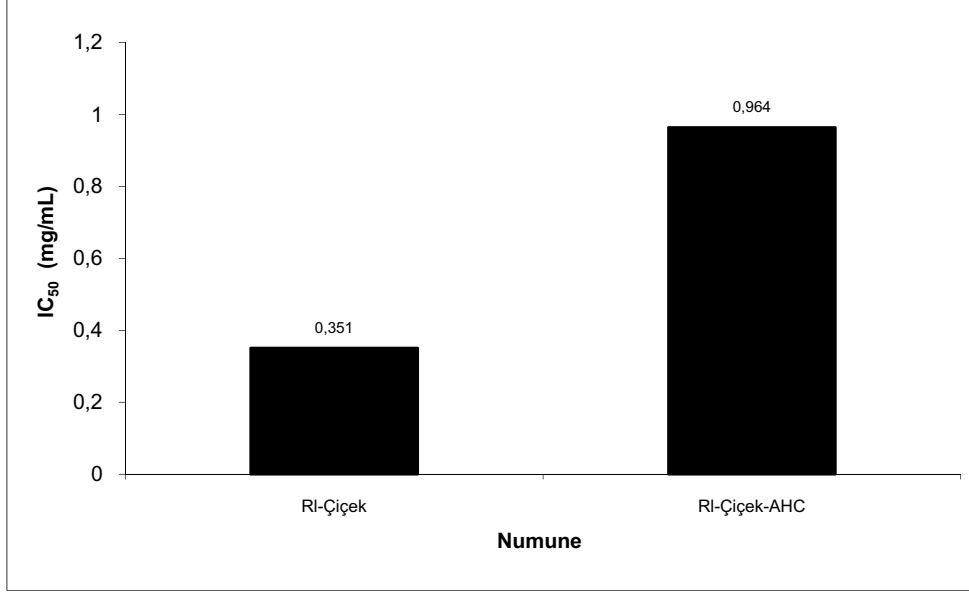
Ekstraktlarda yapılan DPPH testi sonuçları yaprak ekstraktlarının daha yüksek performans sergilediğini göstermektedir. DPPH temizleme aktivitesi ayrıca sarı ormangülü çiçeklerinden normal ve asitli Clevenger uygulamasıyla elde edilen uçucu yağlarda da belirlenmiştir. Bu amaçla hekzan çözeltilerindeki hekzan uzaklaştırılıp miktar tayini yapılan uçucu yağlar tekrar hekzanda bilinen konsantrasyonlarda çözülüp seri seyreltme yapılarak hazırlanan numunelerde DPPH temizleme aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar konsantrasyon – absorbans grafiklerine dönüştürülmüş (Şekil 26 ve 27) ve bu grafiklerden elde edilen IC_{50} değerleri karşılaştırma amacıyla sütun grafiği olarak Şekil 28'de gösterilmiştir.



Şekil 26. *R. luteum* çiçek normal uçucu yağının konsantrasyon-absorbans grafiği



Şekil 27. *R. luteum* çiçek AHC (asitli) uçucu yağının konsantrasyon-absorbans grafiği

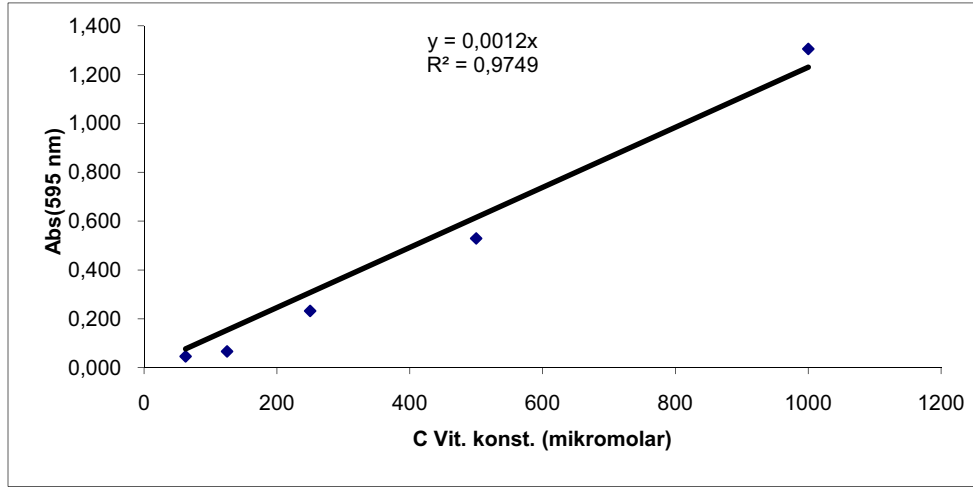


Şekil 28. R. luteum çiçek normal ve AHC (asitli) uçucu yağlarının IC₅₀ değerleri

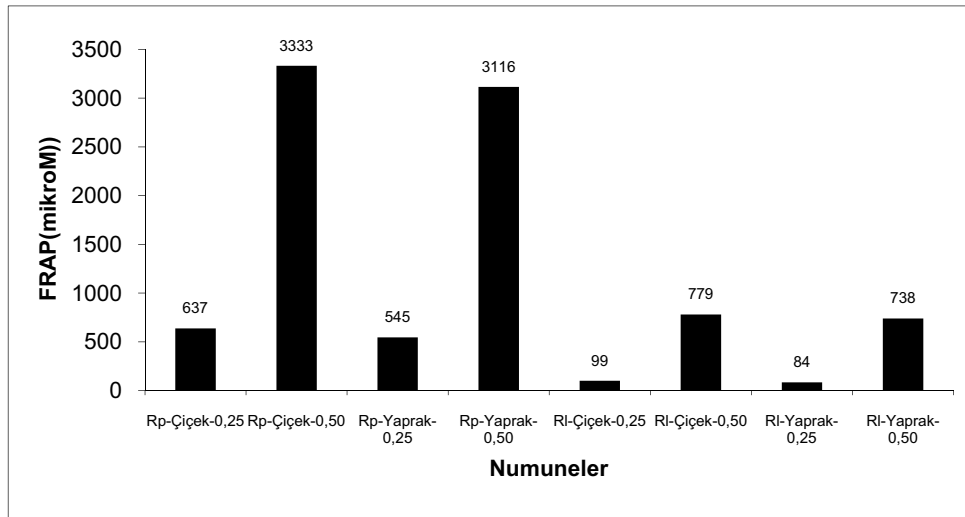
Uçucu yağların DPPH aktivitelerine bakıldığında normal Clevenger yöntemle elde edilen ürünün daha düşük IC₅₀, dolayısıyla da daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmektedir.

3.1.3. Asetonitril Ekstraktlarında Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti

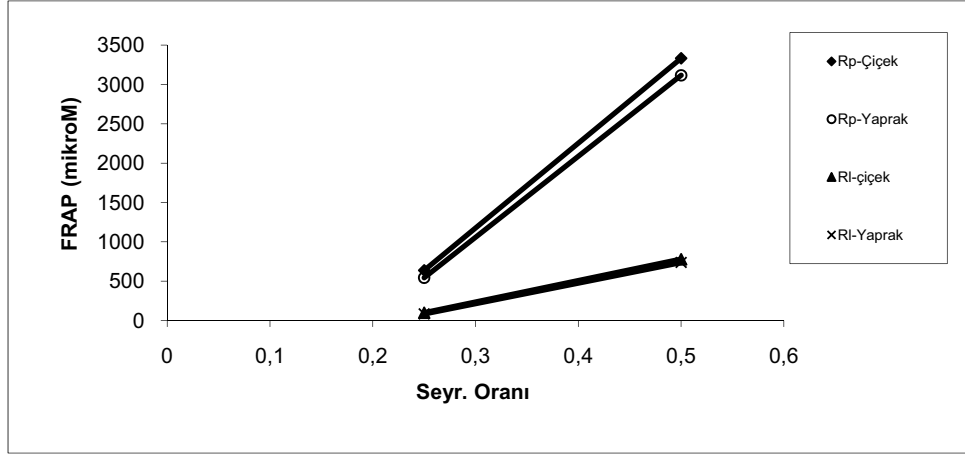
Ormangülü asetonitril ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde demir (III) indirgeme / antioksidan güç (FRAP) yöntemi de kullanıldı. Bu yöntemde standart olarak C vitamini ve Trolox değişen konsantrasyonları kullanılarak absorbans ölçümlerine dayalı kalibrasyon grafikleri elde edildi (Şekil 29 ve 32). Bu grafikler kullanılarak antioksidan aktiviteler ya C vitamini grafiğine dayalı FRAP (μM) (Şekil 30) ya da Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC, μM) olarak ifade edildi (Şekil 33). FRAP (μM) ifade şeklinde grafikten numunelere karşılık gelen C vitamini konsantrasyonları reaksiyon stokiometrisinden dolayı 2 ile çarpıldı. Ayrıca çalışma iki farklı numune seyrelme oranında yapıldı ve aktivitenin konsantrasyonla doğru orantılı olarak arttığı gösterildi (Şekil 31 ve 34).



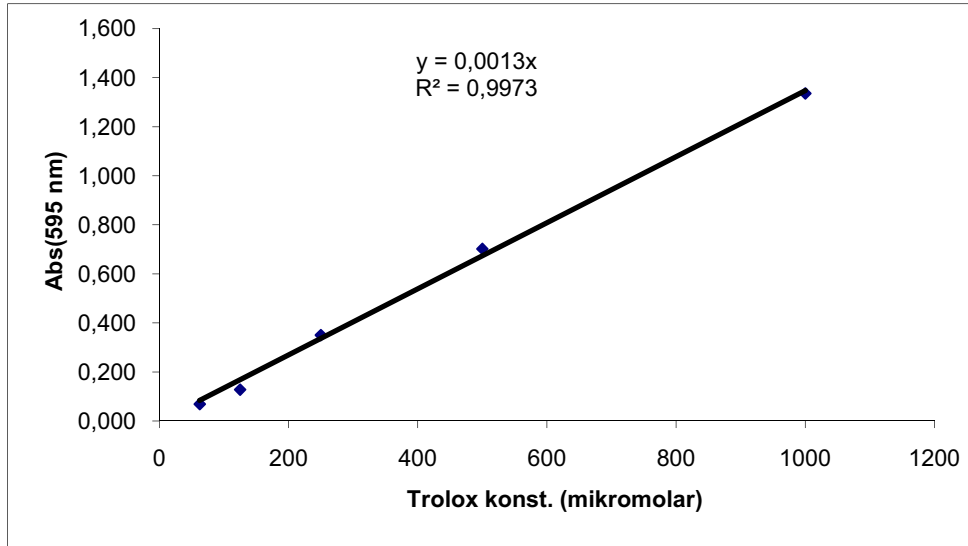
Şekil 29. FRAP yöntemine göre C vitamini konsantrasyonu–absorbans grafiği



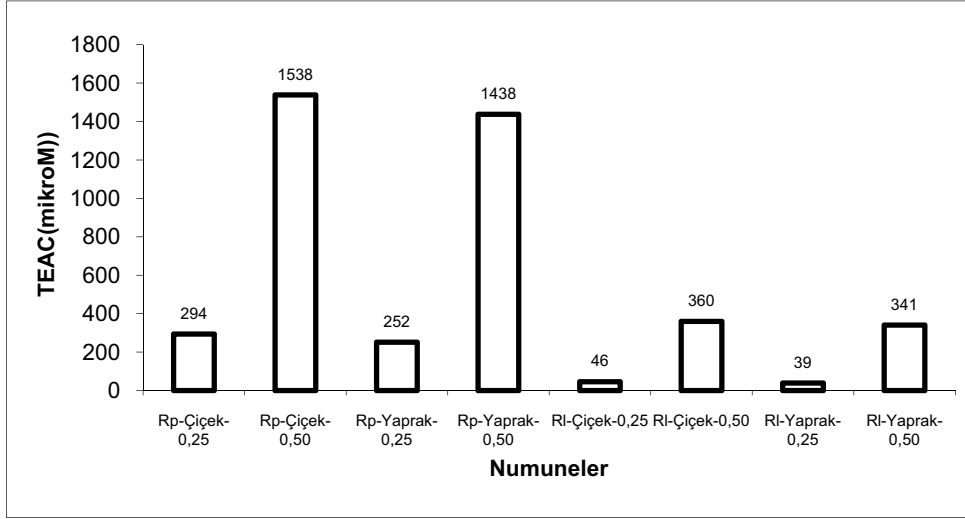
Şekil 30. Ekstraktların FRAP değerleri (μM)



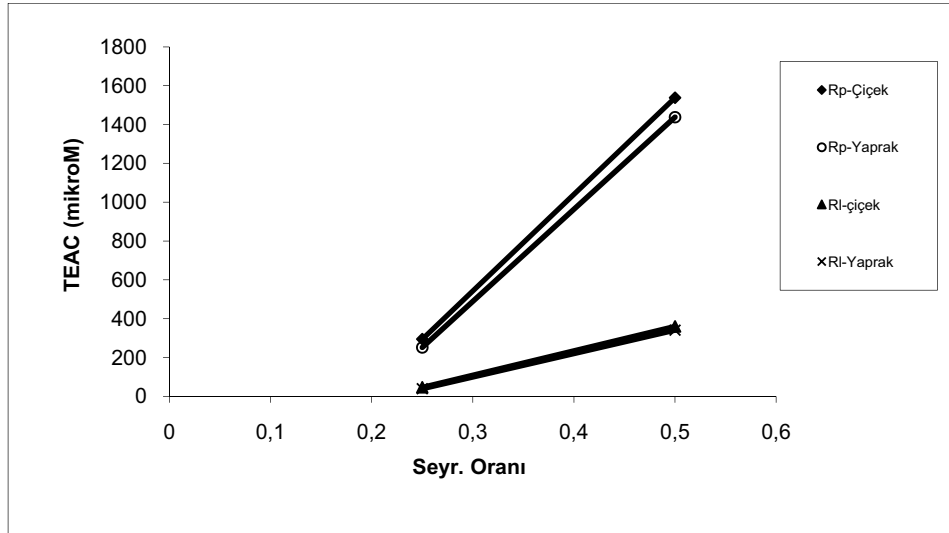
Şekil 31. Ekstrakt konsantrasyonu–FRAP değeri ilişkisi



Şekil 32. FRAP yöntemine göre Trolox konsantrasyonu–absorbans grafiği

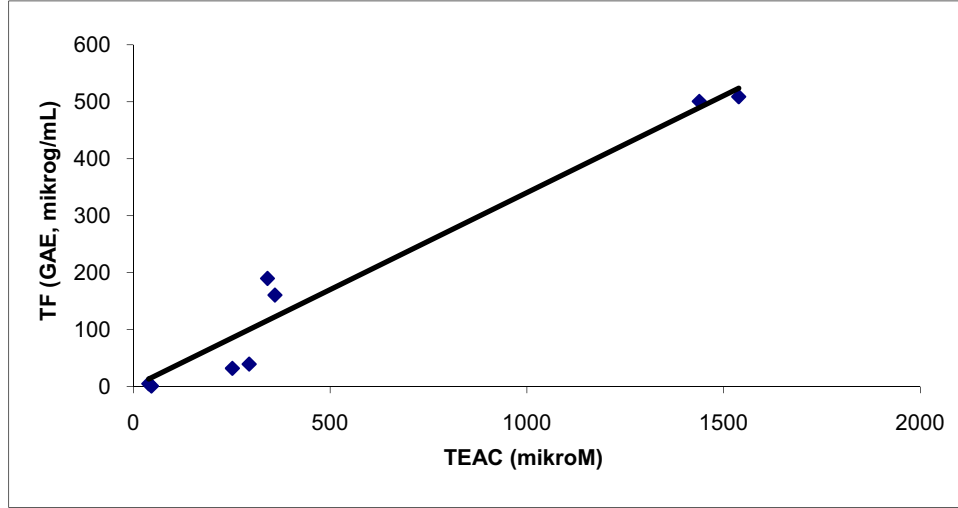


Şekil 33. Ekstraktların TEAC değerleri (µM)



Şekil 34. Ekstrakt konsantrasyonu–TEAC değeri ilişkisi

Numunelerin toplam fenolik madde miktarları ile FRAP metoduna dayalı TEAC değerleri arasındaki ilişkinin gösterilmesi için TEAC (µM) ve GAE µg/mL verileri grafiğe geçirildi (Şekil 35). Bu iki yöntemle belirlenen antioksidan aktiviteler arasında iyi bir korelasyon olduğu görüldü.



Şekil 35. Asetonitril ekstraktlarında TEAC–TF (GAE) ilişkisi

3.2. Asetonitril Ekstraktlarında ve Uçucu Yağlarında Antimikrobiyal Aktivite

Hazırlanan asetonitril ekstraktları ve uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri difüzyon yöntemiyle, ve bu testte yüksek aktivite gösteren asetonitril ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri minimum inhibisyon konsantrasyonlarını (MIC, seyrelme oranı) belirlemek üzere dilusyon yöntemiyle çalışıldı.

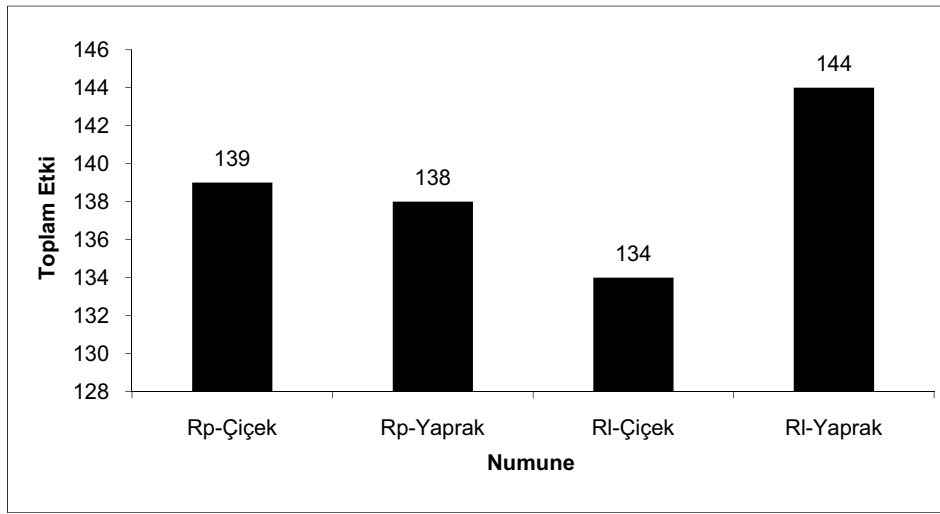
Ekstraktlarda yapılan difüzyon çalışmasında sonuçlar inhibisyon çapı (mm) olarak ifade edildi. Bütün ekstraktların testte kullanılan 3 Gram negatif, 3 Gram pozitif bakteri ve 2 mantar mikroorganizmaların hepsini belirli seviyelerde inhibe ettiği görüldü (Tablo 9).

Tablo 9. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon testi)

Numune	Microorganizmalar ve İnhibisyon Çapları (mm)								Toplam Etki
	Gram (-)			Gram (+)			Mantar		
	<i>E.c.</i>	<i>P.v.</i>	<i>S.t.</i>	<i>S.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>L.m.</i>	<i>C.a.</i>	<i>A.n.</i>	
Rp-Çiçek	22	21	18	15	15	16	17	15	139
Rp-Yaprak	24	20	18	15	16	18	14	13	138
Rl-Çiçek	23	25	16	16	15	15	11	13	134
Rl-Yaprak	24	22	17	17	17	16	14	17	144
Toplam etki	93	88	69	63	63	65	56	58	
Ampicillin	15	26	32	10	25	24	NT	NT	
Cephazolin	15	-	34	-	21	30	NT	NT	
Nystatin	NT	NT	NT	NT	NT	NT	15	14	
Asetonitril	-	?	10	8	-	-	9	-	

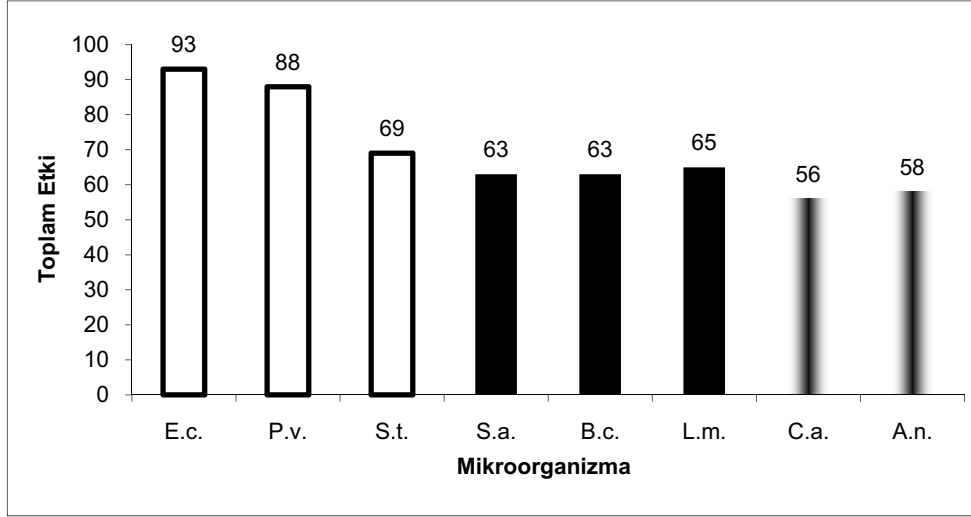
Mikroorganizmalar: *E.c.*: *Escherichia coli*, *P.v.*: *Proteus vulgaris*, *S.t.*: *Salmonella typhimurium*, *S.a.*: *Staphylococcus aureus*, *B.c.*: *Bacillus cereus*, *L.m.*: *Listeria monocytogenes*, *C.a.*: *Candida albicans*, *A.n.*: *Aspergillus niger*. NT: test edilmedi. (-): aktivite gözlenmedi. Testlerde numuneler 15 µL kullanıldı.

Toplamda en yüksek aktiviteyi gösteren ekstraktın belirlenmesi amacıyla elde edilen inhibisyon çap değerleri toplanarak (Tablo 9) sütun grafik hazırlandı (Şekil 36). Bu grafikten *R. luteum* çiçek ekstraktının en düşük aktivite gösterdiği görülmektedir.



Şekil 36. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon testi) açısından en çok etki gösteren ekstraktlar

Benzer şekilde ekstraktlardan en fazla etkilenen, yüksek hassasiyet gösteren mikroorganizmaları belirlemek için inhibisyon çapları mikroorganizma bazında toplandı (Tablo 9) ve sütun grafik olarak çizildi (Şekil 37). Ekstraktlardan bakteriler arasında Gram negatif organizmaların daha fazla etkilendiği, mantarlarda daha az etki gözlemlendiği tespit edildi.



Şekil 37. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (disk difüzyon testi) açısından en çok etkilenen mikroorganizmalar

Gram negatifler: *E.c.*: *Escherichia coli*, *P.v.*: *Proteus vulgaris*, *S.t.*: *Salmonella typhimurium*, Gram pozitifler: *S.a.*: *Staphylococcus aureus*, *B.c.*: *Bacillus cereus*, *L.m.*: *Listeria monocytogenes*, Mantarlar: *C.a.*: *Candida albicans*, *A.n.*: *Aspergillus niger*).

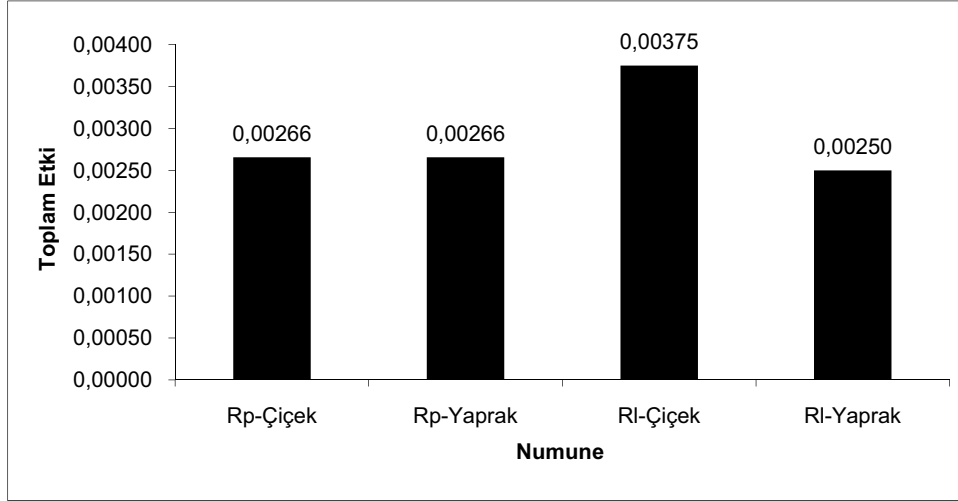
Ekstraktlarda yüksek antimikrobiyal aktivite görülmesi nedeniyle MIC değerleri çalışıldı. Sonuçlar inhibisyonun görüldüğü minimum seyrelme oranı (yani en fazla seyrelme) (MIC) olarak ifade edildi (Tablo 10). Numunelerin 1,25/1000 seyrelme oranlarında bile inhibisyon yapabildiği görüldü.

Tablo 10. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (minimum inhibisyon konsantrasyonu, MIC)

	Minimum İnhibisyon Seyrelme Oranı		
	Microorganizmalar		
	Gram (-)		
Numune	<i>E.c.</i>	<i>P.v.</i>	<i>S.t.</i>
Rp-Çiçek	≥0,00125	≥0,00125	≥0,00125
Rp-Yaprak	≥0,00125	≥0,00125	≥0,00125
Rl-Çiçek	≥0,00125	≥0,00125	≥0,00250
Rl-Yaprak	≥0,00125	≥0,00125	≥0,00250
Gram (+)			
	<i>S.a</i>	<i>B.c.</i>	<i>L.m.</i>
Rp-Çiçek	≥0,00250	≥0,00500	≥0,00250
Rp-Yaprak	≥0,00250	≥0,00250	≥0,00250
Rl-Çiçek	≥0,00250	≥0,00250	≥0,00500
Rl-Yaprak	≥0,00250	≥0,00250	≥0,00250
Mantar			
	<i>C.a.</i>	<i>A.n.</i>	
Rp-Çiçek	≥0,00250	≥0,00500	
Rp-Yaprak	≥0,00500	≥0,00500	
Rl-Çiçek	≥0,01000	≥0,00500	
Rl-Yaprak	≥0,00500	≥0,00250	

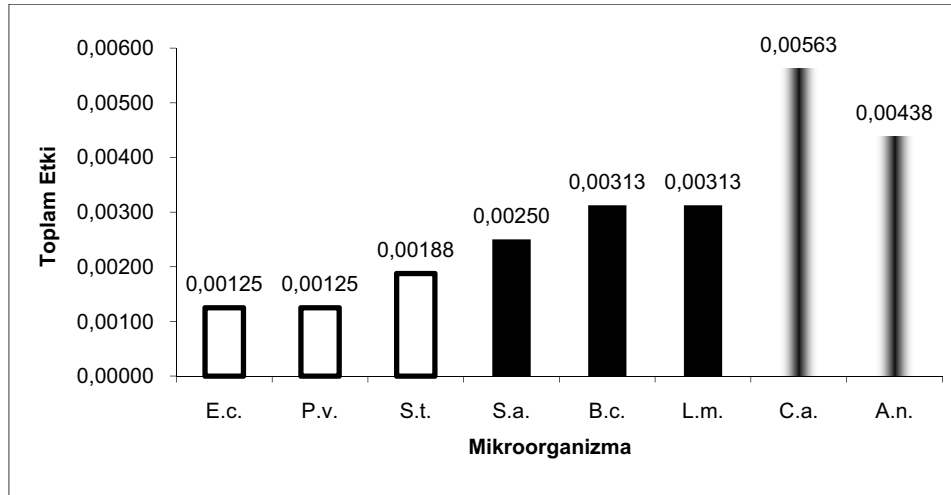
0,00125 seyrelme oranı ekstraktın 1,25/1000 oranında seyreltilmiş olduğunu göstermektedir.

Ekstraktların MIC değerlerine dayalı antimikrobiyal aktivitelerinin toplamda değerlendirilmesi için MIC değerleri toplanarak sütun grafik hazırlandı (Şekil 38). *R. luteum* ekstraktının en yüksek toplam MIC değerine sahip olduğu, dolayısıyla da numuneler arasında en düşük aktiviteye sahip olduğu görüldü.



Şekil 38. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (MIC) açısından en çok etki gösteren ekstraktlar

Mikroorganizmaların hassasiyetini belirlemek için mikroorganizma bazında MIC değerleri toplanarak sütun grafikler elde edildi (Şekil 39). Difüzyon testine benzer şekilde Gram negatiflerin en yüksek hassasiyete sahip olduğu, en az hassasiyetin ise mantarlar tarafından gösterildiği görüldü.



Şekil 39. Asetonitril ekstraktlarında antimikrobiyal aktivite (MIC) açısından en çok etkilenen mikroorganizmalar

(Gram negatifler: *Ec.*: *Escherichia coli*, *P.v.*: *Proteus vulgaris*, *S.t.*: *Salmonella typhimurium*, Gram pozitifler: *S.a.*: *Staphylococcus aureus*, *B.c.*: *Bacillus cereus*, *L.m.*: *Listeria monocytogenes*, Mantarlar: *C.a.*: *Candida albicans*, *A.n.*: *Aspergillus niger*).

R. luteum çiçeklerinin uçucu yağlarında difüzyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal test sonuçları inhibisyon alanı çapı şeklinde ifade edildi (Tablo 11). Normal yöntemle elde edilen uçucu yağın AHC ile elde edilene göre daha yüksek etki gösterdiği görüldü.

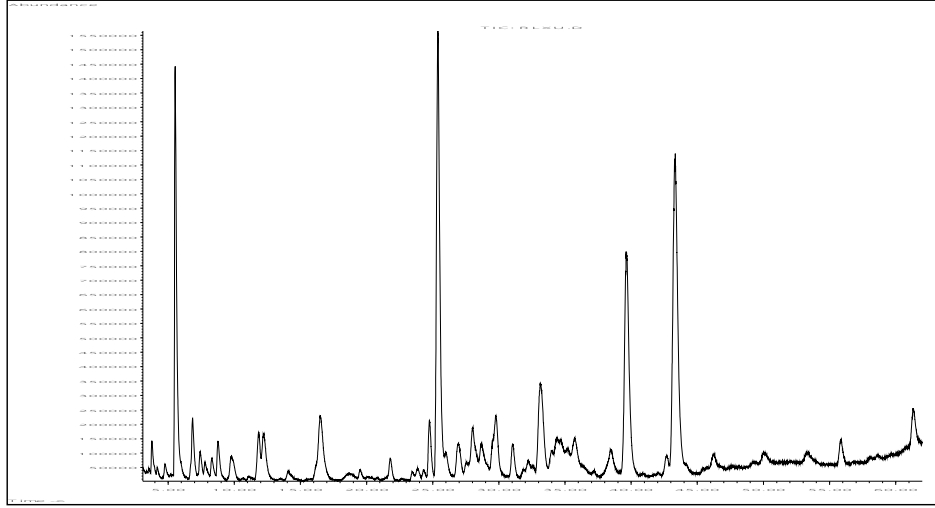
Tablo 11. *R. luteum* çiçeklerinin normal ve asitli Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri

Numune	Mikroorganizmalar ve inhibisyon çapları (mm)								
	Gram (-)			Gram (+)				Mantar	
	<i>E.c.</i>	<i>Y.p.</i>	<i>P.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>L.i.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.f.</i>	<i>C.a.</i>	<i>C.t.</i>
RI-Çiçek-Normal	8	10	6	8	6	9	-	6	7
RI-Çiçek-AHC	-	-	6	8	7	7	-	6	-
HEKZAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETANOL	12	-	6	-	6	7	-	-	-
Ampicillin	10	18	18	15	10	35	10	NT	NT
Triflucan								25	25

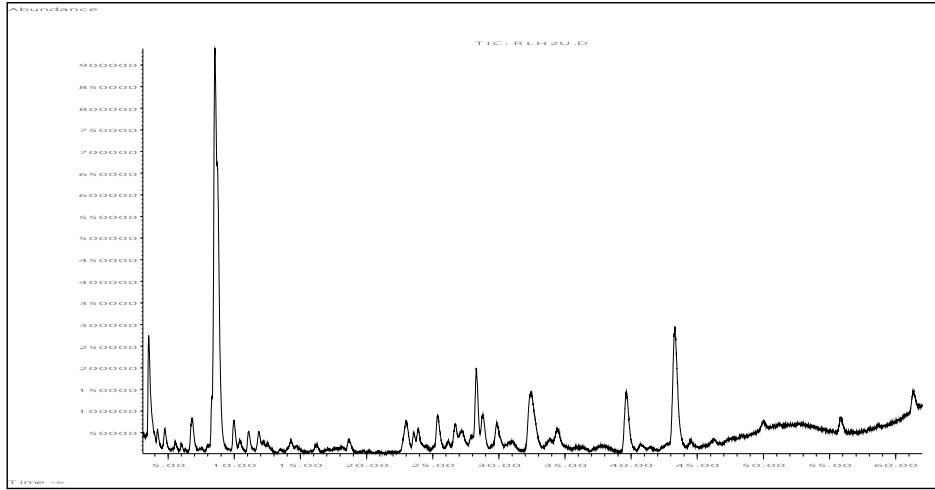
E.c.: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Y.p.*: *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *B.c.*: *Bacillus cereus* 702 Roma, *L.m.*: *Listeria monocitogenes* ATCC 43251, *S.a.*: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *E.f.*: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *C.a.*: *Candida albicans* ATCC 60193, *C.t.*: *Candida tropicalis*. NT: test edilmedi. (-): aktivite gözlenmedi Testlerde numuneler 75 µg/50µL, Standard antimikrobiyaller ise 10 µg/50 µL olarak kullanıldı.

3.3. Uçucu Yağların GC-MS Analizleri

R. luteum çiçeklerinden iki yöntemle elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonlarını belirlemek amacıyla gaz kromatografisi – kütle spektrometrisi analizleri yapıldı. Elde edilen kromatogramlar Şekil 40 ve Şekil 41`de verilmiştir. Clevenger sisteminde asit hidrolizi / katalizi uygulanmasının uçucu yağ kompozisyonuna önemli etkiler yaptığı görülmektedir. Birçok bileşenin pik alanlarında azalmalar olmuş, bazı bileşenler tamamen kaybolmuş, ayrıca ilave yeni piklerin ortaya çıktığı görülmüştür.



Şekil 40. *R. luteum* çiçeklerinin normal Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS kromatogramı



Şekil 41. *R. luteum* çiçeklerinin asitli (AHC) Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS kromatogramı

R. luteum çiçeklerinin normal ve asitli (AHC) Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağlarının GC-MS pik integrasyon analizi sonuçları Tablo 12 ve Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 12. *R. luteum* çiçeklerinin normal Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS analizi sonuçları

Pik No	RT	%Alan	Bileşik Adı	Q
1	3,77	0,64	2e- Hexenal	90
2	4,77	0,38	Bilinmeyen	53
3	5,53	9,22	α - Pinene	95
4	6,85	1,69	β - Pinene	94
5	7,42	0,76	Furan, 2-Pentyl-	91
6	7,79	0,57	<i>trans</i> -2-(2-Penteny)Furan	94
7	8,30	0,64	Delta-2-Carene	96
8	8,77	1,16	Limonene	96
9	9,76	1,10	Benzene Acetaldehyde	91
10	11,85	1,42	Benzoic Acid, Methyl Ester	90
11	12,22	1,99	Linalool	91
12	16,51	3,65	Alpha- Terpeneol	80
13	21,80	0,70	Delta- Elemene	99
14	24,76	1,70	α - Gurjunene	99
15	25,39	15,41	E- Caryophyllene	99
16	25,99	0,84	Germacrene B	95
17	26,95	1,43	α -Humulene	96
18	27,56	0,42	Gamma-Gurjunene	99
19	28,02	2,55	Germacrene D	98
20	28,68	1,92	α - <i>cis</i> -Bergamotene	95
21	29,78	3,43	Delta-Amorphene	98
22	31,05	1,19	Germacrene B	99
23	32,24	0,68	Caryophyllene Oxide	80
24	33,15	5,11	Viridiflorol	99
25	34,00	0,88	Bilinmeyen	56
26	34,38	1,65	Epizonarene	83
27	34,68	1,56	4-Methyl-1-(3',3'-Dimethylbicyc	80
28	35,74	2,57	α -Cadinol	98
29	38,47	1,83	α -Oxobisabolene	97
30	39,65	10,95	Benzyl Benzoate	98
31	42,69	0,76	Bilinmeyen	72
32	43,33	16,75	Benzyl Salicylate	97
33	46,25	1,18	Phenylethyl Salicylate	98
34	50,04	1,01	Bilinmeyen	30
35	55,85	0,92	Tricosane	96
36	61,33	1,34	Pentacosane	99

RT: tutulma zamanı (retention time); Q: kütle spektrometrik verilerin numune ve kütüphane değerleri arasındaki uyum oranı

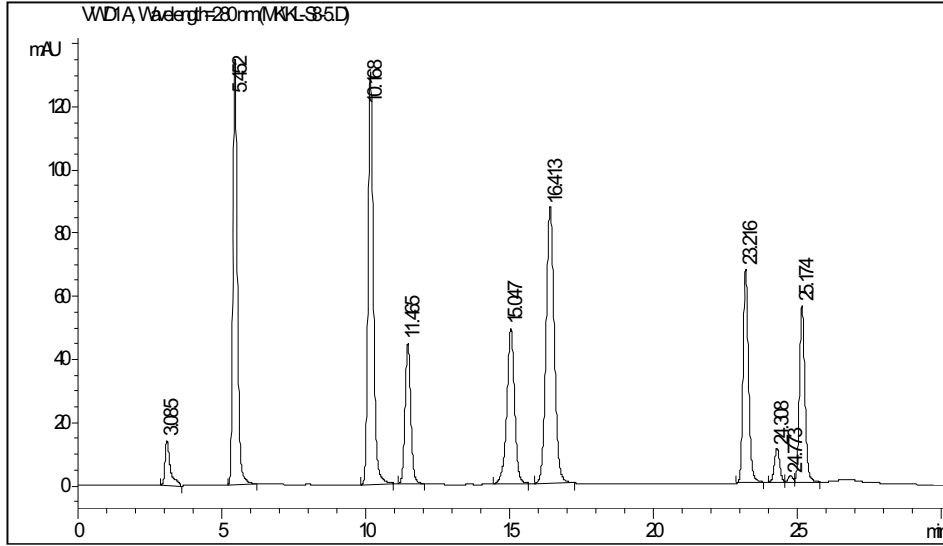
Tablo 13. *R. luteum* çiçeklerinin asitli (AHC) Clevenger destilasyonu ürünü uçucu yağının GC-MS analizi sonuçları

Pik No	RT	%Alan	Bileşik Adı	Q
1	3,54	4,67	2-Furancarboxaldehyde	80
2	4,19	0,47	p-Xylene	95
3	4,75	0,84	Styrene	95
4	5,54	0,35	α -Pinene	95
5	5,99	0,20	Camphene	93
6	6,82	1,74	Benzaldehyde	86
7	7,89	0,18	Gamma-Terpinene	87
8	8,54	31,51	Benzyl Chloride	91
9	9,97	1,46	Gamma- Terpinene	96
10	10,42	0,54	Bilinmeyen	59
11	11,09	0,92	Delta-2 Carene	95
12	11,85	0,79	Benzoic acid, methyl ester	80
13	14,29	0,48	Bilinmeyen	58
14	16,21	0,46	Methyl Salicylate	91
15	18,67	0,80	Carvenone	93
16	23,00	2,60	Benzene, 2-(1,3-butadienyl)-1,3	90
17	23,57	0,95	Tricyclo	98
18	23,91	1,52	Presilphiperfol	93
19	25,37	2,80	4,8- β -Caryophyllane	98
20	26,16	0,66	α - Gurjunene	96
21	26,71	1,82	Zonarene	93
22	27,23	2,11	Zonarene	96
23	28,30	5,50	Delta-Selinene	98
24	28,80	2,58	Zonarene	99
25	29,84	2,68	<i>cis</i> - Calamenene	96
26	31,01	1,43	Bilinmeyen	46
27	32,43	6,84	Caryolan-8-Ol	91
28	33,88	1,07	Bilinmeyen	64
29	34,43	2,13	Bilinmeyen	46
30	39,65	4,54	Benzyl Benzoate	96
31	40,72	0,40	Tetradecanoic acid	96
32	42,69	0,34	Bilinmeyen	58
33	43,31	10,28	Benzyl Salicylate	94
34	44,50	0,46	Methyl Hexadecanoate	93
35	46,26	0,52	Phenylethyl salicylate	95
36	47,66	0,23	Thiosulfuric acid	96
37	48,31	0,16	Cyclopropanoanal	95
38	50,04	0,63	Thiosulfuric acid	96
39	55,86	0,97	Tricosane	91
40	61,34	1,00	Pentacosane	96

RT: tutulma zamanı (retention time); Q: kütle spektrometrik verilerin numune ve kütüphane değerleri arasındaki uyum oranı

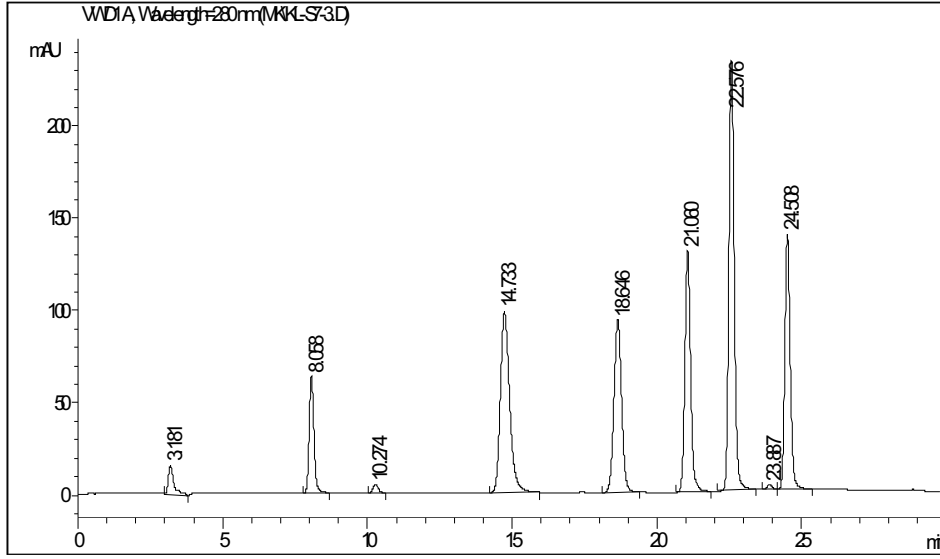
3.4. Bitki Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin Analizi

Rhododendron (ormangülü) mor ve sarı türlerinin çiçek ve yaprak ekstraktlarının kimyasal kompozisyonunun aydınlatılmasına katkı sağlamak amacıyla ekstraktlarda fenolik asit belirlenmesi HPLC-UV yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaçla ekstraktlar SPE kartuşlar kullanılarak iyon değişimi kromatografisini takiben RP-HPLC-UV sisteminde standartlarla geliştirilen gradient programa göre analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan standartların uygulanan yöntemle elde edilen kromatogramları Şekil 42 ve 43'de görülmektedir. Aynı yöntemin numunelere uygulanmasıyla elde edilen kromatogramlar da Şekil 44, 45, 46 ve 47'de verilmiştir.



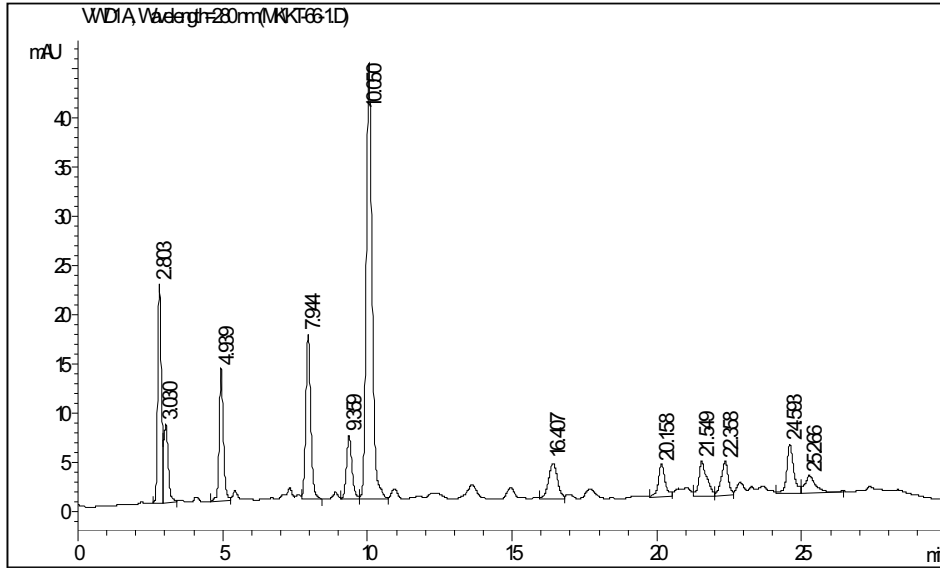
Şekil 42. Standart olarak kullanılan 8 fenolik asitin HPLC-UV kromatogramı

(1: gallik asit, 3: protokatekaldehit, 5: p-OH-benzoik asit, 6: vanilik asit, 8: kafeik asit, 11: siringaldehit, 13: benzoik asit, 15: sinapik asit).

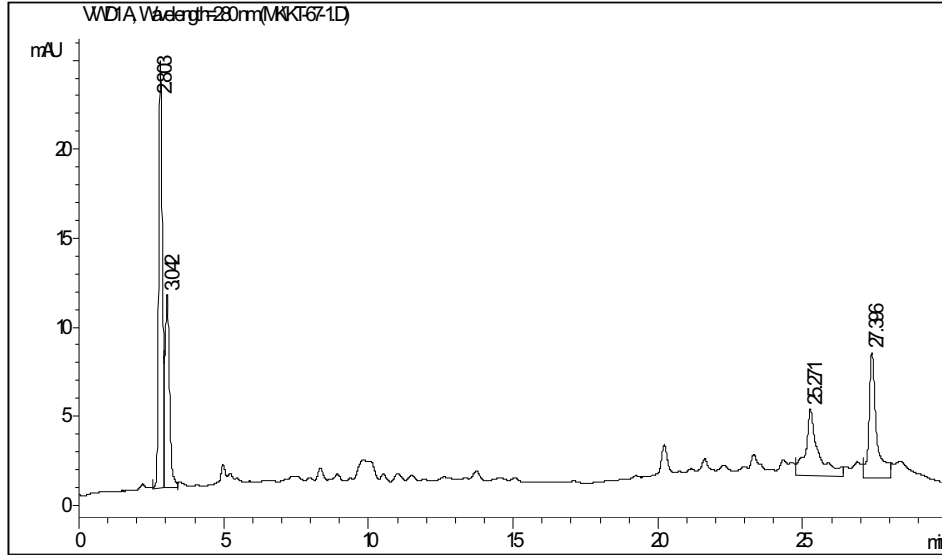


Şekil 43. Standart olarak kullanılan 7 fenolik asitin HPLC-UV kromatogramı

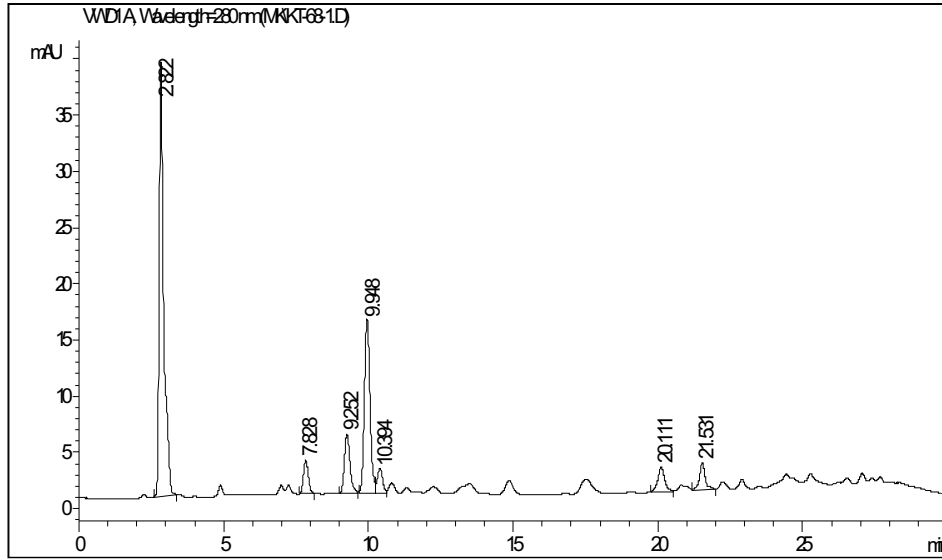
(2: protokatekuik asit, 4: gentisik asit, 7: klorojenik asit, 9: siringik asit, 10: vanilin, 12: p-kumarik asit, 14: ferulik asit).



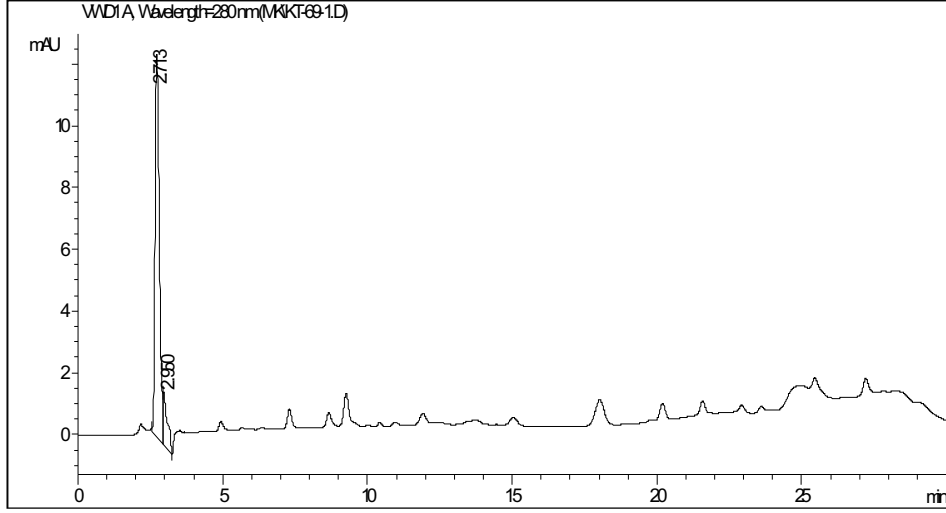
Şekil 44. *R. ponticum* çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı



Şekil 45. *R. ponticum* yapraklarının asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı



Şekil 46. *R. luteum* çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı



Şekil 47. *R. luteum* yapraklarının asetonitril ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramı

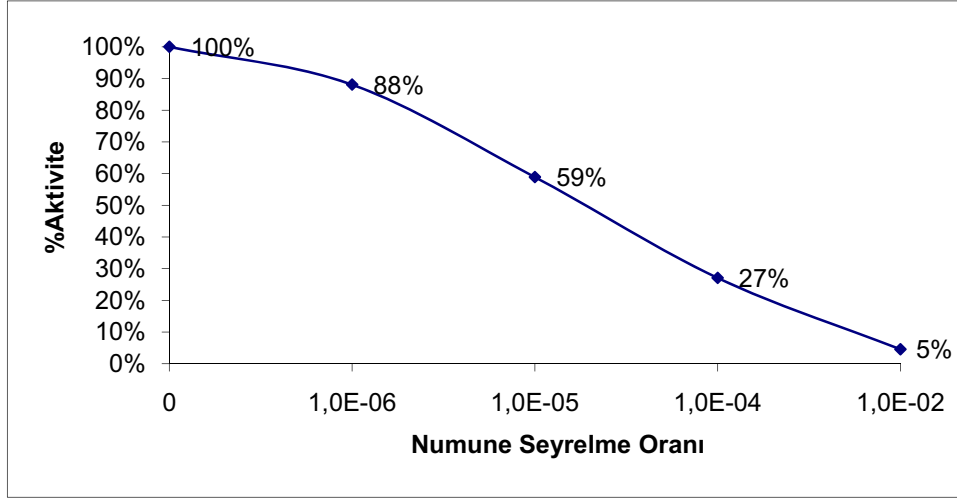
Uygulanan SPE-RP-HPLC-UV yöntemiyle elde edilen verilerin Chemstation programı kullanılarak yapılan integrasyon ve RT ve pik alanı analizi sonucunda çalışmada kullanılan standartlardan numunelerde hangilerinin ve hangi miktarlarda bulunduğu pik alanlarına dayalı yarı-kantitatif olarak belirlenmiştir (Tablo 14). Çiçek ekstraktlarının fenolik asitler açısından yapraklara göre daha zengin olduğu görülmektedir. Numunelerde görülen standart fenolik asitlerden gallik asit, protokatekuik asit, protokatekaldehit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit, kaffeik asit *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit görülmüştür.

Tablo 14. Fenolik bileşenlerin tutulma zamanı ve numunelerin pik alanları

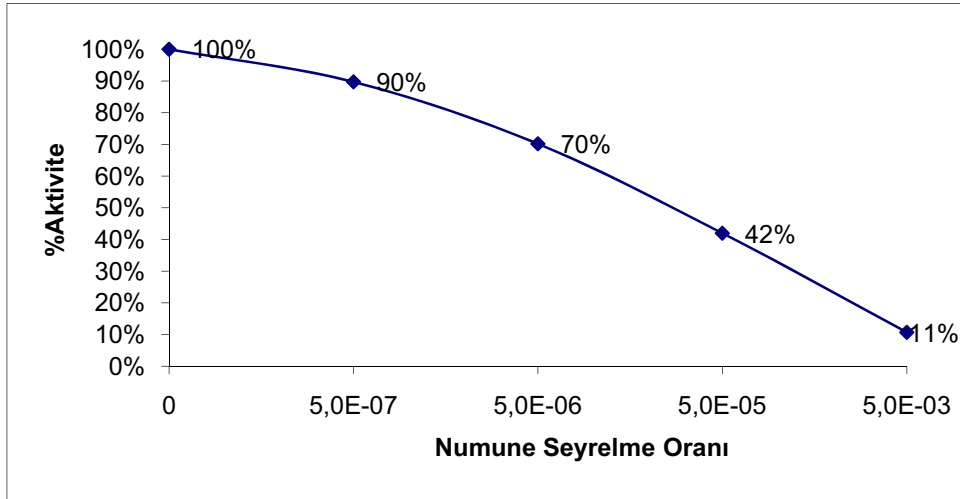
Bileşen	Tutulma Zamanı (RT, dak)	Pik Alanları			
		Rp-Çiçek	Rp-Yaprak	R _L -Çiçek	R _L -Yaprak
Gallik asit	5,10	141,5	124	-	-
Protokatekuik asit	7,53	13,9		14,5	16,7
Protokatekaldehit	9,60	67,3		213,2	-
Gentisik asit	13,57	-		-	-
<i>p</i> -OH Benzoik asit	10,68	439,7		91,5	98
Vanillik asit	- 14,48	-		-	-
Chlorojenik asit	13,85	41,7		-	-
Kaffeik asit	15,17	33,1	5,3	33,1	-
Siringik asit	- 16,94	-		-	-
<i>p</i> -Kumarik asit	21,81	72,8	13,1	44,4	40,9
Benzoik asit	23,82	-		-	-
Ferulik asit	23,78	-	9,9	-	22,7
Sinapik asit	24,86	107,5		-	-

3.5. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Etkileri

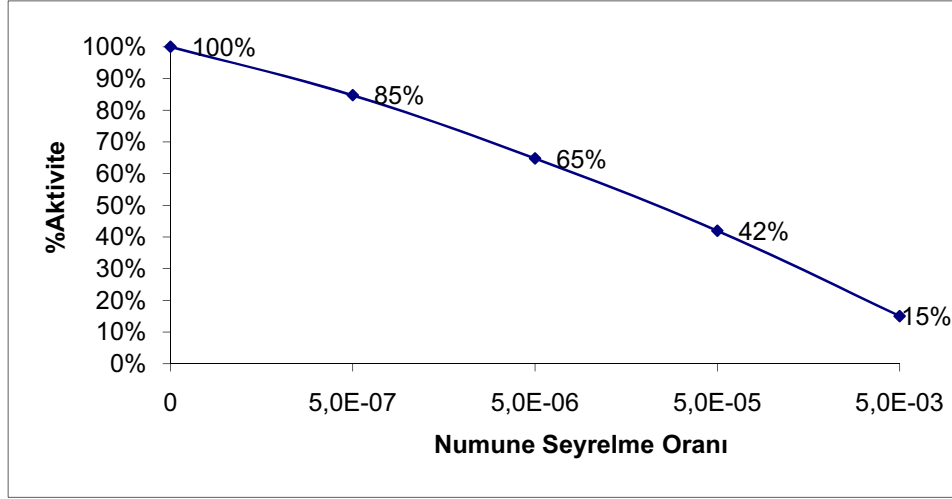
Hazırlanmış olan ormangülü ekstraktlarının karbonik anhidraz enzim aktivitesine etkilerini belirlemek amacıyla ekstraktlardan seri seyreltmeler yapılmış ve aktiviteye olan etkilerinin göstermek için enzimin hidrataz aktivitesi ekstrakt yokken ve varken ölçülmüştür. Bu çalışmada hem insan karbonik anhidraz I (CA-I) hem de insan karbonik anhidraz II (CA-II) izoenzimleri kullanılmıştır. Bu ölçümlerden ekstrakt bulunduğu durumda enzimin %kalan aktivitesi numune seyrelme oranına karşı grafiğe geçilmiştir (CA-I inhibisyonu için Şekil 49, 50, 51 ve 52, CA-II inhibisyonu için Şekil 54, 55, 56 ve 57). Karşılaştırma amacıyla aynı yöntem literatür de Standard olarak yaygın kullanılan asetazolamit için de uygulanmış ve sonuç aynı şekilde grafiksel olarak ifade edilmiştir (CA-I için Şekil 48 ve CA-II için Şekil 53).



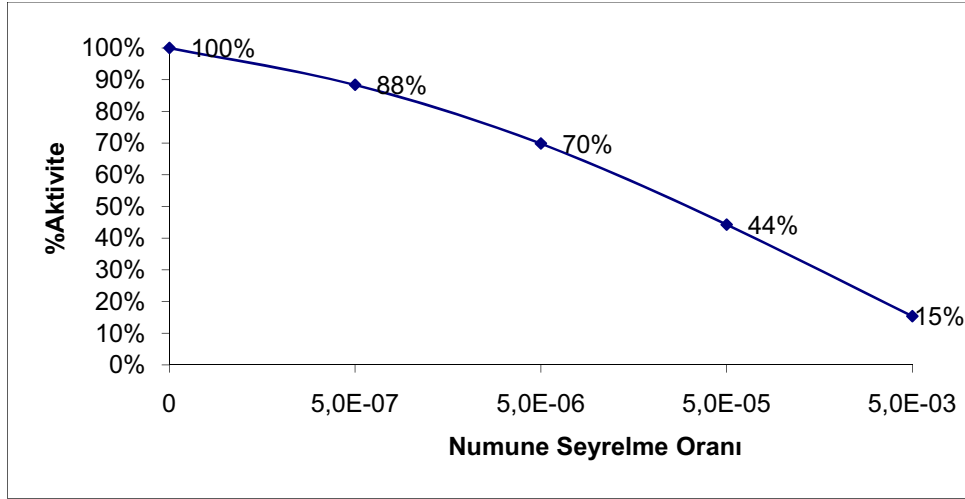
Şekil 48. Standart olarak kullanılan asetazolamidin konsantrasyon–CA-I %kalan aktivite grafiği



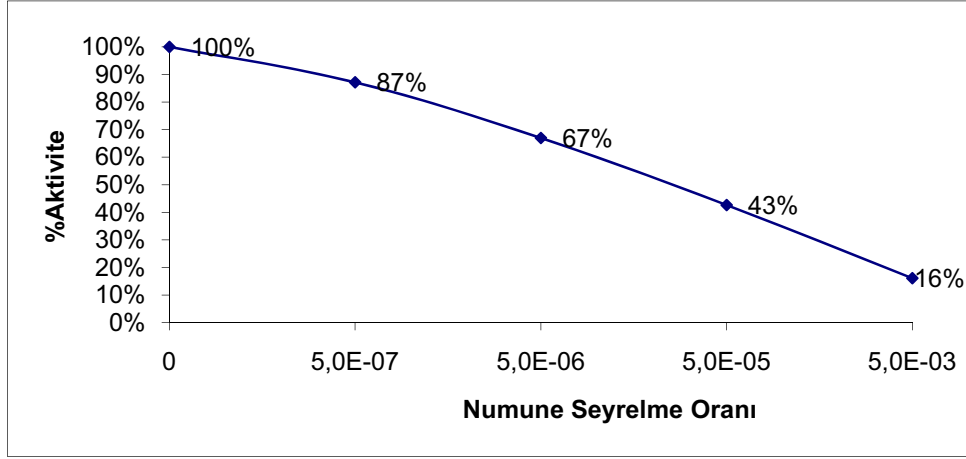
Şekil 49. *R. ponticum* çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği



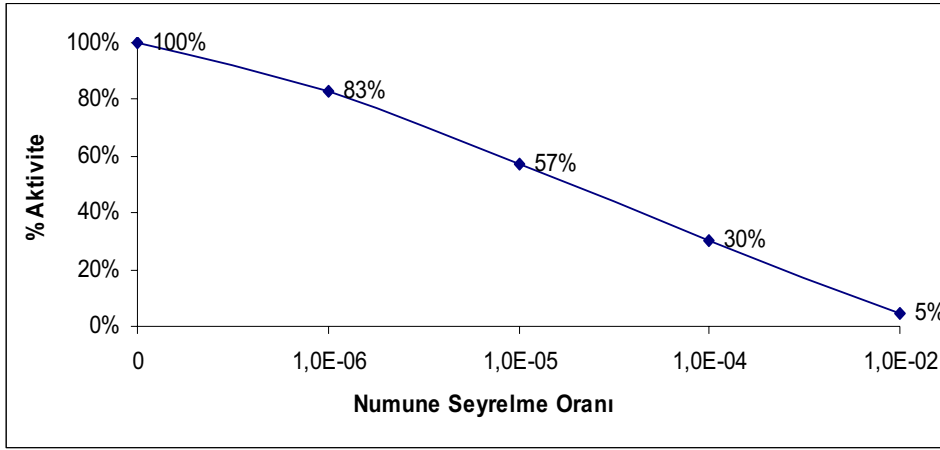
Şekil 50. *R. ponticum* yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği



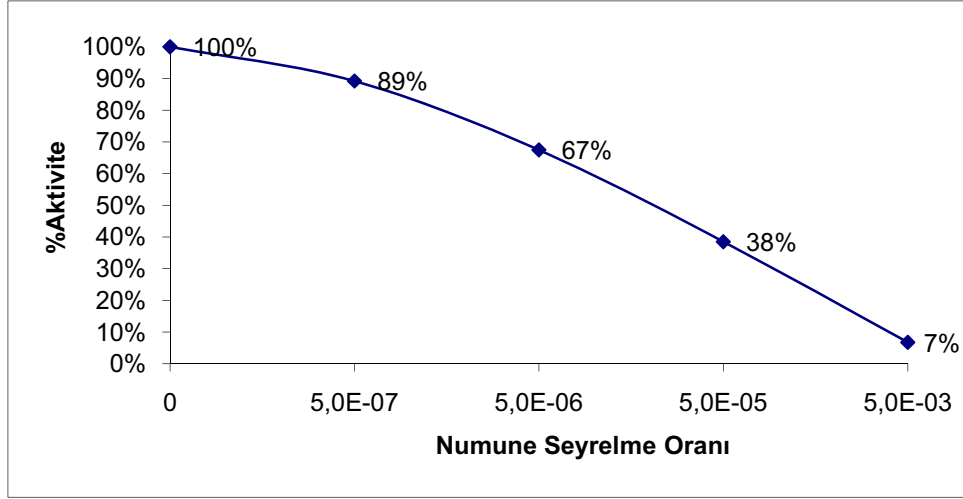
Şekil 51. *R. luteum* çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği



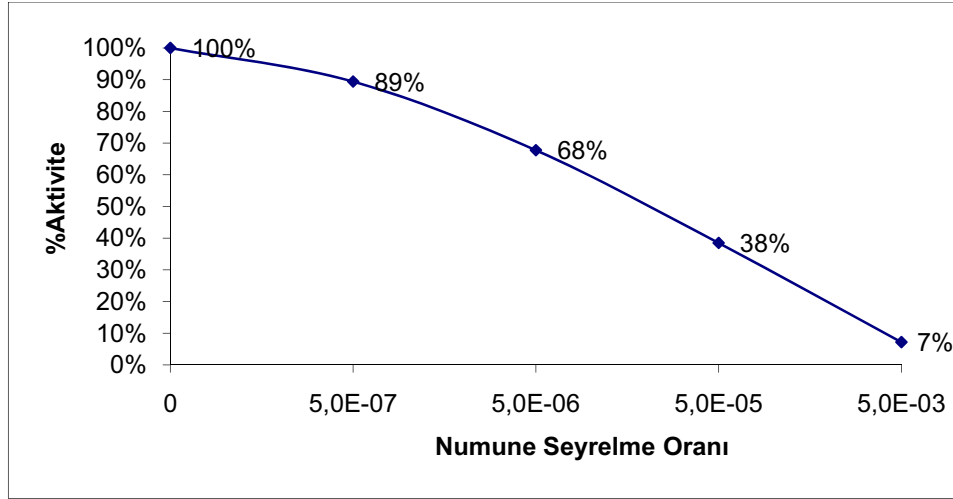
Şekil 52. *R. luteum* yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-I % kalan aktivite grafiği



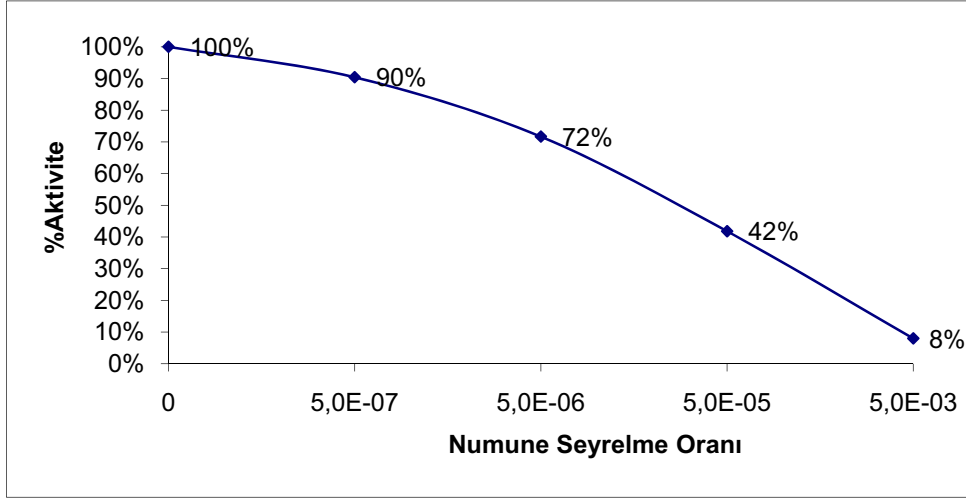
Şekil 53. Standart olarak kullanılan asetazolamidin konsantrasyon–CA-II %kalan aktivite grafiği



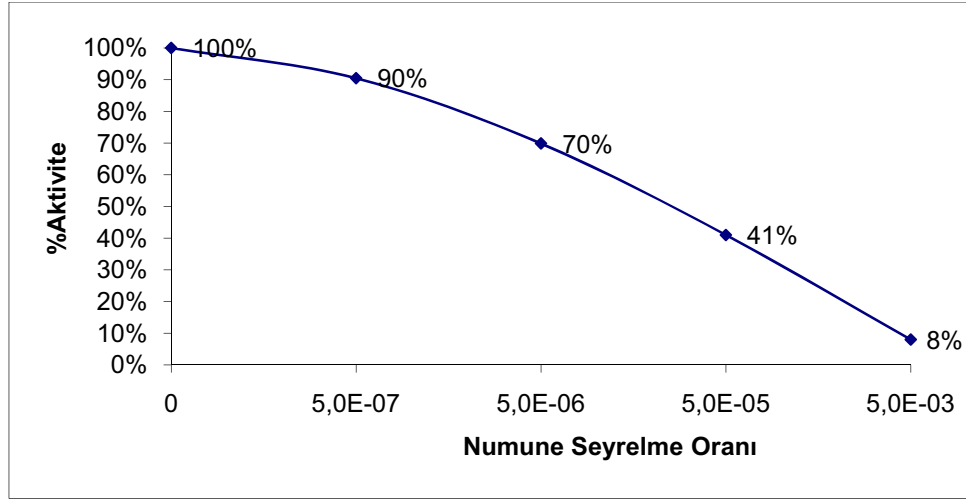
Şekil 54. *R. ponticum* çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı–CA-II % kalan aktivite grafiği



Şekil 55. *R. ponticum* yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı – CA-II %kalan aktivite grafiği

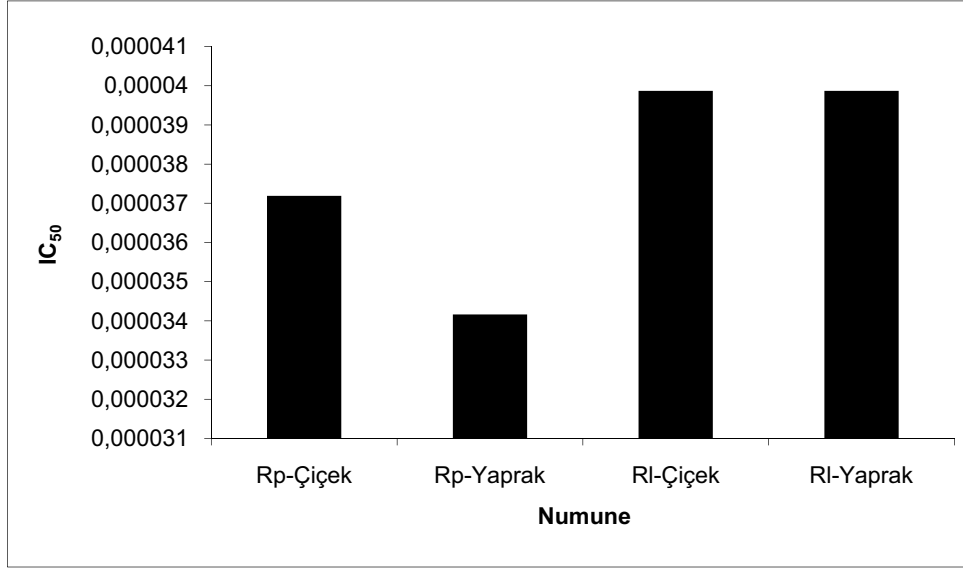


Şekil 56. *R. luteum* çiçeklerinin asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı-CA-II % kalan aktivite grafiği

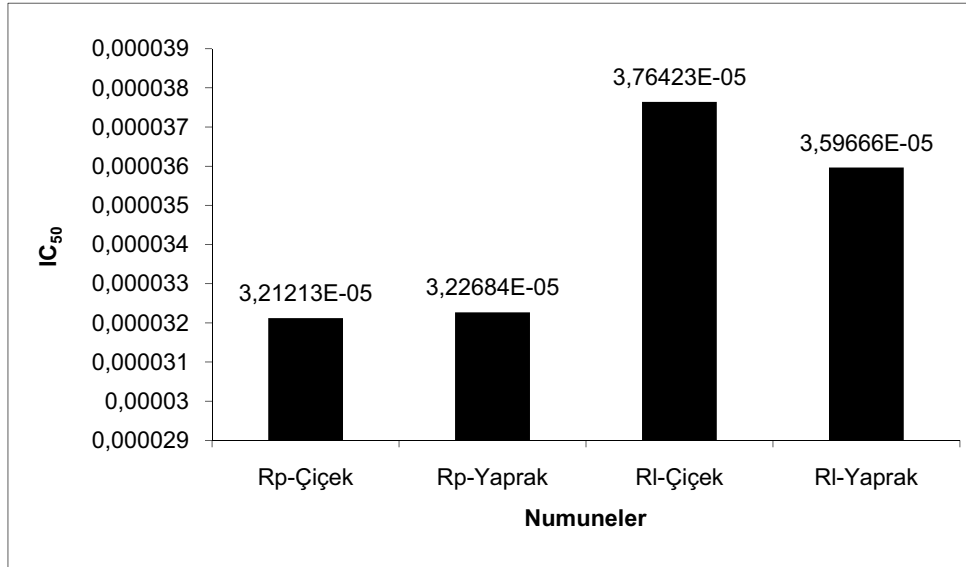


Şekil 57. *R. luteum* yapraklarının asetonitril ekstraktlarının seyrelme oranı-CA-II % kalan aktivite grafiği

Bitki ekstraktlarıyla elde edilen IC_{50} değerlerinin karşılaştırılması için bu değerler kullanılarak sütun grafik hazırlanmıştır (CA-I için Şekil 58 ve CA-II için Şekil 59) mor ormangülü (komar) ekstraktlarının daha düşük IC_{50} değerleriyle daha ileri enzim inhibisyonu yaptığı görülmüştür.



Şekil 58. *Rhododendron* asetonitril ekstraktlarının insan karbonik anhidraz I enzimine karşı IC₅₀ değerleri



Şekil 59. *Rhododendron* asetonitril ekstraktlarının insan karbonik anhidraz II enzimine karşı IC₅₀ değerleri

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Karadeniz bölgesinde yaygın olarak yetişen ormangülü türlerinden *R. ponticum* ve *R. luteum* asetonitril ekstraktlarında ve uçucu yağlarında kimyasal kompozisyonu ve biyolojik aktiviteyi belirlemek için yapılan bu çalışmada numunelerde antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteler araştırılmış, kimyasal kompozisyon belirlenmesinde HPLC ve GC kromatografik analiz yöntemleri uygulanmıştır.

Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde asetonitril ekstraktlarının yüksek derecede antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu aktiviteden sorumlu bileşenlerin belirlenmesi önemlidir. Bu anlamda bu çalışma kapsamında sadece fenolik asit kompozisyonu belirlemeye çalışılmış, ekstraktlarda gallik asit, protokatekuik asit, protokatekaldehit, *p*-OH benzoik asit, klorojenik asit, kaffeik asit *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan ekstraktların biyoaktivitesi çalışmalarında literatürde de pek çalışılmamış olan karbonik anhidraz aktivitesine etkileri araştırılmıştır. İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin her ikisinin de elde edilen tüm ekstraktlar tarafından inhibe edildiği görülmüştür. Bu enzimin inhibitörlerinin glakom, kanser, diyabet, epilepsi dahil bir çok hastalıkta kullanım potansiyelinin olması, bu bitkilerin bileşenleri ve CA inhibisyonundan sorumlu olanlarının belirlenmesi çalışmalarını değerli yapmaktadır.

Sarı ormangülü (zifin) çiçekleri ile yapılan uçucu yağ eldesinde klasik ve asitli (AHC) uygulama sonucu elde edilen ürünlerde antioksidan ve antimikrobiyal çalışmalar yapılmış, AHC uygulamasının biyoaktiviteye önemli etkisinin olduğu görülmüştür. Bu etkidenden sorumlu bileşiklerin aydınlatılması amacıyla uçucu yağlarda GC-MS analizi yapılmış ve bileşenler MS kütüphane verileri ve RT değerleri literatür verileriyle karşılaştırılarak belirlenmiştir. AHC uygulaması neticesinde bazı bileşiklerin miktarlarının azaldığı, bazılarının tamamen kaybolduğu, bunun yanında bazı yeni bileşiklerin de oluştuğu görülmüştür. AHC uygulamasında asit katalitik dönüşümlerinin çeşitliliği göze çarpmaktadır. Bu yöntem bitkilerde yapılacak kemotaksonomik araştırmalar için iyi bir araç olma kapasitesindedir.

Sonuç olarak çalışma bulguları *R. ponticum* ve *R. luteum* iek ve yapraklarında biyoaktivite ve bundan sorumlu bileşenlerin belirlenmesinin hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan değerli olacağını göstermektedir.

5. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yay., Konya
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Altun, M., 2005. Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method, Taylor & Francis, 39, 9, 949-961.
- Bagci, E. ve Baser, K.H.C., 2005, "Study of essential oils of *Thymus haussknechtii* Velen and *Thymus kotschyanus* Boiss. et Holden var. *kotschyanus* (lamiaceae) taxa from the eastern Anatolian region in Turkey", Flavour and Fragrance Journal.
- Baytop, T., 1999, Türkiye'de Bitkilerle Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Baytop, T., 1972, Farmakognozi ders kitabı, 1, İstanbul Üniversitesi Yayını No:1810, Baha matbaası.
- Baytop, T., Farmakognozi, 1986, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3399, Ecz. Fak., 51, İstanbul.
- Baugh P. J., 1993, Gas Chromatography: A Practical Approach, Oxford University Press.
- Burt, S., 2004, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review", International Journal Of Food Microbiology.
- Ceylan, A., 1987, Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler), 481, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir.
- Chang L.C., Kinghorn A.D. ve C. Tringali, 2001, Bioactive Compounds from Natural Sources, Taylor & Francis, London, 159.
- Chen, L. H., Boissonneault, G. A. ve Glauert, H. P., 1988. Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res. 8, 739-748.
- Cuendet M., Hostettmann K. ve Potterat O., 1997, Helv. Chim. Acta 80, 1144-1152.
- Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000, "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils", Journal of Applied Microbiology.
- Edge R., Mc Garvey D. J. ve Truscott, T. G., 1997, The carotenoids as antioxidants-a review, J. Photoch. Photobio., 41, 189-200.

- Erel O., 2004, A novel automated method to measure total antioxidant response against free radical reactions, Clin. Biochem., 37, 2, 112-119.
- Fifth Edition, Kiliç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing, US, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Higgins, R. Hannam, D. Humphreys, D. And Stodulsky, J. 1985, *Rhododendron* poisoning in sheep, Veterinary Record, Vol. 116, No. 11.
- Harborne, J.B., 1994. The Flavonoids Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall/CRC, USA, 638.
- Jaffé H.H. ve Orchin M., 1964, Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York.
- Küçük, Y. ve Demeli, M. 1985 Ormangülü (*Rhododendron ponticum L.*) Yapraklarındaki Furfural Miktarı, Orm. Arş. Ens. Yay. Tek. Bül. Seri No: 139.
- Karacalıoğlu, T. 1974, *Ormangülü (Rhododendron sp.)* Odunlarının Bazı Özellikleri ile Bu Odunların Yonga Levha Yapımında Kullanılma Olanaklarının Laboratuvar Koşullarında Araştırılması, Orm. Arş. Ens. Yay. Tek. Bül. Seri No: 60.
- Kayacık, H. 1966, Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematiği, Angiospermae(Kapalı Tohumlar), 3. İ.Ü. Orm. Fak. Yay. İstanbul, 106, 1189.
- Lindsay S., 1987, High Performance Liquid Chromatography (Analytical Chemistry by)
- Mchoy, P., Colour Dictionary of Trees and Shrubs, Marshall Cavendish Books, London, 1994.
- Open Learning), Wiley, New York.Meister, A. ve Anderson, M. E., 1983. Glutathion, Annu. Rev. Biochem.
- Ohkawa H., Ohishi N. ve Yagi K., 1979, Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbuturic Acid Reaction, Anal. Biochem., 95, 351-358.
- Oyaizu, M., 1986, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Jap. J. Nutr., 44, 307-315.
- Özyurt, M. S., 1992, Ekonomik Botanik, Erciyes Üniversitesi Yayınları No: 47, Kayseri.
- Sandra P., 2004, Advanced Separation Science, Ghent University, Belgium.
- Slinkard K. ve Singleton V. L., 1977, Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult.
- Skocbušić, M., Bezic, N., Dunkic, V., 2006, “Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata*

Skoog D.A., James Holler F. ve Nieman T.A., 1998, Principles of Instrumental Analysis, Vis.growing in Croatia”, Food Chemistry.

Tanker, M., Tanker, N., 1990, Farmakognozi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayını No:65, Ankara.

URL-1, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Ekstraksiyon>, 2006.

URL-2, http://papyrus.ankara.edu.tr/tez/FenBilimleri/Doktora_Tezleri/2004/FD, 2004.

URL-3, <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/gc/gc.html>, 2006.

URL-4, www.waters.com, 2006.

URL-5, <http://hplc.chem.shu.edu>, 2006.

URL-6, <http://www.chromatography-online.org>, 2006.

URL-7, http://sci.ege.edu.tr/~eubio/yaz_okulu/hplc.htm, 2006.

Zeybek, U., Zeybek, N., 2002, Farmasötik Botanik Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematigi ve Önemli Maddeleri, 3 (Degistirilmis 3. baskı) Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayinlari, Ege Üniversitesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir.

Wollgast J. ve Anklam E., 2000, Rewiew on Polyphenols in Theobroma cacao: Changes in Composition During the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification, Food Res. İnt.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Trabzon'da doğdu. Trabzon Lisesi'nde öğrenimini tamamladı. 2003 yılında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne kayıt yaptırdı. 2007 yılında bu bölümden Kimyager ünvanıyla mezun oldu. Bir yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yabancı dil eğitimi aldı ve aynı Üniversite de Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına başladı ve halen de eğitimine devam etmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.