

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



***INULA VISCOSA* (L.) AITON BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL
ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÇİĞDEM BERBER

DOKTORA TEZİ

Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. Turgut KILIÇ (Tez Danışmanı)**
 Prof. Dr. Akın AZİZOĞLU
 Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK
 Doç. Dr. Sema ÇARIKÇI
 Doç. Dr. Züleyha ÖZER ARSLANKAN

BALIKESİR, TEMMUZ-2026

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “*Inula viscosa* (L.) Aiton Bitkisinin Fitokimyasal Analizi ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Çiğdem BERBER

ÖZET

***INULA VISCOSA* (L.) AITON BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ÇİĞDEM BERBER

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)

BALIKESİR, TEMMUZ - 2026

Bu çalışma, *Inula viscosa* (L.) Aiton bitkisinin toprak üstü kısımlarının fitokimyasal incelenmesini; bitki ekstrelerindeki toplam fenolik/antosiyanın içerikleri, fenolik bileşenleri, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesini amaçlamaktadır.

GC-MS yöntemiyle analiz edilen *I. viscosa* uçucu yağında toplam 74 bileşen tespit edilmiş, en baskın ana bileşenin %10,60 oranı ile bir oksijenli seskiterpen olan (Z)- α -trans-bergamotol olarak belirlenmiştir. Hazırlanan hekzan (IVH), aseton (IVA), metanol (IVM) ile direkt petrol eteri (DIVPE), direkt aseton (DIVA), direkt metanol (DIVM), dekoksasyon (IV-def) ve infüzyon (IV-inf) ekstrelerinin sekonder metabolit profilleri LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilerek toplam 33 bileşen tanımlanmıştır. Tüm ekstrelerde baskın bileşenlerin ramnositrin (%60-86) ve nepetin-7-glikozit (%5-15) olduğu saptanmıştır. Ayrıca, toplam fenolik madde içeriği en zengin ekstrenin IVA (3838,16 mg/kg) olduğu belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemiyle, toplam antosiyanın içeriği ise pH-diferansiyel metoduyla belirlenmiştir. Analizler sonucunda, toplam fenolik içeriği en zengin ekstrenin IVM ($702,2 \pm 0,12$ mg GAE/g) olduğu, toplam antosiyanın miktarı en yüksek içeriğin ise IVA ekstresi (0.465 ± 0.001 siyanidin-3-glukozit eşdeğeri) olduğu saptanmıştır. Ayrıca bitkiden toplam 4 bileşik (inuviskolit, tomentosin, karabron ve pulşalkonoit C) izole edilmiş ve yapıları NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, HMBC) teknikleri ile aydınlatılmıştır.

Ekstrelerin antioksidan kapasiteleri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal giderme, bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) ve demir (III) indirgeyici antioksidan güç tayini (FRAP) yöntemleriyle değerlendirilmiştir. DPPH ve CUPRAC testlerinde en yüksek antioksidan aktiviteyi IVM ekstresi, FRAP testinde ise IV-def ve IV-inf örnekleri göstermiştir. Ekstrelerin antioksidan potansiyellerinin toplam fenolik içerikleriyle doğru orantılı olduğu saptanmıştır. Antimikrobiyal çalışmalar; ekstrelerin gram-pozitif bakteri ve fungal türlere karşı etkili, gram-negatif bakterilere karşı ise direnç gösterdiğini kanıtlamıştır. Özellikle orta ve yüksek polariteli ekstrelerin daha yüksek inhibitör aktivite sergilediği görülmüştür. Sonuç olarak, *I. viscosa* ekstrelerinin zengin fenolik içerikleriyle güçlü antioksidan ve antimikrobiyal potansiyel taşıdığı saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, flavonoid, *Inula viscosa*, LC/MS-MS

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *INULA VISCOSA* (L.) AITON

PH.D THESIS

ÇİĞDEM BERBER

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF.DR. TURGUT KILIÇ)

BALIKESİR, JUNE - 2026

This study aims to investigate the phytochemical profile of the aerial parts of *Inula viscosa*, determine total phenolic and anthocyanin contents, analyze phenolic components, and comprehensively evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of these extracts.

Seventy-four components were identified in the *I. viscosa* essential oil analyzed by GC-MS, with (Z)- α -trans-bergamotol, an oxygenated sesquiterpene, being determined as the most dominant main component at a rate of 10.60%. Secondary metabolite profiles of hexane (IVH), acetone (IVA), methanol (IVM), direct petroleum ether (DIVPE), direct acetone (DIVA), direct methanol (DIVM), decoction (IV-def) and infusion (IV-inf) extracts were analyzed via LC-MS/MS, identifying 33 components. Rhamnocitrin (60-86%) and nepetin-7-glucoside (5-15%) were the dominant compounds in all extracts. IVA (3838.16 mg/kg) had the highest phenolic content by LC-MS/MS. Spectrophotometric analyses showed the highest total phenolic content in IVM (182.64 ± 0.03 mg GAE/g) and the highest total anthocyanin content in IVA (0.465 ± 0.001 cyanidin-3-glucoside equivalent). Additionally, four compounds (inuviscolide, tomentosin, carabrone, and pulichalconite C) were isolated from the plant, and their structures were elucidated using NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY, HMQC, HMBC) techniques.

Antioxidant capacities were evaluated using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging, CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assays. The IVM extract showed the highest antioxidant activity in DPPH and CUPRAC assays, while the IV-dek (decoction) and IV-inf (infusion) samples showed the highest activity in the FRAP assay. Overall, antioxidant potential correlated positively with total phenolic content. Antimicrobial assays proved that the extracts were effective against gram-positive bacteria and fungi, while gram-negative bacteria showed resistance. Extracts with medium to high polarity exhibited superior inhibitory activity. In conclusion, *I. viscosa* extracts possess significant antioxidant and species-specific antimicrobial potential due to their rich phenolic content.

KEYWORDS: Antimicrobial activity, antioxidant activity, flavonoids, *Inula viscosa*, LC-MS/MS

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Inula viscosa</i> (L.) Aiton Bitkisi Hakkında Genel Bilgi	3
1.2 Asteraceae Familyasının Özellikleri	6
1.3 <i>Inula</i> Türlerinde İkincil Metabolitler (Sekonder Metabolitler)	7
1.3.1 Uçucu Yağlar	8
1.3.2 Uçucu Yağların Eldesi	9
1.3.2.1 Mekanik Yöntem (Presleme).....	9
1.3.2.2 Destilasyon Yöntemi	10
1.3.2.2.1 Su Destilasyonu (Hidrodestilasyon)	10
1.3.2.2.2 Buhar Destilasyonu	10
1.3.2.2.3 Su-buhar Destilasyonu.....	11
1.3.2.2.4 Kuru Destilasyon	11
1.3.2.2.5 Vakum Destilasyonu	11
1.3.2.2.6 Hidrodifüzyon.....	12
1.3.2.3 Ekstraksiyon Yöntemi	12
1.3.2.3.1 Çözücü Ekstraksiyonu (Solvent Extraction).....	13
1.3.2.3.2 Enfloraj	14
1.3.2.3.3 Maserasyon.....	14
1.3.2.3.4 Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Supercritical fluid extraction-SFE).....	15
1.3.2.3.5 Mikrodalga destekli ekstraksiyon (Microwave-assisted Extraction-MAE)	15
1.3.2.3.6 Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu (Pressurised Solvent- Extraction-PSE).....	16
1.3.2.3.7 Katı faz mikroekstraksiyon (Solid Phase Microextraction-SPME).....	17
1.4 Terpenler	18
1.4.1 Monoterpenler	19
1.4.1.1 Asiklik monoterpenler	20
1.4.1.2 Monosiklik monoterpenler	21
1.4.1.3 Bisiklik monoterpenler	22
1.4.2 Seskiterpenler	23
1.4.3 Diterpenler.....	25
1.4.4 Triterpenler.....	26
1.4.5 Tetraterpenler	27
1.4.6 Politerpenler	27
1.5 Fenolik Bileşikler.....	28
1.5.1 Flavonoidler	29
1.5.1.1 Flavonoller.....	31
1.5.1.2 Flavonlar.....	32
1.5.1.3 İzoflavonlar	33
1.5.1.4 Flavanonlar	34

İÇİNDEKİLER (devam)

1.5.1.5 Flavan-3-ol	36
1.5.1.5.1 Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)	37
1.5.1.6 Antosiyanidinler	38
1.5.1.7 Şalkonlar.....	39
1.6 Biyolojik Aktivite Çalışmaları Hakkında Genel Bilgiler.....	40
1.6.1 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	40
1.6.1.1 Antioksidanların Sınıflandırılması	42
1.6.1.1.1 Doğal Antioksidanlar.....	42
1.6.1.1.2 Sentetik Antioksidanlar	42
1.6.2 Kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemleri	44
1.6.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi	44
1.6.2.2 Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini.....	45
1.6.2.3 Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini	45
1.7 Antimikrobiyal Aktivite.....	46
1.8 Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi.....	47
1.9 Toplam Antosiyanın Miktarı (TAC).....	48
2. DENEYSEL BÖLÜM.....	50
2.1 Materyal	50
2.1.1 Bitki Materyali	50
2.1.2 Kimyasal Materyal	50
2.2 Yöntem.....	51
2.2.1 Uçucu Yağ Eldesi.....	51
2.2.2 Ekstraksiyon.....	52
2.2.3 Kromatografik Ayırma Teknikleri	54
2.2.3.1 Kolon Kromatografisi.....	54
2.2.3.2 İnce Tabaka Kromatografisi	55
2.2.3.2.1 Serik Sülfat Çözeltilisinin Hazırlanması	56
2.2.3.3 Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	56
2.3 Spektroskopik Yöntemler	57
2.3.1 GS-MS Analizi.....	57
2.3.2 Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)	58
2.3.2.1 Bitki Ekstrelerin LC-MS/MS Analizine Hazırlanması	58
2.3.2.2 İnfüzyon ve Dekoksiyon Örneklerinin LC-MS/MS Analizine Hazırlanması	64
2.3.3 NMR (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, COSY).....	68
2.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı (TPC).....	68
2.5 Toplam Antosiyanın Miktarı (TAC).....	69
2.6 Antioksidan Aktivite Analizi	70
2.6.1 DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderim Kapasitesi Yöntemi	70
2.6.2 CUPRAC Yöntemi.....	71
2.6.3 FRAP Tayini	72
2.7 Antimikrobiyal Aktivite Yöntemi.....	72
3. BULGULAR.....	74
3.1 Uçucu Yağ Analiz Sonuçları	74
3.2 Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi Sonuçları	78
3.2.1 Bitki Ekstrelerinin LC-MS/MS Analizi Sonuçları.....	78
3.2.2 Bitki Çayının LC-MS/MS Analizi Sonuçları.....	88
3.3 <i>Inula viscosa</i> Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler	90

İÇİNDEKİLER (devam)

3.3.1 İnüviskolit [(3aS,5aS,8R,8aR,9aR)-8-hydroxy-8-methyl-1,5-dimethylidene-3a,4,5a,6,7,8a,9,9a-octahydroazuleno[6,5-b]furan-2-one]	91
3.3.2 Tomentosin (3,3aalpha,4,7,8,8aalpha-Hexahydro-3-methylene-6-(3-oxobutyl)-7beta-methyl-2H-cyclohepta[b]furan-2-one)	102
3.3.3 Karabron [(3aR,4aS,5S,5aR,6aR)-5a-methyl-3-methylidene-5-(3-oxobutyl)-3a,4,4a,5,6,6a-hexahydrocyclopropa[f][1]benzofuran-2-one]	111
3.3.4 Pulişalkonoit C [(2S,3R)-1-(2-Methoxy-4,6-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-1-propanone]	120
3.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı (TPC) Sonuçları	138
3.5 Toplam Antosiyanin Miktarı (TAC) Sonuçları	140
3.6 Antioksidan Aktivite Sonuçları	141
3.6.1 DPPH Yöntemi Sonuçları	141
3.6.2 CUPRAC Yöntemi Sonuçları	142
3.6.3 FRAP Yöntemi Sonuçları	144
3.7 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	146
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	148
4.1 GS-MS Analiz Sonuçları	148
4.2 Fenolik Bileşen Analiz Sonuçları	149
4.3 <i>Inula viscosa</i> Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler	152
4.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları	152
4.5 Toplam Antosiyanin Miktarı Sonuçları	153
4.6 Antioksidan Aktivite Sonuçları	154
4.6.1 DPPH Yöntemi Sonuçları	154
4.6.2 CUPRAC Yöntemi Sonuçları	155
4.6.3 FRAP Yöntemi sonuçları	156
4.6.4 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	156
5. KAYNAKLAR	158
ÖZGEÇMİŞ.....	169

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: <i>Inula viscosa</i> 'nın doğal yayılım gösterdiği tipik habitat örnekleri	4
Şekil 1.2: <i>Inula viscosa</i> (L.)	5
Şekil 1.3: İzopiren molekülü	18
Şekil 1.4: 2,6-dimetiloktan	20
Şekil 1.5: Bazı asiklik monoterpenler	21
Şekil 1.6: p-mentan yapısı	21
Şekil 1.7: Bazı monosiklik monoterpenler	22
Şekil 1.8: Bazı bisiklik monoterpenler	23
Şekil 1.9: Seskiterpen laktonlarının temel iskelet yapıları	24
Şekil 1.10: Bazı Seskiterpenler ve seskiterpen laktonlarına ait kimyasal yapılar	24
Şekil 1.11: Bazı diterpen iskeletleri	26
Şekil 1.12: Squalene'nin yapısı	26
Şekil 1.13: Bazı tetraterpenlere ait kimyasal yapılar	27
Şekil 1.14: Doğal Kauçuk (cis-1,4-poliizopren)	28
Şekil 1.15: Başlıca flavonoidlerin genel yapıları	31
Şekil 1.16: Flavonoller ailesine ait moleküller ve bunların kimyasal yapıları	32
Şekil 1.17: Flavon apigenin ve luteolin bileşiklerinin kimyasal yapısı	33
Şekil 1.18: Bazı izoflavon bileşiklerinin kimyasal yapısı	34
Şekil 1.19: Bazı flavanon bileşiklerinin kimyasal yapısı	35
Şekil 1.20: Kateşin ve türevlerinin kimyasal yapısı	36
Şekil 1.21: Dimerik proantosiyanidinlerin kimyasal yapıları	37
Şekil 1.22: Başlıca antosiyanidinlerin yapıları	39
Şekil 1.23: Şalkonların sistematik numaralandırılması	40
Şekil 1.24: Bazı doğal antioksidanların kimyasal yapısı	42
Şekil 1.25: Bazı sentetik antioksidanların kimyasal yapısı	43
Şekil 1.26: DPPH radikalının kimyasal yapısı ve bir antioksidan ile reaksiyonu	44
Şekil 1.27: Farklı pH seviyelerinde baskın olan antosiyanın yapısal formları	49
Şekil 2.1: Uçucu yağ elde etme düzeneği	51
Şekil 2.2: Hekzan,aseton ve metanol ekstraktlarının hazırlanma şeması	53
Şekil 2.3: Direkt petrol eteri,aseton ve metanol ekstraktlarının hazırlanma şeması	54
Şekil 2.4: Gerçekleştirilen fraksiyon takiplerine dair örnek TLC kromatogramları	56
Şekil 2.5: Elde edilen bazı fraksiyonlara ait örnek TLC kromatogramı	57
Şekil 3.1: <i>Inula viscosa</i> uçucu yağının GS-MS kromatogramı	77
Şekil 3.2: IVH ekstresine ait kromatogramlar	82
Şekil 3.3: IVA ekstrelerine ait kromatogramlar	83
Şekil 3.4: IVM ekstrelerine ait kromatogramlar	84
Şekil 3.5: DIVPE ekstrelerine ait kromatogramlar	85
Şekil 3.6: DIVA ekstrelerine ait kromatogramlar	86
Şekil 3.7: DIVM ekstrelerine ait kromatogramlar	87
Şekil 3.8: IV-dek ve IV-inf ekstresine ait kromatogramlar	89
Şekil 3.9: İnüviskolit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 1	94
Şekil 3.10: İnüviskolit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 2	95
Şekil 3.11: İnüviskolit bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 1	96
Şekil 3.12: İnüviskolit bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 2	97
Şekil 3.13: İnüviskolit bileşiğinin HSQC spektrumu 1	98

ŞEKİL LİSTESİ (devam)

Şekil 3.14: İnüviskolit bileşiğinin HSQC spektrumu 2.....	99
Şekil 3.15: İnüviskolit bileşiğinin HSQC spektrumu 3.....	100
Şekil 3.16: İnüviskolit bileşiğinin ekstraksiyon ve izolasyon basamakları.....	101
Şekil 3.17: Tomentosin bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 1	105
Şekil 3.18: Tomentosin bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 2	106
Şekil 3.19: Tomentosin bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 1.....	107
Şekil 3.20: Tomentosin bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 2.....	108
Şekil 3.21: Tomentosin bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 3.....	109
Şekil 3.22: Tomentosin bileşiğinin ekstraksiyon ve izolasyon basamakları	110
Şekil 3.23: Karabron bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 1	114
Şekil 3.24: Karabron bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 2	115
Şekil 3.25: Karabron bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 1	116
Şekil 3.26: Karabron bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 2	117
Şekil 3.27: Karabron bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 3	118
Şekil 3.28: Karabron bileşiğinin ekstraksiyon ve izolasyon basamakları.....	119
Şekil 3.29: Pulişalkonoit C bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 1.....	123
Şekil 3.30: Pulişalkonoit C bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu 2.....	124
Şekil 3.31: Pulişalkonoit C bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 1.....	125
Şekil 3.32: Pulişalkonoit C bileşiğinin ¹³ C-APT NMR spektrumu 2.....	126
Şekil 3.33: Pulişalkonoit C bileşiğinin COSY spektrumu 1	127
Şekil 3.34: Pulişalkonoit C bileşiğinin COSY spektrumu 2	128
Şekil 3.35: Pulişalkonoit C bileşiğinin COSY spektrumu 3	129
Şekil 3.36: Pulişalkonoit C bileşiğinin HSQC spektrumu 1	130
Şekil 3.37: Pulişalkonoit C bileşiğinin HSQC spektrumu 2	131
Şekil 3.38: Pulişalkonoit C bileşiğinin HSQC spektrumu 3	132
Şekil 3.39: Pulişalkonoit C bileşiğinin HMBC spektrumu 1	133
Şekil 3.40: Pulişalkonoit C bileşiğinin HMBC spektrumu 2	134
Şekil 3.41: Pulişalkonoit C bileşiğinin HMBC spektrumu 3	135
Şekil 3.42: Pulişalkonoit C bileşiğinin HMBC spektrumu 4.....	136
Şekil 3.43: Pulişalkonoit C bileşiğinin ekstraksiyon ve izolasyon basamakları	137
Şekil 3.44: (a) reaksiyon başlangıcı, (b) inkübasyon sonrası.....	138
Şekil 3.45: Toplam fenolik madde analizi için gallik asit kalibrasyon grafiği.....	136
Şekil 3.46: <i>I. viscosa</i> ekstrelerinin ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikal inhibasyon (%) değişimleri	142
Şekil 3.47: <i>I. viscosa</i> ekstrelerinin ve standart antioksidanların troloks eşdeğeri cinsinden Bakır (II) indirgeme kapasitelerinin (CUPRAC) karşılaştırılması.	143
Şekil 3.48: <i>I. viscosa</i> çay örneklerinin (infüzyon ve dekoksasyon), hidrosolün ve standart antioksidanların CUPRAC yöntemi ile belirlenen indirgeme kapasitelerinin karşılaştırılması.....	144
Şekil 3.49: FRAP analizi miktar tayininde esas alınan troloks kalibrasyon eğrisi	145
Şekil 3.50: <i>I. viscosa</i> ekstrelerinin inhibisyon zon çapları.....	147
Şekil 4.1: Belirlenen bileşiklerin kimyasal yapısı.....	149
Şekil 4.2: Ramnositrin (a) ve nepetin-7-glikozit'in (b) kimyasal yapısı.....	150
Şekil 4.3: <i>I. viscosa</i> bitkisinden izole edilen bileşikler	152

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Terpen Sınıfları: İzopren ve Karbon Sayısı Karşılaştırması.....	19
Tablo 2.1: LC-MS/MS metot parametreleri	59
Tablo 2.2: LC-MS/MS validasyon verileri	61
Tablo 2.3: LC-MS/MS metot parametreleri	65
Tablo 2.4: LC-MS/MS validasyon verileri	66
Tablo 3.1: Uçucu Yağ Ekstraktının Kimyasal Bileşenleri.....	74
Tablo 3.2: Bitki ekstrelerinde (IVH, IVA, IVM) tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg)	78
Tablo 3.3: Bitki ekstrelerinde (DIVPE, DIVA, DIVM) tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg)	80
Tablo 3.4: Sulu ekstrelerde tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg).....	88
Tablo 3.5: İnviskolit bileşiğinin 1H-NMR ve 13C-APT NMR verileri	93
Tablo 3.6: Tomentosin bileşiğinin 1H-NMR ve 13C-APT NMR verileri	104
Tablo 3.7: Karabron bileşiğinin 1H-NMR ve 13C-APT NMR verileri.....	113
Tablo 3.8: Pulişalkonoit C bileşiğinin 1H-NMR ve 13C-APT NMR verileri	122
Tablo 3.9: Gallik asit standart çözeltilerinin derişim ve absorbans değerleri.....	139
Tablo 3.10: <i>I.viscosa</i> ekstrelerinin toplam fenolik madde içerikleri	140
Tablo 3.11: <i>I.viscosa</i> ekstrelerinin pH diferansiyel yöntemi ile ölçülen spektrofotometrik absorbans değerlerinin ortalamaları.....	140
Tablo 3.12: <i>I. viscosa</i> (L.) Aiton ekstrelerinin toplam antosiyanin içerikleri.....	141
Tablo 3.13: Farklı konsantrasyonlardaki <i>I.viscosa</i> ekstrelerinin ve standart antioksidanların DPPH serbest giderim aktiviteleri	141
Tablo 3.14: <i>I. viscosa</i> ekstreleri ve standartların troloks eşdeğeri cinsinden bakır (II) indirgeme kapasiteleri.....	143
Tablo 3.15: <i>I. viscosa</i> çay örneklerinin, hidrosolün ve standartların troloks eşdeğeri cinsinden bakır (II) indirgeme kapasiteleri.....	144
Tablo 3.16: <i>Inula viscosa</i> ekstreleri, çay örnekleri ve hidrosolünün troloks eşdeğeri cinsinden demir indirgeyici antioksidan gücü (FRAP)	145
Tablo 3.17: Elde edilen ekstrele ait antimikrobiyal aktivite sonuçları	146

SEMBOL LİSTESİ

Cm	:	Santimetre
°C	:	Santigrat derecesi
psi	:	İnçkareye etki eden pound
n	:	Tekrarlama Birimi Sayısı
α	:	Alfa
β	:	Beta
p	:	para
γ	:	Gama
UV	:	Ultraviyole (Mor ötesi)
kg	:	kilogram
mm	:	Milimetre
pH	:	Çözeltinin asitlik/bazlık derecesi
g	:	Gram
mesh	:	Parçacık büyüklüğü (elek açıklığı)
mL	:	Mililitre
nm	:	Nanometre
R_f	:	Alıkonma faktörü
mg	:	Milligram
μm	:	Mikro metre
ppm	:	Pert per million
μL	:	Mikro litre
dk	:	Dakika
RT	:	Alıkonma zamanı
m/z	:	Kütle/elektron
V	:	Volt
mg/L	:	Milligram/litre
mg/kg	:	Milligram/kilogram
MHz	:	Mega Hertz
g/mol	:	Gram/mol
μg/mL	:	Mikrogram/mililitre
M	:	molar
mmol TR g⁻¹	:	milimol troloks eşdeğeri
δ	:	Kimyasal kayma
J	:	Eşleşme sabiti

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında engin bilgi birikimi, tecrübesi ve hoşgörüsüyle bana yol gösteren; yoğun çalışma temposuna rağmen bana her zaman vakit ayırıp sabırla rehberlik eden değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Turgut Kılıç'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince laboratuvar imkanlarından sonuna kadar faydalanmamı sağlayan, analizlerin gerçekleştirilmesindeki teknik desteğini, engin bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN'e şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmalarımın her aşamasında, laboratuvarın teknik ve teorik karmaşasında yanımda olan; bilgi, tecrübe ve farklı bakış açılarını benimle cömertçe paylaşan; her başım sıkıştığında sorduğum sorulara bıkmadan, yılmadan ve büyük bir sabırla cevap vererek desteğini her daim hissettiren; sadece bir hoca değil, aynı zamanda yakın dostu olduğum için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocam ve dostum Sayın Doç. Dr. Sema Çarıkçı'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Gebze Teknik Üniversitesi'ndeki laboratuvar çalışmalarım sırasında evlerini bana açan sevgili kardeşim ve eşine misafirperverlikleri için çok teşekkür ederim. Günün tüm yorgunluğunu ve moral bozukluğunu bol kahkahalı sohbetlerimizle unutturup neşe kattıkları için minnettarım.

Bu süreçte yakın ilgilerini ve dualarını eksik etmeyen, her fırsatta arayıp soran, karşılaştığım tüm güçlükleri sabırla dinleyip benimle birlikte çözüm arayarak moral veren eşimin değerli ailesine de gösterdikleri bu yürekten destek için içtenlikle teşekkür ederim.

Hayatımın sadece doktora döneminde değil, her aşamasında verdikleri sarsılmaz güvenle daima arkamda duran kıymetli annem ve babama; gösterdikleri özveri için yürekten minnettarım. Tüm bu dönem boyunca her sıkıntıda beni sabırla dinleyip her ihtiyacımda yanıma koşturarak sundukları eşsiz destek ve karşılıksız sevgi olmasaydı bu süreci tamamlamam çok daha güç olurdu; varlıkları ve duaları üzerimden hiçbir zaman eksilmesin.

Bu hayattaki en büyük şansım olan sevgili eşime; bu zorlu çalışma boyunca karamsarlığa kapıldığım, canımın sıkıldığı ve pes etme noktasına geldiğim her an içimdeki gücü yeniden ortaya çıkardığı, moralimin bozuk olduğu günlerde sergilediği sonsuz sabır ve anlayışın yanı sıra her işe koşturarak eşsiz fedakârlıklarla yükümü hafiflettiği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her döneminde varlığını, maddi ve manevi desteğini yanımda hissetmek benim için en büyük güç kaynağı olmuştur.

Son olarak; tüm pes etme noktalarına, yorgunluklara ve belirsizliklere rağmen direnen, kendine inanmaktan vazgeçmeyip bu uzun yolu sabırla tamamlayan kendime de teşekkür borçluyum.

Balıkesir, 2026

Çiğdem Berber

1. GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler; kozmetik, baharat, gıda ve ilaç endüstrileri başta olmak üzere pek çok alanda yaygın kullanım potansiyeline sahiptir. Bitkilerin en dikkat çekici ve araştırmalara en fazla konu olan yönü, tedavi amaçlı kullanım potansiyelleridir. Fitoterapi, özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere, dünyanın birçok bölgesinde yaygın olarak uygulanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, gelişmemiş ülkelerde nüfusun yaklaşık %80'i tedavi sürecinde geleneksel ilaçlara başvururken, bu oran gelişmiş ülkelerde %40 civarındadır. Ayrıca, gelecekte tıbbi bitkilerin kullanım oranının küresel ölçekte artış göstereceği öngörülmektedir. DSÖ verilerine göre günümüzde kullanılan farmasötik ilaçların yaklaşık %25'i tıbbi bitkilerden elde edilmektedir (Acıbuca ve Budak, 2018). Bununla birlikte, DSÖ'nün öngörülerine göre bitkisel ilaç endüstrisinin küresel pazar değerinin 2050 yılına kadar 62 milyar dolardan 5 trilyon dolara ulaşması beklenmektedir. Bu durum, doğal tedavi yöntemlerine yönelik talebin hızla arttığını açıkça ortaya koymaktadır (Şimşek, 2025).

Son çalışmaların ışığında fitokimyasal içerikleri ve biyolojik özellikleri nedeniyle tıbbi ve aromatik bitkiler, olası terapötik ajanlar olarak bilimsel araştırmaların ilgi odağı olmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalar, aromatik ve tıbbi bitkilerin antioksidan, antiinflamatuvar, antifungal, antibakteriyel, antidiyabetik ve hipolipidemik etkilere sahip çeşitli bileşenler barındırdığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, söz konusu bitkilerin karakterizasyonu ve içeriklerindeki biyoaktif bileşiklerin belirlenmesi, biyolojik aktivitelerinin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, bu bileşiklerin bir kısmı sağlık üzerindeki faydalı etkilerinin yanı sıra doğal renklendirici ve antioksidan özellikleri sebebiyle gıda katkı maddesi olarak da kullanılabilmekte ve bu durum, araştırmacıların dikkatini artırmaktadır (Kheyyar-Kraouche et al., 2018).

Günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerde, toplum bilincinin insan ve çevre sağlığına yönelmesiyle birlikte doğal ürünlerin kullanımına ilgi artmış ve güvenilir gıda üretimi önemli bir konu haline gelmiştir (Selamoğlu ve Arıcı, 2025).

Güney Avrupa ve Güneybatı Asya floraları arasında bir geçiş bölgesi olan Türkiye, terapötik amaçlarla kullanılan endemik türler açısından oldukça zengin bir floraya sahiptir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Asterce familyasına ait *Inula* cinsinin dünya genelinde

yaklaşık 100 türü bulunduğu, Türkiye’de ise yedisi endemik olmak üzere toplam 27 türün yetiştği bilinmektedir. Bu cins dünya genelinde geniş bir yayılışa sahip olmasının yanı sıra, Türkiye’de de birçok türünün geleneksel halk hekimliğinde kullanıldığı bilinmektedir. Halk arasında Andızotu kökü olarak adlandırılan *Inula helenium L.* türünün kurutulmuş kökleri; safra artırıcı, idrar söktürücü, öksürük kesici, balgam yumuşatıcı, tonik (kuvvet verici) ve antiparaziter (kurt düşürücü) etkileriyle öne çıkmaktadır. Kaya andızı olarak bilinen *Inula heterolepis Boiss.* türünün yapraklı dallarının infüzyon halinde iştah açıcı ve hemoroid tedavisinde; toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksasyonun ise soğuk algınlığı, bronşit ve mide rahatsızlıklarının tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca taze yapraklarının yara üzerine uygulanarak yara iyileştirici amaçla değerlendirildiği bilinmektedir (Gökbulut, 2011).

Son yıllarda *Inula* türleri özellikle biyolojik aktiviteleri nedeniyle bilim dünyasında dikkat çekmiş; yapılan fitokimyasal analizlerde bu türlerin yapısında pek çok önemli biyoaktif bileşiğin yer aldığı ortaya konmuştur (Erdal vd., 2022). *Inula* türlerinin kimyasal bileşimleri incelendiğinde; terpenik bileşikler (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler), flavonoidler, glikolipitler ve antranilik asit türevi bileşiklerin yer aldığı görülmektedir. Özellikle seskiterpen yapısındaki ödesmanlar, makrofilik asitler, elemanlar, germakranlar ve guayanlar, bu cins içerisinde en dikkat çekici ve baskın bileşik grubu olarak öne çıkmaktadır (Gökbulut, 2011).

Tüm bu veriler, *Inula* türlerinin yalnızca etnobotanik açıdan değil, aynı zamanda farmakolojik ve endüstriyel potansiyelleri bakımından da dikkat çekici bir konumda olduğunu göstermektedir. Bu türlerin içerdiği zengin biyoaktif bileşiklerin tanımlanması ve biyolojik aktivitelerinin aydınlatılması hem yeni terapötik ajanların geliştirilmesine hem de gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerine yönelik doğal kaynakların çeşitlendirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Dolayısıyla, *Inula* cinsine ait türlerin kapsamlı bir şekilde incelenmesi hem halk sağlığının desteklenmesi hem de sürdürülebilir biyoteknolojik uygulamalara temel oluşturması açısından bilimsel bir gereklilik arz etmektedir.

Bu çalışma ile son yıllarda içerdiği zengin biyoaktif bileşikler nedeniyle önemli bir doğal kaynak olarak dikkat çeken *Inula viscosa* türünün fitokimyasal bileşimlerinin ve biyolojik potansiyellerinin ortaya konulması amaçlanmakta olup, elde edilecek verilerin hem bilimsel literatüre katkı sağlaması hem de yeni terapötik ajanların geliştirilmesine yönelik

alışmalara ışık tutması beklenmektedir. Ayrıca, bu türlerin değeriendirilmesi; doğal, güvenilir ve sürdürülebilir kaynakların kullanımı açısından da önemli bir adım niteliğı taşımaktadır.

1.1 *Inula Viscosa* (L.) Aiton Bitkisi Hakkında Genel Bilgi

Inula viscosa (L.) Aiton [*Dittrichia viscosa* (L.)], Asteraceae familyasına ait olup Akdeniz bölgesinde yayılış gösteren, zorlu çevresel koşullara yüksek adaptasyon yeteneğıyle bilinen çok yıllık otsu bir bitkidir (Amrouche vd.,2020). Bitkinin doğal yayılım alanı; Türkiye ve Orta Doğı (İsrail, Ürdün ve Suriye) başta olmak üzere, Güney Avrupa kıyılarını (Fransa, İspanya, Yunanistan, İtalya, Bulgaristan) ve Kuzey Afrika'yı (Cezayir, Mısır, Libya) kapsamaktadır (Parolin et al., 2014).

İnsan faaliyetleri nedeniyle doğal yapısı bozulmuş ancak sonrasında kendi haline bırakılmış ruderal ortamlarda yetişen *Inula viscosa*, bu alanların en yaygın türlerinden biridir. Bu bitki türü, olumsuz koşullara karşı son derece dirençli olduğundan ve bozulmuş ortamlarda yetiştiğinden, istilacı bir yabancı ot olma özelliğı taşıyan karakterlere de sahiptir (Parolin et al., 2014).

I. viscosa'nın tipik habitatları; kurumuş nehir yatakları, terk edilmiş tarım arazileri, yol kenarları, yürüyüş yolları, karayolu şevleri ve dolgu alanları gibi antropojenik alanlardır. Işık isteğı oldukça yüksek olan bu tür; toprağın sık olduğu taşlı ve kayalık zeminlerden eğimli yamaçlara, killi ve kumlu topraklardan kentsel alanlara kadar çok geniş bir yayılım gösterir (Şekil 1.1). Bitki, bu kurak habitatların yanı sıra doğal bataklıklar ve diğer sulak alanlarda da gelişim gösterebilecek yüksek bir adaptasyon yeteneğine sahiptir (Parolin et al., 2014).



Şekil 1.1: *Inula viscosa*'nın doğal yayılım gösterdiği tipik habitat örnekleri

Bitkinin gövde kısmı odunsu yapıda olup, gövdesinin üst kısımlarında çok sayıda sarı renkli çiçek başı taşır (Amrouche et al.,2020). Küçük bitkilerde bile kökler oldukça dayanıklı olabilir. Bitki, gövdenin alt kısımlarından itibaren dallanmaya başlayan dik gövdelere sahiptir. Dalları çok sayıdadır, yayılıcıdır ve düzensiz açılıdır. Kanopisi (bitki örtüsü) oldukça yoğundur. 150 cm yüksekliğe ulaşabilir. Tüm bitki salgı tüyleri (glandüler

tüyler) ile kaplıdır. İnce tüylü yapraklarının şekli uzundur, kenarları ise ince testere dişli veya küçük dişlidir. (Parolin et al., 2014).

I. viscosa (L.) Aiton, Türkçe’de yaygın olarak “yalancı sarıbaş”, “yapışkan inula”, “aromatik inula” veya “yapışkan andız (anduz) otu” olarak adlandırılmaktadır. Güçlü bir kokuya sahip bir türdür (Ozkan vd., 2019). Yaprakları yapışkandır ve "viscosa" ismi de buradan gelmektedir (Parolin et al., 2014). Sert kafurumsu bir kokuya sahip olması, bitkinin doğal ortamda kolaylıkla tanınmasını sağlamaktadır (Aboujanah, 2019).



Şekil 1.2: *Inula viscosa* (L.)

Türkiye florasındaki *Inula* cinsinin taksonomik açıdan kapsamlı revizyonu 1975 yılında Grierson tarafından gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada cins bünyesinde 26 tür ve toplamda 31 taksonun kaydı yapılmıştır. Ancak güncel floristik veriler ışığında, Türkiye'deki *Inula* cinsine ait takson sayısının 33'e ulaştığı görülmektedir (Sevindik,2014).

Binlerce yıldır çeşitli farmakolojik etkileri nedeniyle en önemli tıbbi bitkiler arasında değerlendirilmektedir (Amrouche et al.,2020). Geleneksel halk hekimliğinde *I. viscosa*,

yaraların iyileştirilmesi, cilt rahatsızlıklarının giderilmesi, romatizmal ağrıların azaltılması, solunum yolu rahatsızlıklarının tedavisi, diyabet, gastroduodenal sorunlar, hipertansiyon, kanser, bronşit, tüberküloz ve kısırlık gibi çeşitli sağlık problemlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca, bitki antelmintik, ateş düşürücü, antiseptik, iltihap önleyici, balzamik, balgam söktürücü, uyuz önleyici, idrar söktürücü, kansızlık önleyici ve kas gevşetici özellikler de göstermektedir. Kimyasal açıdan *I. viscosa*, guaianolitler, seskiterpenler, seskiterpen asitler, triterpenoitler, azulenler, laktonlar, flavonoidler, kostik asit ve uçucu yağlar gibi çeşitli biyoaktif bileşenleri içermektedir (Ozkan vd., 2019). Yaprak ve çiçeklerinde 80'den fazla uçucu yağ tanımlanmıştır. Toprak üstü kısımlardan elde edilen uçucu yağ ile köklerden izole edilen yağ arasında belirgin farklar mevcuttur (Pérez-Alonso et al., 1996). Toprak üstü kısımları serbest alkoller, asetatlar veya yağlı esterler halinde triterpenoidler içerir (Grande et al., 1992). Yaprak ekstraktları yüksek oranda oksijenli seskiterpen bileşikler ve antioksidan etkilerden sorumlu flavonoidler içerir (De Laurentis et al., 2002; Schinella et al., 2002). Çiçek ekstraktları ise özellikle yüksek miktarda monoterpen, seskiterpen hidrokarbonlar, oksijenli aromatik bileşikler ve yağ asidi esterleri içermektedir (De Laurentis et al., 2002). Bunun yanı sıra bazı araştırmalar, *I. viscosa* bitkisinin bahçe bitkilerinde kullanılan ev yapımı mantar öldürücü maddelerin üretimi açısından değerli bir kaynak olduğunu göstermiştir (Aboujanah, 2019; Mueller-Riebau et al., 1995; Yegen vd., 1992).

1.2 Asteraceae Familyasının Özellikleri

Asteraceae, Compositae veya ayçiçeği bitki ailesi olarak da bilinir, tahmini 25.000–35.000 tür sayısı ile tüm çiçekli bitkilerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Orkideler (Orchidaceae) ve baklagiller (Fabaceae) ile birlikte Asteraceae, 16 alt familya ve 50 kabile ile tür açısından en zengin aileyi temsil eder. Dünyanın her yerine, Arktik'ten tropiklere kadar farklı yaşam alanlarına, çok çeşitli yüksekliklere yayılır ve büyük ağaçlardan çalılara ve otlara ve hatta suda yaşayan türlere kadar uzanan gelişimsel özellikler, sekonder metabolitler, yaşam öyküleri ve büyüme biçimleri açısından muazzam çeşitlilik gösterir. (Zhang and Elomaa, 2024). Sahip olduğu 1209 tür ile Türkiye florasında baskın bir konumda yer alan bu familya, tür zenginliği açısından ilk sırada yer alır (Sevindik 2014). Bu türlerin 447'si endemiktir ve %37'lik endemizm oranıyla en fazla endemik türe sahip bitki familyası olduğu bilinmektedir (Albayrak, 2022).

Asteraceae familyası genellikle otsu bitkilerden oluşmakla birlikte, bir yıllık veya iki yıllık monokarpik türler ile çok yıllık polikarpik çalılar ve nadiren ağaçları da kapsamaktadır. Yapraklar alternat veya karşılıklı diziliş gösterir ve bazen dairesel şekiller de içerir. Nadiren stipüller bulunur; yaprak ayası ise bazen basit ve parçalanmamış olup, çoğunlukla loblu veya dişli şekilde parçalanmıştır. Stomalar anizositik veya anomositik tiptedir. Asteraceae üyelerinin çiçek dizilişi familyaya özgü karakteristik bir özelliktir. Genişlemiş reseptakulum üzerinde çok sayıda çiçek bulunur ve bu çiçek durumu kapitulum olarak adlandırılır. Her kapitulumda 1–500 adet veya daha fazla, sapsız ya da kısmen sapsız çiçekler yer alır. Çiçekler radyal veya zygomorfik (tek simetrlili) olabilir ve kapitulumlarda genellikle iki tip çiçek bulunur (Albayrak, 2022).

1.3 *Inula* Türlerinde İkincil Metabolitler (Sekonder Metabolitler)

İkincil metabolitler, bitkilerde bulunan doğal bileşiklerdir. Bu moleküller, bitkilerin çevreye adaptasyonu, korunması, taşınması ve üremesi gibi kritik faaliyetlerden sorumludur. Günümüzde birçok sektörde hammadde olarak kullanılan sekonder metabolitler, bitkinin temel yaşamsal işlevleriyle doğrudan ilişkisi olmamasına karşılık farmakolojik potansiyelleri açısından büyük önem taşımaktadır (Yılmaz, 2012). İkincil metabolitler, boyalar, lifler, yapıştırıcılar, yağlar, mumlar, tatlandırıcı maddeler, ilaçlar ve parfümler olarak kullanımları nedeniyle de ilgi çekicidir ve yeni doğal ilaçlar, antibiyotikler, böcek öldürücüler ve herbisitler için potansiyel kaynaklar olarak görülmektedir. Son yıllarda, bazı sekonder metabolitlerin koruyucu diyet bileşenleri olarak rolü, insan beslenmesi araştırmalarında giderek daha önemli bir alan haline gelmiştir (Crozier et al., 2006). İkincil metabolitlerin karmaşık biyolojik işlevleri ve özellikle insan sağlığına olan faydalarının giderek daha fazla anlaşılması, bu bileşiklerin elde edilme metotlarını geliştirme ve etki mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik araştırmaların son yıllarda yoğunlaşmasına neden olmuştur (Yılmaz, 2012).

Inula türlerinin, yapılan kimyasal araştırmalar sonucunda zengin bir metabolit çeşitliliği içerdiği tespit edilmiştir. Bu cinse ait önemli biyoaktif bileşenler şunlardır: uçucu yağlar, terpenik bileşikler (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler), fenolik bileşikler (flavonoid ve fenolik asitler), glukolipitler, glikozidazlar, antranilik asit türevi bileşikler mevcuttur (Gökbulut, 2011; Sevindik vd.,2020).

1.3.1 Uçucu Yağlar

"Esansiyel yağ" veya "eterik yağ" olarak da bilinen uçucu yağlar, bitkilerin farklı bölümlerinden (yaprak, kök, kabuk, meyve) elde edilen, kendine has güçlü kokularıyla karakterize edilen uçucu doğal bileşenlerdir. Bu güçlü aromatik ürünler, oda sıcaklığında genellikle sıvı formda bulunur, ancak bazen kristalleşme eğilimi gösterir ve tipik olarak renksiz veya soluk sarı bir görünüme sahiptir (Cellat, 2011).

Suyla karışmadıkları için yağ kategorisinde sayılırlar da kimyasal yapıları sabit yağlardan tamamen farklıdır. Sabit yağların aksine, uçucu yağlar su buharı ile sürüklenabilir ve süzgeç kağıdına uygulandığında kalıcı yağ lekesi bırakmazlar. Buna karşılık, sabit yağlar buharla sürüklenemez ve kalıcı yağlı bir leke oluşturur. Çözünürlük açısından uçucu yağlar; petrol eteri, etanol, benzen, eter gibi çoğu organik çözücülerde kolayca çözünürken, sabit yağlar sulu alkollerde çözünmez. Her ne kadar uçucu yağlar su ile karışmasalar da taşıdıkları aromatik bileşenlerin suya nüfuz etmesi mümkündür; bu kısmi çözünürlük, kokularının kullanıldığı aromatik suların temelini oluşturur (Madencioğlu, 2023).

Uçucu yağlar; antimikrobiyal (mikroorganizmalara karşı), antioksidan (serbest radikallerin olumsuz etkilerini giderici), analjezik (ağrı dindiren), antiseptik (mikropların üremesini önleyen), antifungal (mantara karşı), antiviral (virüsün etkisini önleyen), stimulan (uyarıcı) veya sedatif (sakinleştirici) gibi geniş bir biyolojik etki alanına sahiptir. İçerdikleri aktif bileşikler sayesinde sergiledikleri bu çok yönlü özellikler, onları ilaç endüstrisi için giderek daha değerli bir kaynak haline getirmiştir (Cellat, 2011; Yılmaz, 2018). Bazı yağlar ise böcek kovucu özelliği ile dikkati çekmektedir (Cellat, 2011; Nerio et al., 2010; Lee, 2018).

Uçucu yağlar, çok sayıda kimyasal bileşiğin bir araya gelmesiyle oluşan doğal karışımlardır (Bülbül, 2016). Bu durum, kimyasal bileşimlerini oldukça karmaşık hale getirir; genellikle 20 ila 60 arasında değişen farklı türde bileşenleri barındırırlar. Bu bileşenler, iki temel sınıfa ayrılır. Bunlardan ilki ve başlıca olanı terpenler ve terpenoidlerdir, ikincisi ise aromatik ve alifatik kökenli bileşikler içerir. Daha detaylı ifade etmek gerekirse, uçucu yağların içeriğinde terpen bileşikleri dışında alkoller, asitler, esterler, epoksitler, aldehitler, ketonlar, aminler ve sülfür bileşikler bulunabilir. Uçucu yağların sahip olduğu biyolojik nitelikler, bileşimlerindeki ana bileşenlerden etkilendiği için, bu bileşenlerin kimyasal özellikleri büyük önem taşır (Devecioğlu, 2018; Bakkali vd., 2008).

1.3.2 Uçucu Yağların Eldesi

Uçucu yağların bitkilerden elde edilme yöntemi; bitkinin ısıya ne kadar dayanıklı olduğu, içerdiği uçucu yağın miktarı, yağın suda çözünürlüğü ve bileşenleri gibi faktörlere bağlı olarak belirlenir. Esansiyel yağların eldesi için kullanılan yöntemler temelde mekanik, destilasyon ve ekstraksiyon olmak üzere üç ana başlıkta incelenebilir. (Karakaplan, 2017).

1. Mekanik Yöntem
2. Destilasyon Yöntemi
 - a. Su Destilasyonu (Hidrodestilasyon)
 - b. Buhar Destilasyonu
 - c. Su-buhar Destilasyonu
 - d. Kuru Destilasyon
 - e. Vakum destilasyonu
 - f. Hidrodifüzyon
3. Ekstraksiyon Yöntemi
 - a. Çözücü Ekstraksiyonu
 - b. Enfloraj
 - c. Maserasyon
 - d. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE)
 - e. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE)
 - f. Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu
 - g. Katı faz mikroekstraksiyon (SPME)

Yapılan bu çalışmada, belirtilen yöntemlerden su destilasyonu (hidrodestilasyon) yöntemi kullanılmıştır.

1.3.2.1 Mekanik Yöntem (Presleme)

Bitkilerden esansiyel yağların destilasyon yoluyla çıkarılması, gereken yüksek ısının bu yağlardaki bazı bileşenlerin kimyasal yapısını bozabilmesi nedeniyle her zaman güvenilir bir yöntem olmaz. Uçucu yağların termal bozunmasını önlemek amacıyla, bu gibi durumlarda soğuk presleme tekniği tercih edilir. (Boyanay, 2013). Turunçgil (Citrus) kabuklarından esansiyel yağların elde edilmesinde özellikle tercih edilen bu süreçte (Madencioğlu, 2023), meyve kabukları kumaş bir torba içine yerleştirilerek soğuk hidrolik presler yardımıyla sıkılır ve böylece yağ bileşenleri ayrıştırılır (Karakaplan, 2017).

1.3.2.2 Destilasyon Yöntemi

Destilasyon yöntemi, temelde kapalı bir düzenek içinde bitki materyali içerisindeki uçucu bileşenlerin, su veya buhar kullanılarak ayrılmasına, ardından bir soğutucuda yoğunlaştırılarak toplama kabında biriktirilmesine dayanır. Bu metot, uçucu yağlarını kolaylıkla bırakan bitkilere uygulanır ve yağların su buharı ile taşınabilme (sürüklenebilme) özelliğinden faydalanır (Madencioğlu, 2023).

Destilasyon teknikleri, genel olarak su destilasyonu (hidrodestilasyon), buhar destilasyonu, su-buharı destilasyonu, kuru destilasyon, vakum destilasyonu ve hidrodifüzyon şeklinde altı ana başlık altında sınıflandırılmaktadır (Karakaplan, 2017).

1.3.2.2.1 Su Destilasyonu (Hidrodestilasyon)

Uçucu yağların eldesinde sıklıkla uygulanan geleneksel bir yöntem olan destilasyon işlemi, laboratuvar ölçekli çalışmalarda genellikle Clevenger tipi bir aparat kullanılarak gerçekleştirilir (Karakaplan, 2017).

Bu yöntem ile, kurutulmuş ve yapısında ısıya karşı hassas madde bulundurmeyen bitkisel numunelerden uçucu yağlar elde etmek mümkündür. Ayrıca bu teknik sayesinde bitkilerden sadece uçucu yağ değil, aynı zamanda aromatik su da (hidrosol) kazanılabilir (Kutlular, 2007; Yılmaz, 2018).

Bu uygulamada, su ve bitkisel örnek bir balon joje içerisine yerleştirilir; bu düzeneğin üzerine bir Clevenger aparatı ve geri soğutucu bağlanarak karışım 2 ila 8 saat arasında kaynatılır. Bu işlem sonucunda, su buharıyla sürüklenen yağ molekülleri, geri soğutucuda yoğunlaşarak sudan ayrılır ve Clevenger aparatında suyun yüzeyinde toplanır. Elde edilen uçucu yağın miktarı bitki türüne göre farklılık göstermekle birlikte, genellikle çok düşük seviyelerdedir (Boyanay, 2013).

1.3.2.2.2 Buhar Destilasyonu

Bu yöntem, özellikle taze bitki materyali için uygulanan bir tekniktir (Madencioğlu, 2023). İşlem sırasında, uygun hacimli bir cam balona konulan taze bitkisel materyale, buhar üreten ayrı bir sistemden basınçlı buhar gönderilir. Bitkinin içerisindeki uçucu yağlar, bu buhar yardımıyla sürüklenerek toplama kabına ulaşır. Yağ, burada yoğunlaştırılarak sudan ayrıştırılmış olur (Madencioğlu, 2023; Boyanay, 2013).

Çoğu organik bileşik, yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında bozunma eğilimi sergiler. Bu nedenle, damıtılacak maddelerin ısıya karşı duyarlılığı çok yüksek olduğunda, buhar destilasyonu tekniği vakum destilasyonu ile kombine edilerek kullanılabilir (Karakaplan, 2017).

1.3.2.2.3 Su-buhar Destilasyonu

Bu teknik hem kuru hem de taze bitki örneklerine uygulanabilen bir damıtma prosedürüdür (Boyanay, 2013). Özellikle yüksek sıcaklıkta bozunma potansiyeli taşıyan maddeler içeren numunelerin veya ısıya hassas bileşenlerin varlığında bu yöntem tercih edilir. Bu metodun temel prensibi, uçucu yağların su buharı aracılığıyla sürüklenerek taşınabilme özelliğinden faydalanmaktır. İşlem sırasında bitki materyali destilasyon düzeneğine yerleştirilir ve üzerine su ilave edilir; ardından, ayrı bir ünite de üretilen su buharı su içerisindeki bitkisel örneğe yönlendirilir. Son olarak, uçucu yağ içeren buhar karışımı soğutucudan geçirilerek yoğunlaşır ve yağ fazı su fazından başarıyla ayrılır (Boyanay, 2013; Karakaplan, 2017; Madencioğlu, 2023).

1.3.2.2.4 Kuru Destilasyon

Kuru destilasyon, uçucu yağ eldesinde çok yaygın bir uygulama alanı bulmayan bir yöntemdir. Bu işlem, bitkisel materyallerin susuz bir ortamda yüksek ısıya maruz bırakılarak içlerindeki uçucu bileşenlerin kısmen parçalanıp damıtılması esasına dayanır; bu sürece pirojenasyon adı verilir. Kuru destilasyon, özel olarak tasarlanmış imbiklerde gerçekleştirilir. Yöntemin uygulanması için, kullanılacak materyal öncelikle kurutulur, ardından küçük parçalar halinde kazanlara doldurulur. Yüksek sıcaklıkta susuz olarak damıtılan ürünler, soğutucudan geçirilerek yoğunlaştırılır ve toplama kabında biriktirilir (Karakaplan, 2017; Kutlular, 2007).

1.3.2.2.5 Vakum Destilasyonu

Vakum destilasyonu, bitkisel uçucu yağların özütlenmesinde kullanılan bir damıtma yöntemidir. Bu metodun temel amacı, destilasyon düzeneği içerisindeki basıncı, vakum uygulayarak düşürerek, normal atmosfer basıncında yüksek kaynama noktasına sahip olan ya da ısıya karşı hassasiyet gösteren bileşenlerin daha düşük sıcaklıklarda ve bozulmadan buharlaşmasını sağlamaktır.

Bu yöntemde, bitkisel materyal ve su, kapalı bir sisteme yerleştirilir. Sisteme uygulanan düşük basınç sayesinde, kaynama noktası önemli ölçüde düşer. Bu durum, uçucu bileşenlerin termal bozunmaya uğrama riskini azaltarak, bileşen kalitesinin korunmasına yardımcı olur. Uçucu yağ buharları bu düşük sıcaklık ve basınç altında ayrıştırılır, ardından yoğunlaştırılarak toplama kabında biriktirilir (Azzam and Obaid, 2025).

1.3.2.2.6 Hidrodifüzyon

Hidrodifüzyon, uçucu yağ eldesinde çok yaygın kullanılan bir yöntem olmayıp, temelde buhar destilasyonunun tersi prensibiyle çalışır. Bu metodun özü, difüzyon olayının ozmotik basınç ilkesiyle gerçekleşmesine dayanmaktadır. Uygulamada bitkisel materyal, kazanın içinde bulunan delikli bir tepsi üzerine yerleştirilir ve buhar, kazana alttan değil, dışarıdaki bir jeneratörden düşük basınçla üst kısımdan verilir. Buharla birlikte sürüklenen uçucu yağlar, materyal arasından geçerek aşağı doğru hareket eder ve kazanın alt bölümündeki soğutucuda yoğunlaşır. Soğutucudan çıkan yağ ve su karışımı, yoğunluk farkından faydalanılarak toplama kabında ayrılır. Hidrodifüzyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ miktarı yüksek olsa da ⁰sabit yağların veya suda çözünen bileşenlerin uçucu yağa geçme riski nedeniyle endüstriyel kullanımı sınırlı kalmıştır (Madencioğlu, 2023; Karakaplan, 2017; Cellat, 2011).

1.3.2.3 Ekstraksiyon Yöntemi

Ekstraksiyon (özütleme), organik bileşikler içeren bir madde karışımının, her bir bileşenin farklı çözücülerdeki çözünürlük farkı prensibine dayanarak ayrıştırılması işlemidir. Bu işlem sonucunda, karışımdaki bileşenler, iki ana fazda ayrılarak zenginleşir: raffinat fazı (besleme çözücüsü açısından zengin) ve ekstrakt fazı (ayrılmak istenen çözünen madde açısından zengin). Ekstraksiyon yöntemi, özellikle damıtma (destilasyon) gibi termal ayırma tekniklerinin yetersiz kaldığı veya ekonomik olmadığı durumlarda kritik bir öneme sahiptir (Patel et al.,2019).

Ekstraksiyon yönteminin seçimi, uçucu yağların kalitesini belirleyen ana faktördür. Uygunsuz ekstraksiyon prosedürleri, aromatik yağlarda doğal olarak bulunan fitokimyasalların tahrip olmasına ve biyolojik etkilerinin değişmesine neden olabilir. Bu durum, nihai üründe farmakolojik bileşenlerin kaybı, renk değişimi, istenmeyen koku/tat oluşumu ve yağların fiziksel yapısında bozulmalar gibi olumsuz sonuçlar doğurabilir (Aziz vd., 2018).

Uçucu yağ elde etme teknikleri, genel olarak iki ana kategori altında sınıflandırılmaktadır (Kaufmann and Christen, P. (2002):

1. Geleneksel Yöntemler
 - a. Çözücü ekstraksiyonu
 - b. Enfloraj
 - c. Maserasyon
2. Modern Yöntemler
 - a. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Supercritical fluid extraction-SFE)
 - b. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (Microwave-assisted Extraction-MAE)
 - c. Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu (Pressurised Solvent- Extraction)
 - d. Katı faz mikroekstraksiyon (Solid Phase Microextraction-SPME)

Uzun yıllardır kullanılan geleneksel yöntemler, uzun işlem süreleri ve fazla kirletici çözücü ihtiyacı gibi dezavantajlar sunmaktadır (Kaufmann and Christen, 2002). Ayrıca, bu tekniklerin, çeşitli uçucu bileşen kayıpları, düşük yağ ekstraksiyon verimi, doymamış bileşiklerin bozunması ve ekstraksiyon sürecinden kaynaklanan toksik kalıntılar gibi dezavantajlarıyla da başa çıkılması gerekmektedir (Aziz vd., 2018).

Modern yöntemler, geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin uzun süresi, yüksek çözücü ihtiyacı ve yüksek maliyeti gibi dezavantajlarını gidermeyi amaçlar. Bu sayede, özellikle çevre, gıda ve biyolojik örneklerdeki uçucu/yarı uçucu bileşenlerin tespiti ve analizi hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli hale gelmektedir (Boyanay, 2013; Cellat, 2011; Karakaplan, 2017, Madencioğlu, 2023).

1.3.2.3.1 Çözücü Ekstraksiyonu (Solvent Extraction)

Çözücü ekstraksiyonu, özellikle buharla veya yüksek ısıyla ekstraksiyona uygun olmayan bitki materyallerinden uçucu yağ elde etmek için uygulanan bir tekniktir. Bu yöntemde yaygın olarak aseton, hekzan, metanol veya etanol gibi standart organik çözücüler kullanılır (Tongnuanchan and Benjakul, 2014).

Çözücü ekstraksiyonunun genel prosedürü, bitki örneklerinin çözücülerle karıştırılması ve karışımın hafifçe ısıtılmasıyla başlar. Bu aşamayı filtrasyon ve çözücülerin

buharlaştırılması takip eder. Elde edilen süzöntü, bir reçine, koku ve uçucu yağ karışımını içerir. Daha sonra, uçucu yağı ayırmak amacıyla bu süzöntü karışımına alkol eklenir ve karışım düşük sıcaklıkta damıtılır. Bu süreçte alkol, koku bileşenlerini absorbe ederek buharlaşır ve aromatik saf yağ damıtma kalıntısı olarak elde edilir (Aziz vd., 2018).

Çözücü ekstraksiyonu, temel olarak iki önemli dezavantaj taşır. Birincisi, ekstraksiyon sonrasında gerçekleştirilen yoğunlaştırma aşamasında, düşük molekül ağırlıklı uçucu bileşenlerin kaybı ve istenmeyen artefaktların oluşması riskidir. İkincisi ise, ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra üründe geri kalan çözücü miktarıdır. Bu durum, çözücülerin toksik özelliklerinden dolayı hem çevresel kirlilik hem de maliyet açısından önemli sorunlara yol açar. Zira kullanılan saf ve yüksek kaliteli çözücülerin büyük miktarlarda kullanılması, sürece ciddi bir ekonomik yük getirmektedir (Cellat, 2011).

1.3.2.3.2 Enfloraj

Enfloraj yöntemi, taze çiçeklerin yaydığı koku bileşiklerinin yüzeye tutunması esasına dayanan geleneksel bir uçucu yağ ekstraksiyon tekniğidir. Bu yöntemin temel prensibi, bu bileşikler adsorbe etmek için hayvansal yağların kullanılmasını içerir. Literatürde, enfloraj yöntemiyle elde edilen yağın kokusunun, taze çiçeklerin doğal kokusuna en çok benzeyen yapıda olduğu belirtilmektedir (Pensuk et al., 2007).

Bu prosedürde, büyük ve çerçeveli bir cam plaka üzerine öncelikle bir katman hayvansal yağ sürülür. Daha sonra, çiçek yaprakları veya bütün çiçekler bu yağ tabakasının üzerine yerleştirilir. Yağ, koku bileşenleri ile tamamen doymuş hale gelinceye kadar çiçekler her gün düzenli olarak değiştirilir. Yağ doymuşluğa ulaştığında, bünyesindeki uçucu yağlar çeşitli işlemlerle yağ matrisinden ayrıştırılır (Pensuk et al., 2007). Bu yöntemin üretim maliyeti oldukça yüksektir ve zaman alan bir işlemdir (Pensuk et al., 2007; Cellat, 2011).

1.3.2.3.3 Maserasyon

Maserasyon, geleneksel ekstraksiyon yöntemleri arasında yer alan, basitliği ve düşük maliyeti ile öne çıkan bir tekniktir (Tambun vd., 2021). Bu ekstraksiyon tekniği, koparıldıktan sonra fizyolojik aktivitesi hızla sona eren çiçekli bitkilerin uçucu bileşenlerinin elde edilmesi için tercih edilir (Yılmaz, 2018).

İşlem, yaklaşık 60-70 °C sıcaklıktaki erimiş hayvansal veya bitkisel yağın kullanılması esasına dayanır. Çiçekler bu sıcak yağa daldırılarak, içeriklerindeki uçucu bileşenlerin yağ matrisine geçişi sağlanır. Ekstraksiyon süresi sonunda, yağ içerisinde kalan çiçek kalıntıları ortamdaki uzaklaştırılır. Kalıntıların üzerinde kalan yağ ise hidrolik basınç uygulanarak geri kazanılır ve ana yağ fazına eklenir. Bu işlemler dizisi kullanılan yağ, aroma maddeleriyle doymuş hale gelene kadar tekrarlanır (Boyanay, 2013). Ancak, maserasyonun dezavantajı ise uzun ekstraksiyon süreleri gerektirmesidir (Tambun et al., 2021).

1.3.2.3.4 Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Supercritical fluid extraction-SFE)

Bu ekstraksiyon türünde, bir bileşen matrinden çözücü yardımıyla ayrıştırılır; ancak burada kullanılan çözücü süperkritik akışkandır. Süperkritik akışkanlar yüksek yoğunluğa sahip ve sıkıştırılmaz türde akışkanlardır. Bu akışkanların sıcaklık ve basınç değerleri, kritik noktanın üzerindedir. Ayrıca termal hareketliliği yüksektir ve yoğunlukları geniş ölçüde değiştirilebilir (Patel et al., 2019). Süperkritik sıvı ekstraksiyonunda en çok kullanılan çözücü olan CO₂, kolay temini, düşük maliyeti, yüksek saflık derecesi ve çevreye dost yapısı ile ön plana çıkmaktadır (Karakaplan, 2017).

Genel olarak SFE sürecinin prensibi, akışkanın tekrarlanan sıkıştırma/basınç düşürme (dekompresyon) adımlarıyla kullanılması ve geri dönüştürülmesini içerir. CO₂'in süperkritik hali, akışkanın yüksek oranda sıkıştırılması ve ısıtılmasıyla elde edilir. Ardından, uçucu madde ve bitki özlerini yüklemek için ham bitki materyalinden geçirilir. Bu işlemi, basınç düşürme adımları takip eder; CO₂ ve bitki özleri karışımı, elde edilen ekstraktların CO₂'den ayrılması için kademeli olarak basıncın düşürüldüğü iki ayırıcıya yönlendirilir. CO₂ ikinci ayırıcıdan salınır ve depolama tankına geri dönüştürülür. CO₂, normal atmosfer basıncı ve sıcaklık altında kolayca gaza dönüştüğü için nihai üründe çözücü kalıntısı kalmaz (Aziz vd., 2018).

1.3.2.3.5 Mikrodalga destekli ekstraksiyon (Microwave-assisted Extraction-MAE)

Mikrodalga destekli ekstraksiyonun araştırmacılar tarafından rapor edilen temel avantajları, yüksek verim ve seçicilikle uçucu yağ elde edilmesi, önemli ölçüde daha kısa ekstraksiyon süresi ve çevre dostu bir süreç sunması şeklinde özetlenebilir (Hemwimon et al., 2007). Bu teknik, bitki numunelerinin mikrodalga teknolojisi ile ısıtılması ve ardından çözücü kullanılmaksızın atmosferik basınçta gerçekleştirilen kuru damıtmanın bir kombinasyonudur (Gupta et al., 2012).

Klasik ısı iletimi yöntemlerinin tersine, mikrodalga enerjisi materyalin tamamını aynı anda ve homojen bir şekilde ısıtma özelliğine sahiptir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon, temel olarak iki farklı sistemde uygulanır: En yaygını, sıcaklık ve basıncın kontrollü olduğu kapalı bir reaksiyon kabında yürütülen kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer bir uygulama ise atmosferik basınç altında açık bir kapta gerçekleştirilen açık sistem yöntemidir (Cellat, 2011).

Kapalı kap sisteminde, çözücü atmosferik kaynama noktasının oldukça üzerine kadar ısıtılabilir. Bu işlem hem ekstraksiyon hızını hem de verimliliği artırır (Kaufmann and Christen, 2002). Bu sistem, özellikle uçucu bileşikler için en uygun yöntemdir (Gupta et al., 2012).

Açık kap sisteminde ise maksimum sıcaklık, kullanılan çözücünün kaynama noktası tarafından belirlenir (Camel et al., 2001). Kapalı kap ekstraksiyonuna kıyasla, açık kap sistemleri örneklerin daha güvenli şekilde işlenmesini sağlar ve ayrıca daha büyük miktarlarda örneklerin ekstrakte edilmesine olanak tanır. Açık sistemlerde aynı anda birden fazla ekstraksiyon kabı kullanılabilir (Gupta et al., 2012).

Mikrodalga işlemleri sırasında aşırı ısınma durumunun meydana gelebileceği bildirilmiş olsa da mikrodalga ekstraksiyonun bu durumdan kaynaklanan fitokimyasal bileşenlerin termal bozunması sorununa maruz kalması olası değildir. Bunun nedeni, aşırı ısınmanın homojen sistemlerde meydana gelmesi, oysa mikrodalga ekstraksiyonunun heterojen bir sistem olmasıdır (Gupta et al., 2012).

1.3.2.3.6 Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu (Pressurised Solvent- Extraction-PSE)

Ekstraksiyonun geleneksel yöntemlerine karşı bir alternatif olarak geliştirilen bu teknik, çözücü kullanımını, süreyi ve verimi optimize etme gibi avantajlara sahiptir (Madencioğlu, 2023). Yöntemin etkinliği, kullanılan yüksek basınç ve sıcaklıktaki organik çözücüler aracılığıyla önemli ölçüde artırılmaktadır. Bu bağlamda, sıcaklığın yükseltilmesi ekstraksiyon kinetiğini hızlandırırken, basıncın artırılması çözücünün sıvı fazda tutulmasını sağlayarak güvenli ve hızlı bir ekstraksiyon ortamı oluşturmaktadır. (Kaufmann and Christen, 2002).

Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu tekniğinde, materyal çelik bir kap içerisine alınır ve çözücü ile 50–200°C arasında değişen sıcaklıklarda bir fırın içerisinde ısıtılır. Isıtma aşaması sırasında fırına ek olarak 500–3000 psi aralığında basınç uygulanır. İşlemin 5 ila 10. dakikalarında sisteme yeni çözücü pompalanarak hem örneğin hem de kabın yıkanması sağlanır. Son aşamada ise, sistem içindeki çözücü genellikle azot gazı kullanılarak toplanır (Karakaplan, 2017).

1.3.2.3.7 Katı faz mikroekstraksiyon (Solid Phase Microextraction-SPME)

Bu teknik, geleneksel olarak ayrı ayrı uygulanan örnek hazırlama, ekstraksiyon ve yoğunlaştırma aşamalarını tek bir adımda birleştirmektedir. En büyük avantajı, ekstraksiyon işleminin çözücü gerektirmeden gerçekleştirilmesidir. Çözücü kullanımının ortadan kalkması, yöntemi ekonomik açıdan oldukça tercih edilebilir hale getirir (Boyanay, 2013).

En yaygın uygulama alanı, genellikle Gaz Kromatografisi (GC) veya Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile kullanılarak çevre, biyolojik ve gıda örneklerinde bulunan uçucu ve yarı uçucu organik bileşiklerin ayrılması ve tayinidir (Vas and Vekey, 2004).

SPME cihazı, temel olarak modifiye edilmiş bir şırınga görünümündedir ve içinde polimerle kaplı hareketli bir erimiş silika lifi bulundurur. Bu yöntem hem gaz hem de sıvı çözeltileri örneklerine uygulanabilir. Ekstraksiyon için cihazın iğnesi kapalı ortama yerleştirilir ve lif dışarı çıkarılarak örnekle temas ettirilir. Lif üzerindeki polimer kaplama, analitleri tıpkı bir sünger gibi adsorpsiyon/absorpsiyon yoluyla yakalar. Örnek toplandıktan sonra lif, korunması için iğnenin içine geri çekilir. Son olarak, lifteki bileşenler termal desorpsiyon ile ısıtılarak GC veya GC-MS cihazına aktarılır ve analiz süreci tamamlanır (Kılıç, 2008).

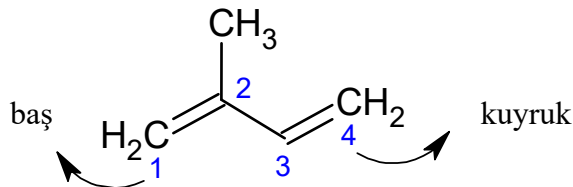
Basit yapısı ve düşük maliyetiyle öne çıkan SPME, temiz ve konsantre ekstraktlar sağlayarak kütle spektrometresi analizlerinde ideal bir verimlilik sağlamaktadır (Araújo et al., 2007).

1.4 Terpenler

Terpenler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin en yaygın grubunu temsil eder ve yapısal açıdan oldukça geniş bir çeşitliliğe sahip organik moleküllerdir. "Terpen" kelimesi, adını kozalaklı çam ağacı reçinesinden elde edilen bir bileşik olan "turpentin" isminden almıştır; sondaki "-en" eki ise molekülün yapısında çift bağ bulunduğunu işaret eder (Çarıkçı, 2010).

Terpenler, $(C_5H_8)_n$ formülüne sahip doğal hidrokarbon yapısındaki bileşikleridir. Terpenlerin oksijenli türevleri olan terpenoidler ise, bitkisel uçucu yağların belli başlı bileşenlerini meydana getirir (Öksüz, 2019). Şu ana kadar 70.000'den fazla terpenoid tanımlanmış olup, terpenoidler çok geniş bir bitki, mantar ve bakteri yelpazesi tarafından sentezlenmektedir. Aromatik nitelikleri sayesinde bitki terpenoidlerinin kullanım spektrumu oldukça geniştir; hücre zarında yer alma, tozlayıcıları çekmek için feromon görevi görme, otçulları uzaklaştırma, parazit ve patojenlerle savaşma gibi çeşitli biyolojik roller üstlenirler. Ayrıca günümüzde endüstriyel (yakıt sentezi, gıda aromaları, ekstraksiyon çözücüler) ve farmasötik ürünlerde geniş biçimde kullanılmaktadır. Bu bileşikler antiviral, antimikrobiyal, antifungal, sitotoksik ve antiinflamatuvar özellikler sergiler (Seglab et al., 2024).

Baş-kuyruk kondenzasyonu, terpen yapılarının oluşum sürecindeki ana reaksiyon mekanizmasıdır ve iki adet izopren (2-metil-1,3-bütadien) biriminin birleşmesini kapsar. Bu kural uyarınca, izopren ünitesinde dallanmanın olduğu tarafta bulunan 1 numaralı karbon baş; dallanmanın olmadığı tarafta bulunan 4 numaralı karbon ise kuyruk olarak tanımlanır (Özer, 2010). Terpenler, Şekil 1.3'te gösterilen izopren molekülünden iki veya daha fazlasının birleşimi sonucu oluşur (Çarıkçı, 2010).



Şekil 1.3: İzopren molekülü

Terpenler, yapılarında bulundurdıkları izopren birimi sayısına göre sınıflandırılır (Kaya, 2010). Tablo 1.1’de bu grupların karbon ve izopren sayıları gösterilmiştir.

Tablo 1.1: Terpen sınıfları: İzopren ve karbon sayısı karşılaştırması

Terpen grubu	İzopren birim	Karbon
	sayısı	atomu sayısı
Monoterpenler	2	10
Seskitерpenler	3	15
Diterpenler	4	20
Sesterpenler	5	25
Triterpenler	6	30
Tetraterpenler	8	40
Politerpenler	>8	>40

Uçucu yağların kimyasal profilinde, baskın olarak monoterpen ve seskitерpen yapısındaki yüksek uçuculuğa sahip hidrokarbonlar yer alır. Yapısal olarak daha büyük olan diterpenler, triterpenler ve politerpenler ise uçucu olmayan hidrokarbonlardır. Bu uçucu olmayan bileşenler, bitkideki uçucu yağ içinde çözünmüş olarak bulunabilirler, ancak su buharı distilasyonu gibi yöntemlerle yağ elde edilirken sürüklenmedikleri için nihai ürüne geçmezler (Öksüz, 2019). Bu farklı terpen sınıflarının her biri, bitkilerin büyümesi, metabolizması veya ekolojisi açısından önemli bir role sahiptir (Harborne, 1998).

1.4.1 Monoterpenler

Monoterpenler, kendilerine has uçucu ve keskin kokularıyla bilinir ve büyük çoğunluğu yüksek yapılı bitkiler tarafından üretilir (Kaya, 2021). Düşük kaynama noktalarına sahip olmaları nedeniyle yüksek buharlaşma kabiliyetine (uçuculuğa) sahiptirler. Bitkilerin uçucu yağlarının ana bileşenlerini oluşturan bu maddeler; karakteristik aroma verici özellikleri sayesinde gıda, kozmetik ve farmakoloji endüstrilerinde yüksek ekonomik değere sahiptir (Gürsul, 2015).

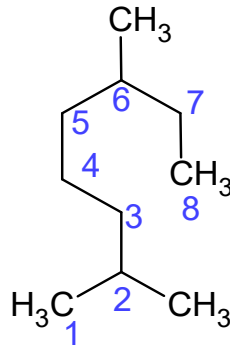
Monoterpenler, bitkisel gelişim ve organizmalar arası etkileşimlerde (allelpati, böcek cezbetme/uzaklaştırma) anahtar rol oynarlar. Patojenlere karşı inhibitör etkileri bulunan bu bileşikler; parfüm ve plastik sanayisinde hammadde, tıpta ise antibakteriyel, antikanser ve antispazmotik özellikleri nedeniyle halk ilacı olarak yaygın kullanılırlar (Gürsul, 2015).

Kimyasal olarak iki izopren biriminden oluşan monotерpenler, sentezlenirken büyük ölçüde baş-kuyruk bağlanması kuralına uygunluk gösterir. Monoterpen sınıfının en bilinen üyeleri, çam ağaçlarının karakteristik bileşenleri olan α -pinen ve β -pinen'dir. Bu bileşikler, keskin kokuları ve ticari potansiyelleri sayesinde plastik ve parfüm endüstrisi sanayisinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, monotерpenler güçlü biyolojik aktivitelere sahiptir; antispazmotik, antibakteriyel, antifungal ve antikanserojen gibi çeşitli terapötik özellikler sergilerler (Boyanay, 2013; Yılmaz, 2018).

Monoterpenler, kimyasal yapılarına göre üç ana kategoriye ayrılır. Asiklik monotерpenler, düz zincir yapısında olup tipik olarak üç çift bağ içerirler; bu bileşiklerin optikçe aktif olması, moleküldeki asimetrik karbon atomlarının varlığına bağlanır. Bir halkalı yapıya sahip olan monosiklik monotерpenler ise iki çift bağ taşırken, bisiklik monotерpenler iki halka ve bir çift bağ içeren daha karmaşık bir iskelete sahiptir (Yılmaz, 2018).

1.4.1.1 Asiklik monotерpenler

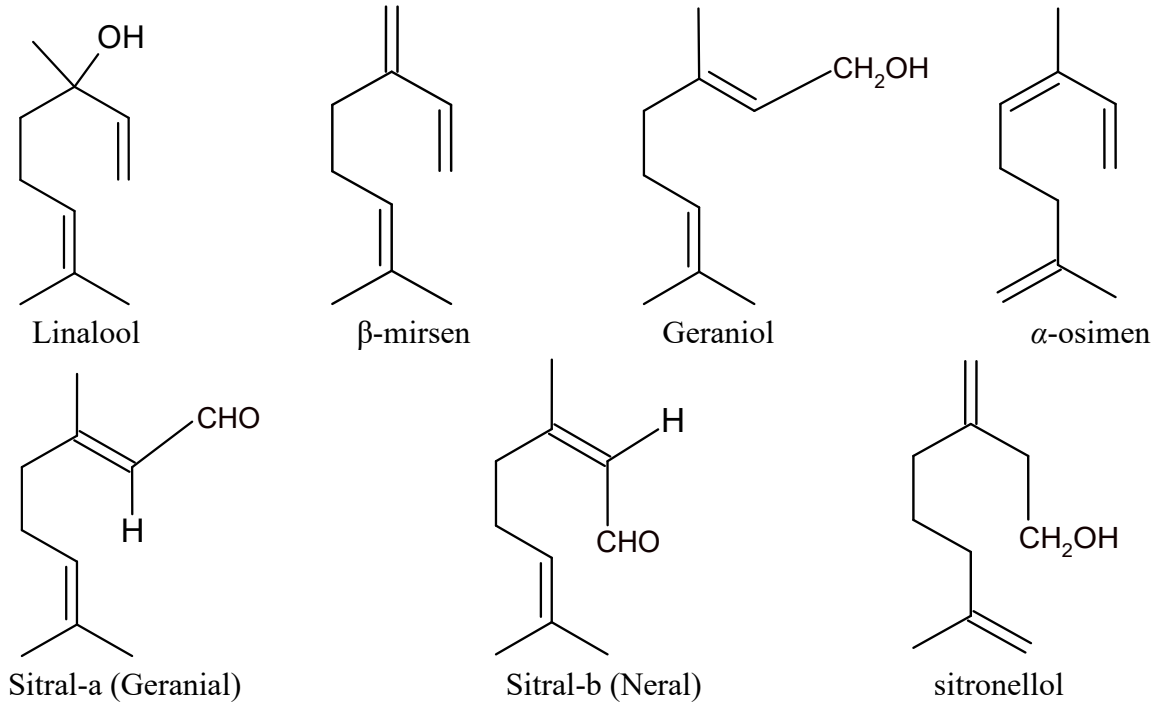
Asiklik monotерpenlerin temel iskeleti, 2,6-dimetiloktan yapısını esas alır ve genellikle üç adet çift bağ içerir. Farmakognozik açıdan büyük öneme sahip olan bu bileşiklerin oksijenli türevleri ise asiklik monotерpenoitler olarak adlandırılır. Söz konusu iskeletler; primer veya tersiyer alkollerin yanı sıra ester ve aldehit gibi fonksiyonel grupları barındırabilir ve yapılarında bir ya da iki etilenik bağ bulundurabilir. (Dereli, 2016).



Şekil 1.4: 2,6-dimetiloktan

Çeşitli asiklik monotерpen ve monotерpenoitler Şekil 1.5'te görülmektedir (Öksüz, 2019; Bektaş, 2014). Örneğin *Inula viscosa* bitkisinden elde edilen uçucu yağın GC/MS ile yapılan analizlerinde bileşenlerinden bazılarının linalool ve β -mirsen olduğu bulunmuştur

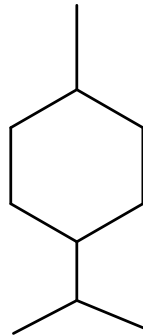
(Mueller-Riebau et al., 1995). Başka bir çalışmada *I. viscosa* yapraklarından ekstrakte edilen bir asiklik monoterpen alkol olan geraniol olduğu tespit edilmiş (Alalan et al., 2016).



Şekil 1.5: Bazı asiklik monoterpenler

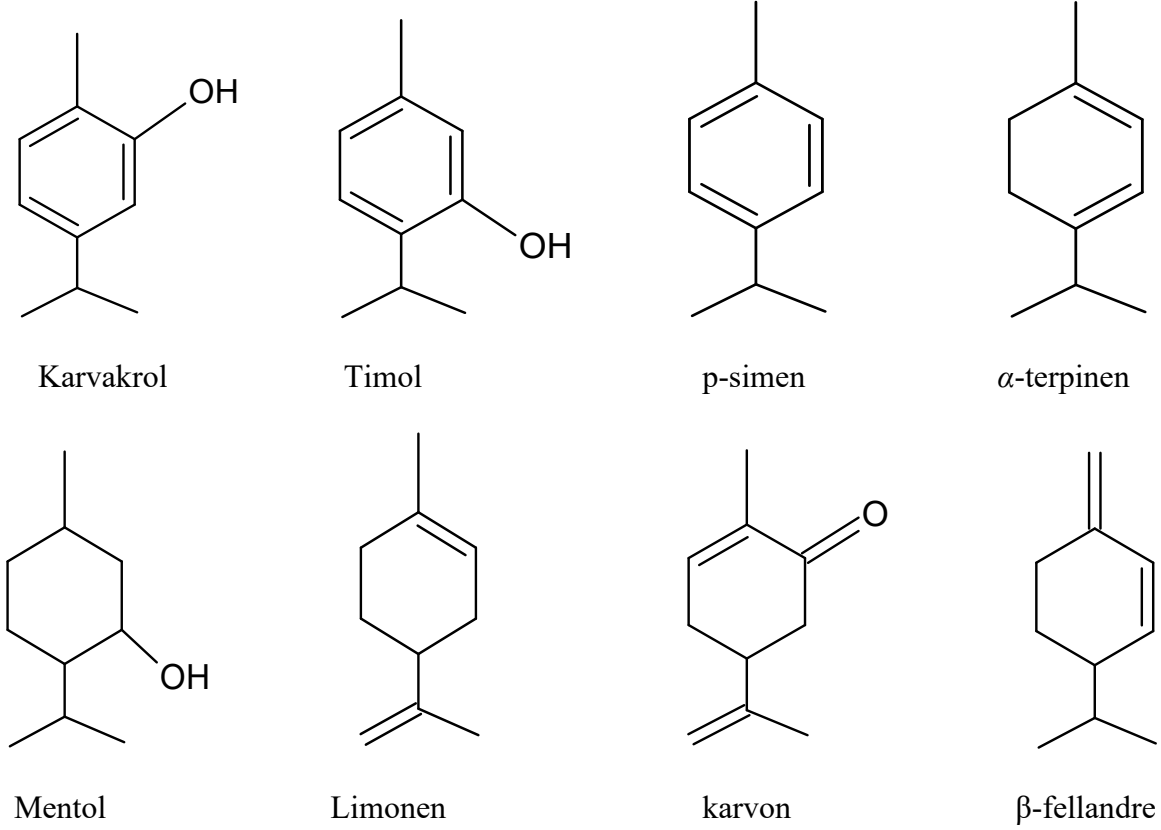
1.4.1.2 Monosiklik monoterpenler

Monosiklik monoterpenler, yaygın olarak p-mentan iskeletine sahiptir ve moleküllerinde genellikle bir halka ve iki adet çift bağ bulundurulur. Bu yapıların oksijenli türevleri; sekonder veya tersiyer alkol, ester, keton, epoksit ve peroksit gibi çeşitli fonksiyonel grupları taşıyabilir. Kimyasal doyumluklarına göre bu bileşikler dietilenik, monoetenik veya tamamen doymuş formlarda bulunabilir (Dereli, 2016).



Şekil 1.6: p-mentan yapısı

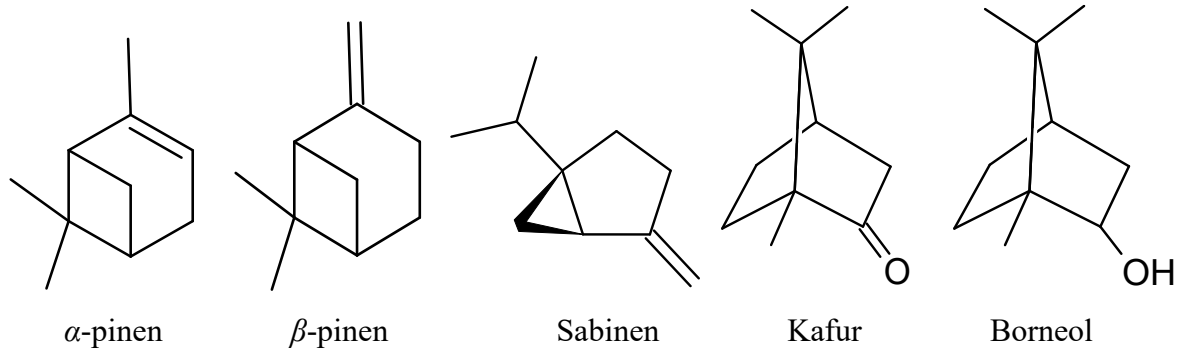
Inula türlerinden elde edilen monosiklik monoterpenlere örnek olarak karvakrol, timol, p-simen, α -terpinen en çok rapor edilen bileşiklerdir (Karamenderes ve Zeybek, 2000; Giamperi et al., 2010). Mentol, limonen, karvon, fellandren monosiklik monoterpenlere örnek olarak verilebilir.



Şekil 1.7: Bazı monosiklik monoterpenler

1.4.1.3 Bisiklik monoterpenler

Yapısal olarak sabinen, karen, pinen ya da kamfen iskeletlerinden türeyen bisiklik monoterpenler, moleküllerinde çoğunlukla bir çift bağ taşır. Bu yapıların oksijen içeren türevleri; sekonder alkol, ester veya keton fonksiyonel gruplarını barındırabilir ve kimyasal açıdan monoetilenik veya tamamen doymuş formlarda bulunabilir (Dereli, 2016). Öte yandan, *Inula* türleri üzerinde yapılan kimyasal çalışmalar, bu bitkilerde de birçok bisiklik monoterpenin bulunduğunu rapor etmektedir (Pérez-Alonso et al., 1996; Abeda et al., 2024; Alalan et al., 2016). Şekil 1.8'de bu iskelet yapılarından türeyen bazı bisiklik monoterpenlere örnekler gösterilmiştir.



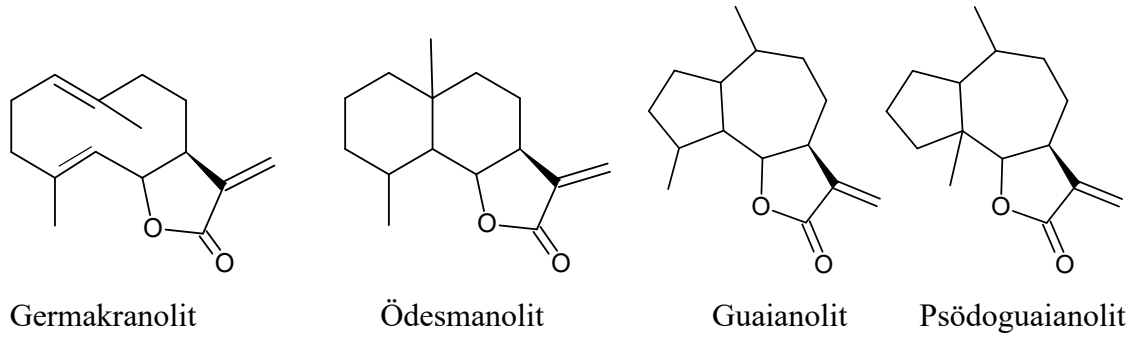
Şekil 1.8: Bazı bisiklik monotерpenler

1.4.2 Seskiterpenler

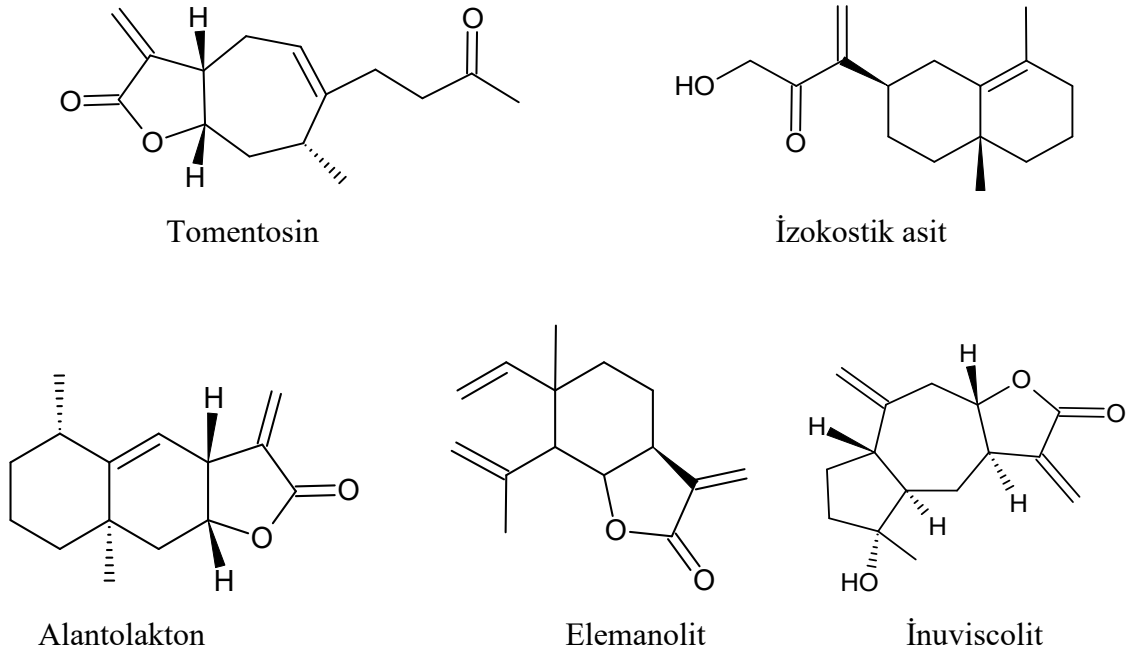
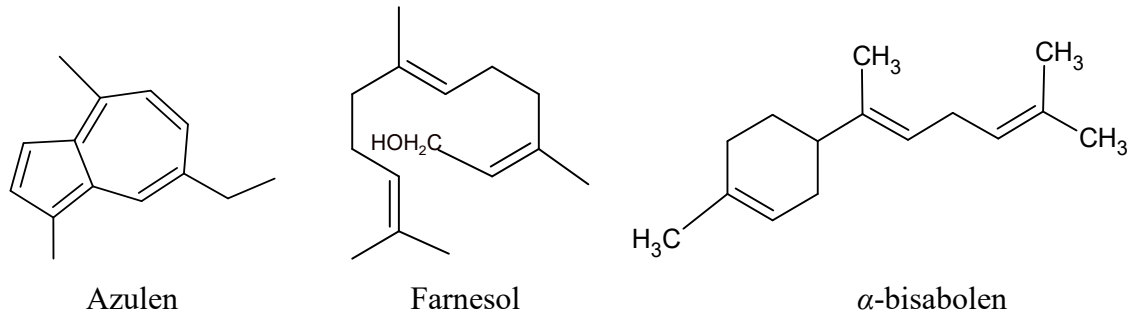
Seskiterpenler, tıpkı monotерpenler gibi geniş bir yapısal çeşitlilik gösterir ve üç izopren biriminin birbirine bağlanmasıyla oluşur (Dereli, 2016). Bu grup, terpen sınıflandırmasında en yoğun ve yapısal açıdan en karmaşık bileşikler barındırır. Bu bileşiklerin çoğu α - ve β -doymamış karbonil grubu içerir (Kaya, 2021). *Inula* türleri üzerinde yapılan çalışmalar da bu bitkilerin uçucu yağlarında çok sayıda ve çeşitli seskiterpen bileşiği bulunduğu rapor edilmiştir (Abu Zarga et al., 2003; Fontana et al., 2007; Barrero et al., 2008; Nasser et al., 2014; Aissa et al., 2019). Seskiterpenler, özellikle gıda ve ilaç sektörlerinde taşıdıkları büyük değer nedeniyle öne çıkan önemli bir bileşik grubudur (Cellat, 2011).

Seskiterpen iskeletleri, halkalaşma derecelerine göre; asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik ve tetrasiklik formlar olmak üzere beş temel yapısal kategoride sınıflandırılır (Çöl, 2007). Bu bileşikler, fonksiyonel grup varlığına bağlı olarak hidrokarbonlar, alkoller, ketonlar ya da laktonlar şeklinde bulunabilen geniş bir kimyasal çeşitliliğe sahiptir. Günümüzde, 2000'den fazla seskiterpen laktonu bileşiği tanımlanmıştır. (Yetüt, 1998).

Karbosiklik iskelet sistemleri temel alınarak yapılan değerlendirmede, seskiterpen laktonları dört temel kategori altında gruplandırılmaktadır. Bu gruplardan ilki olan germakranolitler, on üyeli bir halka yapısına sahiptir. İkinci grup olan ödesmanolitler ise birbirine kaynaşmış iki altı üyeli halkadan oluşmaktadır. Son olarak guaianolitler ve psödoguaianolitler yedi üyeli bir halkaya bağlanmış beş üyeli bir halka yapısı taşır (Sulsen and Martino, 2018). Şekil 1.9'da bu dört ana grubun (germakranolitler, ödesmanolitler, guaianolitler ve psödoguaianolitler) temel iskelet yapıları gösterilmiştir. Şekil 1.10'da ise, *Inula* türlerinden elde edilenler de dâhil olmak üzere hem genel seskiterpen hem de seskiterpen lakton yapılarına ait bazı tipik örnekler sunulmuştur.



Şekil 1.9: Seskiterpen laktonlarının temel iskelet yapıları



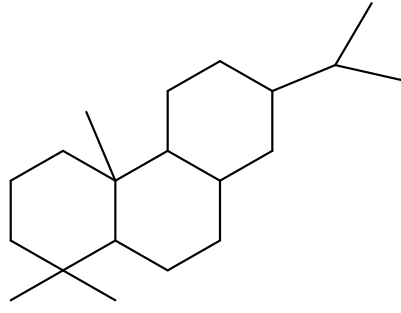
Şekil 1.10: Bazı Seskiterpenler ve seskiterpen laktonlarına ait kimyasal yapılar

1.4.3 Diterpenler

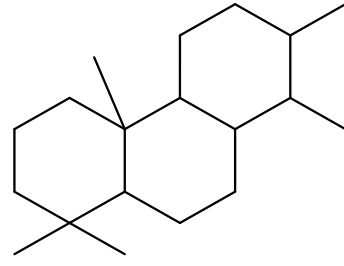
Diterpenler, dört izopren ünitesinin birleşmesiyle meydana gelen ve $C_{20}H_{32}$ moleköl formölüne sahip bileşiklerdir. Bitki ve mantarlardan elde edilmelerinin yanı sıra, deniz ve böcek dünyasında da bulunurlar. Başlangıçta incelenen örnekler, tamamen diterpen asitlerden oluşan ve o dönemin teknolojisiyle analiz edilmesi oldukça zor olan çam reçineleriydi. Kompleks diterpen karışımının başarılı bir şekilde izole edilmesi ihtiyacı, farklı ekstraksiyon sistemlerinin ve yeni ayırma yöntemlerinin geliştirilmesini teşvik etmiştir. Nitekim, kromatografik tekniklerdeki hızlı ilerlemeler diterpenlerin yapılarının kısa sürede aydınlatılmasına olanak sağlamıştır. Son yirmi yılda diterpen yapı tiplerinin çeşitliliği önemli ölçüde artsa da sınıflandırmaları biyogenetik esaslara dayanmaya devam etmektedir (Çöl, 2007).

Doğal kaynaklı ürünler arasında diterpenler, biyolojik etkinlik çeşitliliği bakımından en kapsamlı gruplardan biri olarak literatürde yer almaktadır. Bu bileşikler, özellikle bitki hormonlarının gelişiminde kritik roller üstlenirler. Diterpenlerin önemli biyolojik fonksiyonlarına örnek olarak; bitki büyüme hormonu olan gibberalin ve büyüme inhibitörü olan podolakton verilebilir. Ayrıca, böceklere karşı kullanılan acı maddeler (örneğin klerodan tipi diterpenler) ve anti-feedant etkileri de mevcuttur. Tıbbi açıdan ise, bazı diterpenlerin anti-tümör ve antibiyotiklere benzer aktiviteleri ile yüksek tansiyonu düşürücü etkileri bulunmaktadır. Bunun yanında, solerol ürünleri gibi bazı diterpenler parfümeri endüstrisinde de yer bulmaktadır (Gören, 2002). Diterpenlerdeki bu yüksek yapısal çeşitlilik, fitokimya bilim dalının gelişmesini kolaylaştırmaktadır ve söz konusu biyolojik aktivitenin halkalı diterpenlerde daha yoğun gözleendiği bilinmektedir (Çöl, 2007).

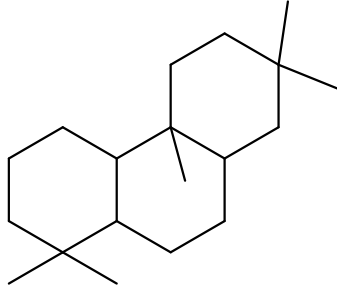
Diterpenler için de geniş bir biyogenetik çeşitlilik söz konusudur. Literatürde rapor edilen 70 farklı diterpen iskeletinden, 20 adedi temel diterpen iskeleti, kalan 50 tanesi ise literatürde daha az rastlanan diterpen iskelet formları olarak sınıflandırılmıştır (Çöl, 2007). Doğada çok bulunan diterpen iskeletleri 1.11’de gösterilmiştir.



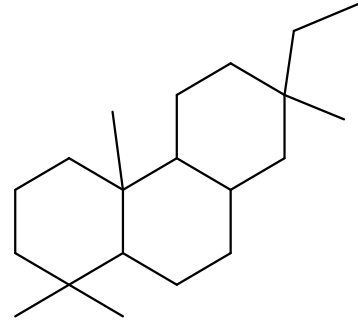
Abietan



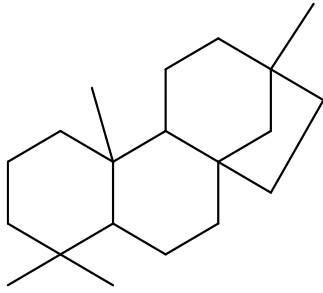
Labdan



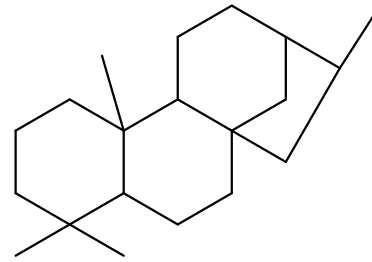
Rozan



Pimaran



Stakan

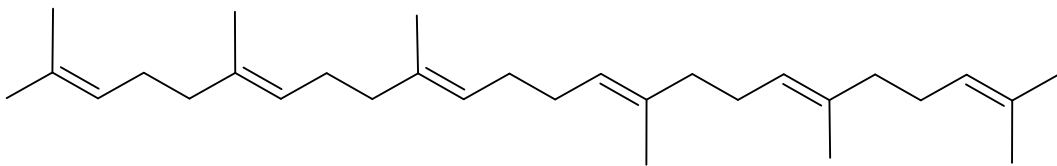


Kauren

Şekil 1.11: Bazı diterpen iskeletleri

1.4.4 Triterpenler

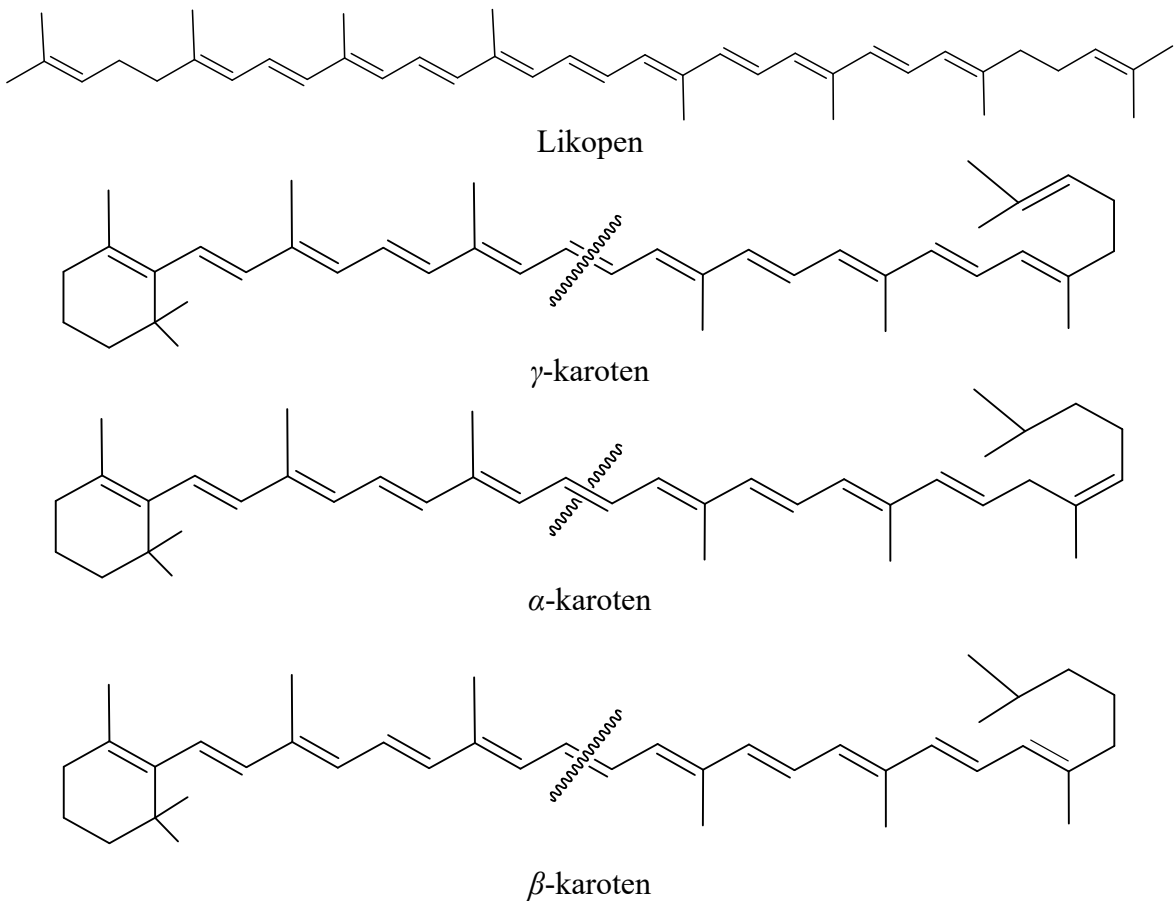
Triterpenler, altı izopren biriminin bağlanmasıyla oluşur ve genel molekül formülleri $C_{30}H_{48}$ 'dir. Bu grubun en önemli üyesi, düz zincirli bir triterpen olan ve özellikle köpekbalığı karaciğer yağının ana bileşeni olarak bilinen squalene'dir (Çöl, 2007).



Şekil 1.12: Squalene'nin yapısı

1.4.5 Tetraterpenler

Tetraterpenler, sekiz izopren birimi içerir ve $C_{40}H_{56}$ genel molekül formülüne sahiptirler. Biyolojik açıdan önemli olan bu bileşikler arasında, asiklik likopen, monosiklik gama-karoten ile bisiklik alfa- ve beta-karoten gibi karotenoidler yer alır. Doğada yaygın dağılım gösteren karotenoidler, bitkilere sarı, turuncu ve kırmızı renklerini veren pigmentlerdir. Doğal kaynaklardan yaklaşık 600 farklı türü tanımlanan karotenoidler, özellikle meyve ve sebzelerde bolca bulunur. Sağlık açısından kritik rolleri bulunan bu bileşiklerin başlıca fonksiyonu, A vitamininin öncülü olarak görev yapmalarıdır (Gürsul, 2015).



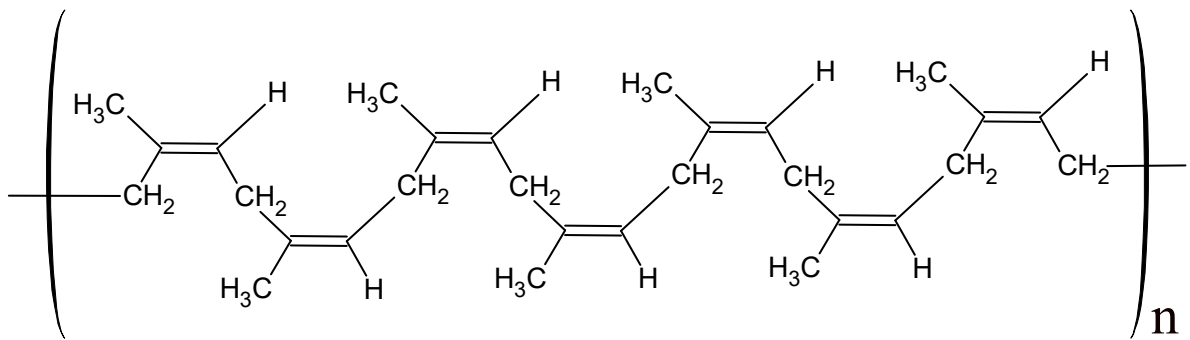
Şekil 1.13: Bazı tetraterpenlere ait kimyasal yapılar

1.4.6 Politerpenler

Politerpenler, çok sayıda izopren biriminin birbirine bağlanarak uzun zincirler oluşturmasıyla meydana gelir. Söz konusu grup içerisinde en yaygın kullanım alanına

sahip olan madde kauçuktur. Lateks olarak da isimlendirilen bu doğal polimer, özellikle ekvatorial bölgelerdeki ağaçlardan sağlanan bitkisel bir salgı niteliğindedir (Özer, 2010).

Kauçuğun parçalayarak damıtılması sonucunda, temel yapı taşı olan izopren birincil ürün olarak açığa çıkmaktadır; bu durum kauçuğun polimerik yapısının izopren ünitelerinden oluştuğunu kanıtlar ve molekül formülünün $(C_5H_8)_n$ olduğunu gösterir. Bu moleküler yapı, saf kauçuk analizleriyle de doğrulanmıştır. Doğal kauçuk, izopren birimlerinin 1,4 katılma polimeri olarak kabul edilir. Doğal kauçuk oluşumunda, izopren birimleri baş-kuyruk düzeninde eklenerek birleşir ve tüm çift bağlar cis konfigürasyonundadır (Çöl, 2007).



Şekil 1.14: Doğal Kauçuk (cis-1,4-poliizopren)

1.5 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, moleküler yapılarında en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir veya daha fazla hidroksil (–OH) grubu bulundurmakla karakterize edilirler (Crozier et al, 2006).

Son yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar, bitkilerde yoğun olarak bulunan fenolik bileşikler içeren besinlerin tüketiminin insan sağlığı üzerinde olumlu etkiler yarattığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, söz konusu bileşikler üzerine yapılan bilimsel çalışmalar büyük bir ivme kazanmıştır. Fenolik bileşiklerin temel özelliklerinden biri, serbest radikallere karşı gösterdikleri antioksidan kapasitedir. Antioksidan aktivite, fenol halkasına bağlı hidroksil iyonu (–OH) sayısındaki artışla doğru orantılı olarak yükselmektedir. Ayrıca bu antioksidan güç, hidroksil gruplarının halkadaki bağlanma konumlarına göre de değişmektedir (Özcan, 2008).

Bu özelliklerinin yanı sıra, literatürde 8000'den fazla fenolik yapının rapor edildiği ve bu bileşiklerin bitkiler aleminde yaygın olarak dağıldığı bildirilmektedir. Fenolikler, yapısal açıdan oldukça geniş bir çeşitlilik sunar; basit, düşük molekül ağırlıklı, tek aromatik halkalı

bileşiklerden, büyük ve karmaşık yapıli tanenlere ve türev polifenollere kadar değışen formlarda bulunurlar (Crozier et al, 2006).

Fenolikler, genellikle karbon atomlarının sayısına ve bu atomların düzenlenişine göre sistematiik olarak sınıflandırılırlar. Doğada yaygın olarak şekerler (glikozitler) ve organik asitler ile konjuge formlarda bulunurlar (Crozier et al, 2006).

Fenolik bileşikler; yapılarındaki fenol halkasının adedi ve bu halkaların birbirleriyle olan bağlanma biçimleri esas alınarak flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki grupta incelenirler (Yılmaz, 2018).

1.5.1 Flavonoidler

Flavonoidler, Şekil 1.15'te gösterildiğı gibi on beş karbon içeren, üç karbonlu bir köprü ile birbirine bağlanmış iki aromatiik halkadan oluşan polifenolik bileşiklerdir (Crozier et al, 2006). Fenolik bileşikler içerisinde en büyük sınıfı flavonoidler oluşturur (Gürsul, 2015).

Flavonoidler çoğunlukla meyve, sebze ve tahıllarda bulunurlar. Bu bileşikler çiçeklerin, meyvelerin ve bazen de yaprakların renklerinden sorumludur. Bunlardan antosiyanidinler, bitki bünyesinde genellikle şekerlerle birleşmiş glikozitler şeklinde bulunur ve bu yapılar bitkilerde pembe- kırmızı- mavi renk pigmentasyondan sorumluyken, diğer flavonoidler beyaz ve sarı renklerin oluşumunu sağlar. Flavonoidlerin fonksiyonları yalnızca pigmentasyonla sınırlı değildir; ayrıca güneşin UV radyasyonuna, parazitlere karşı koruma, enzimatiik süreçlerin modülasyonu ve koku özelliklerinin kazandırılması gibi çeşitli biyolojik mekanizmalarda görev alırlar (Söylemezoğlu, 2003).

Flavonoidler, yaprakların epidermisinde ve meyvelerin kabuğunda yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve sekonder metabolitler olarak önemli ve çeşitli rollere sahiptirler. Bitkilerde flavonoidler, UV koruması, pigmentasyon, azot bağlayıcı nodüllerin uyarılması ve hastalıklara direnç gibi çok çeşitli süreçlerde görev alırlar (Koes et al., 1994; Crozier et al, 2006).

Flavonoidler, temel iskeletleri itibarıyla iki aromatiik fenil halkasının üç karbonlu bir köprü ile bağlandığı 15 karbonlu difenilpropan (C₅-C₃-C₆) yapısına sahiptirler. Bu öncül yapı, oksijen atomu üzerinden gerçekleşen halkalaşma neticesinde heterosiklik bir sistem olan 2-

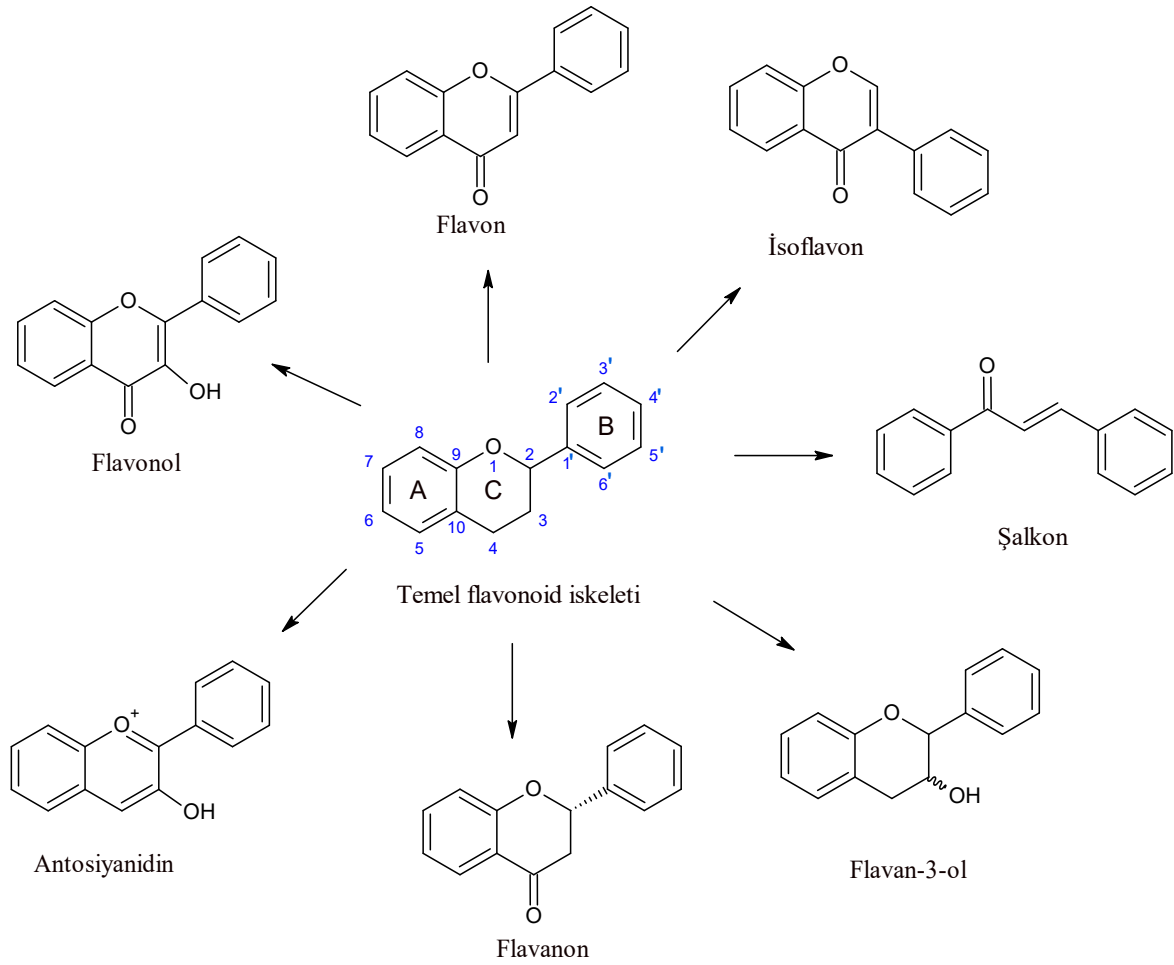
fenilbenzopiran formuna dönüşmektedir. Numaralandırmada, fenil halkaları A ve B harfleriyle ifade edilirken, piran halkası ise C simgesiyle gösterilir. Yapıdaki numaralandırma işlemi heterosiklik C halkasındaki oksijen atomundan başlatılmakta, B halkasındaki karbon atomları ise karışıklığı önlemek amacıyla üssü (') işaretli rakamlarla tanımlanmaktadır (Selen, 2014). Şekil 1.15'te flavonoidlerin numaralandırması gösterilmiştir.

Flavonoidlerin büyük bir kısmında yukarıda ifade edilen üç halkalı (A, B ve C) kapalı yapı gözlenirse de bu ailenin biyosentetik yolaktaki ilk basamağını oluşturan şalkonlar, merkezi C halkasının kapanmadığı bir grup olarak flavanoid türleri arasında yerini alır. Şalkonlar flavonoidlerin heterosiklik karbon halkasına sahip olmayan üyeleridir. (Go et al., 2005; Selen, 2014).

Flavonoidlerin başlıca alt sınıfları şunlardır:

- Flavonoller
- Flavonlar
- İzoflavonlar
- Flavanonlar
- Flavan-3-oller
- Antosiyanidinler
- Şalkonlar

Bu sınıflandırma ve temel yapıları Şekil 1.15'te görsel olarak sunulmuştur.



Şekil 1.15: Başlıca flavonoidlerin genel yapıları

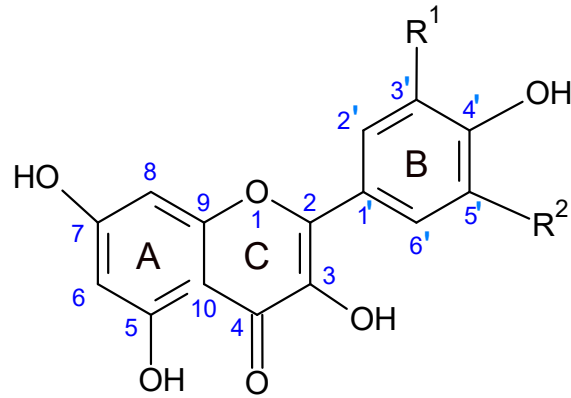
Temel flavonoid iskeleti çok sayıda sübstitüente sahip olabilir. Hidroksil grupları genellikle 4', 5 ve 7 pozisyonlarında bulunur. Glikozitler çok yaygındır ve flavonoidlerin büyük çoğunluğu doğada glikozitler olarak bulunur. Flavonoidlerin yapısına glikozitler ve hidroksil grupları eklendiğinde, bu gruplar su molekülleriyle hidrojen bağları kurarak bileşiğin suda çözünme yeteneğini artırırken, metil grupları ve izopentil birimleri gibi diğer sübstitüentler flavonoidleri yağda çözünür hale getirir (Crozier et al., 2006).

1.5.1.1 Flavonoller

Flavonoller, muhtemelen flavonoidlerin en yaygın olanlarıdır; mantarlar ve algler hariç tüm bitkiler alemine dağılmışlardır (Crozier et al., 2006). Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın bulunan ve en çok yapısal çeşitliliğe sahip alt sınıfı olan flavonoller, fiziksel olarak kristalize ya da amorf formlarda bulunma eğilimindedir ve sarı rengin tonlarını taşırlar. (Öncü, 2018).

Flavonoller, başlıca glikozitler halinde, yapraklı sebzeler, yumrular, soğanlar, çeşitli meyveler, otlar, baharatlar, çay ve şarap dâhil olmak üzere birçok gıda bitkisinin yenilebilir bölümlerinde geniş bir dağılım göstermektedir (D'Andrea, 2015).

Mirsetin, kersetin, izorhamnetin ve kaempferol gibi flavonoller (Şekil 1.16), en yaygın olarak O-glikozitler olarak bulunurlar. Konjugasyon en sık C-halkasının 3. pozisyonunda gerçekleşir, ancak süstitüsyonlar karbon halkasının 5, 7, 4', 3' ve 5' pozisyonlarında da meydana gelebilir (Crozier et al., 2006).



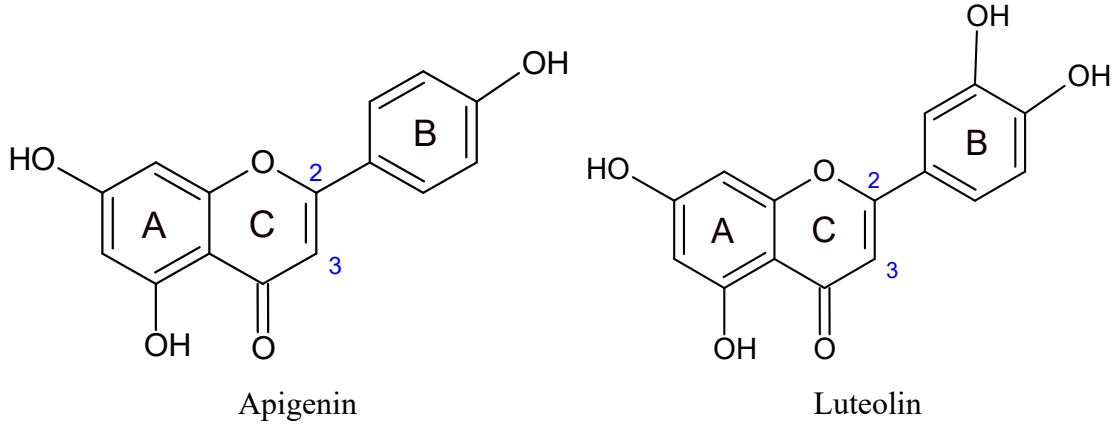
Flavonol	R ¹	R ²
Kersetin	OH	H
İzorhamnetin	OMe	H
Kaempferol	H	H
Mirsetin	OH	OH

Şekil 1.16: Flavonoller ailesine ait moleküller ve bunların kimyasal yapıları

1.5.1.2 Flavonlar

Flavonlar, bitki türlerinde sıkça rastlanan flavonoid gruplarından biridir. Bu moleküllerin ayırt edici yapısal özelliği, heterosiklik halkada yer alan C-2 ve C-3 karbon atomları arasındaki çift bağ bulunmasından kaynaklanır. Bitkisel kaynaklarda aglikon (serbest) ve glikozit (şekerli) formlarıyla mevcut olan flavonların, bugüne kadar 300'ün üzerinde aglikon çeşidi izole edilmiştir (Yılmaz, 2018). Ayrıca flavonlar, A ve C halkası süstitüsyonlarına sahip olmalarına rağmen, C3 pozisyonunda hidroksil grubundan yoksundurlar (Crozier et al., 2006).

Flavonların en basit formları, aromatik halkalarında sadece hidroksil (–OH) veya metoksil (–OCH₃) grupları taşıyanlardır. Yapılarındaki bu oksijenli gruplar nedeniyle bu bileşikler, aynı zamanda oksijenli ya da O-süstitüe flavonlar olarak da adlandırılır. Bu sınıfa verilebilecek en yaygın örnekler apigenin ve luteolindir (Yılmaz, 2018).

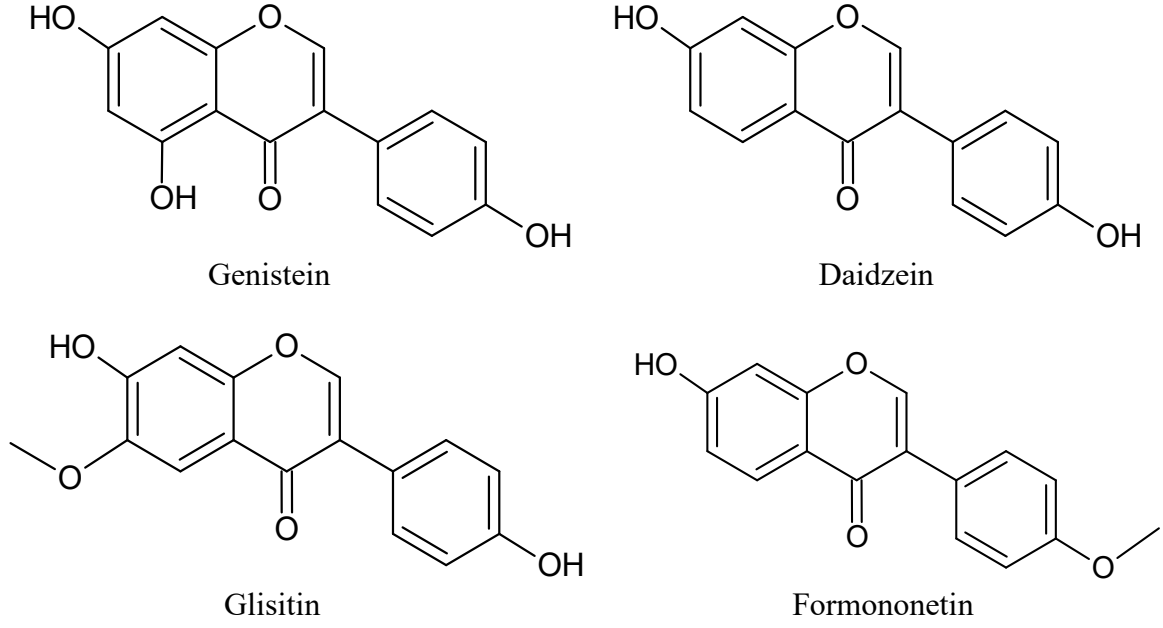


Şekil 1.17: Flavon apigenin ve luteolin bileşiklerinin kimyasal yapısı

1.5.1.3 İzoflavonlar

İzoflavonlar, soya fasulyesi, kırmızı yonca, yer fıstığı, nohut ve yonca gibi bitkilerde doğal olarak üretilen sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler, Şekil 1.15'te gösterildiği gibi polifenolik üç halkalı (A, B ve C) temel yapısıyla flavonoidler sınıfının önemli bir alt grubunu teşkil etmektedir. B halkasının C2 pozisyonunda değil, C3 pozisyonunda bağlı olmasıyla diğer flavonoidlerden ayrılırlar (Güneş, 2021).

İzoflavonların en yoğun kaynağı, genistein, daidzein ve glisitein gibi bileşikleri yüksek oranda içeren soya fasulyesidir. Kırmızı yonca; daidzein ve genisteinin yanı sıra, büyük oranda formononetin içeren ve doğada yaygın olarak bulunan bir izoflavon kaynağıdır. İzoflavonlar bitkiler içinde glikozit ve aglikon şeklinde iki formda bulunurlar (Güneş, 2021).



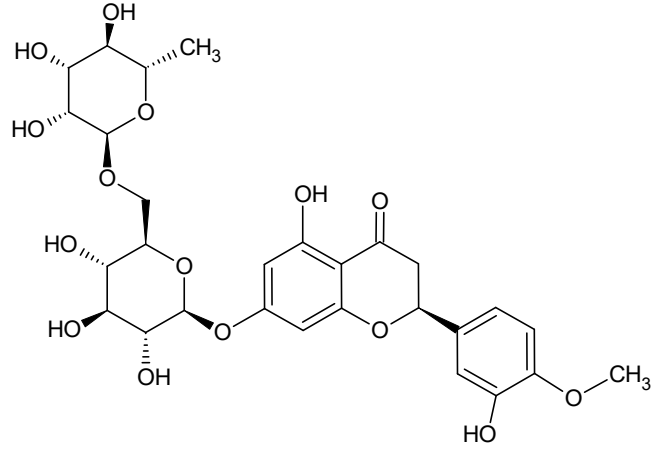
Şekil 1.18: Bazı izoflavon bileşiklerinin kimyasal yapısı

1.5.1.4 Flavanonlar

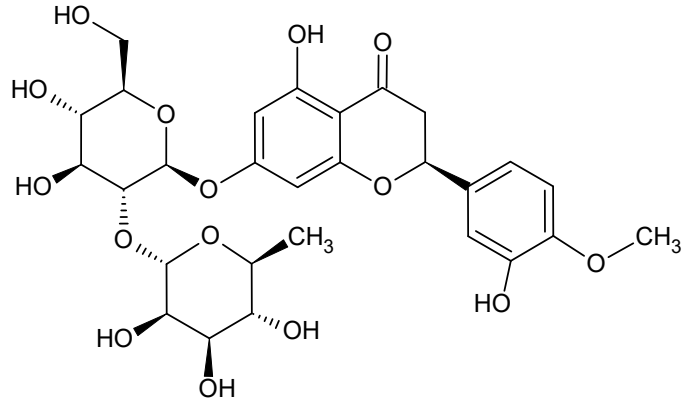
Flavanonlar, 2,3 çift bağının olmaması ve C2 pozisyonunda kiral bir merkezin bulunmasıyla karakterize edilirler. Doğal olarak oluşan flavanonların çoğunluğunda, C halkası, B halkasına C2'de α -konfigürasyonunda bağlanmıştır (Crozier et al., 2006).

Flavanonlar, flavonol ve flavonların aksine yaygın gıda çeşitliliğinde bulunmaz; neredeyse sadece narenciye meyvelerinde ve daha az ölçüde domates ve bazı aromatik otlarda (nane gibi) bulunmaktadır (Li and Schluesener, 2017).

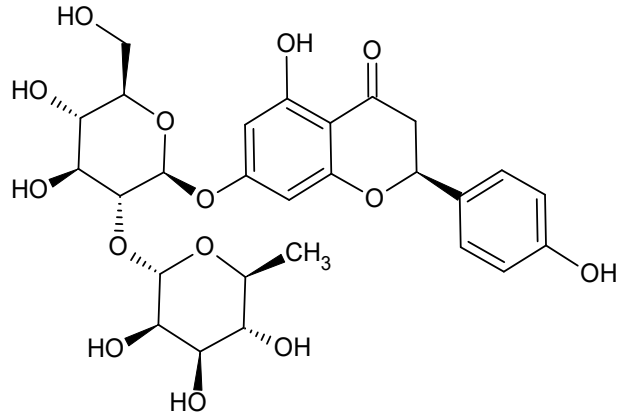
En yaygın flavanon glikoziti, narenciye kabuğunda bulunan hesperidindir (hesperetin-7-*O*-rutinozit). Acı portakaldan (*Citrus aurantium*) elde edilen neohesperidin (hesperetin-7-*O*-neohesperidozit) ve greyfurt kabuğundan (*Citrus paradisi*) elde edilen narinjin (narinjenin-7-*O*-neohesperidozit) bileşiklerinin yoğun acı bir tadı vardır (Crozier et al., 2006). Söz konusu bileşiklerin (hesperidin, neohesperidin ve narinjin) kimyasal yapıları Şekil 1.19'de gösterilmiştir.



Hesperidin (hesperetin-7-*O*-rutinozit)



Neohesperidin (hesperetin-7-*O*-neohesperidozit)



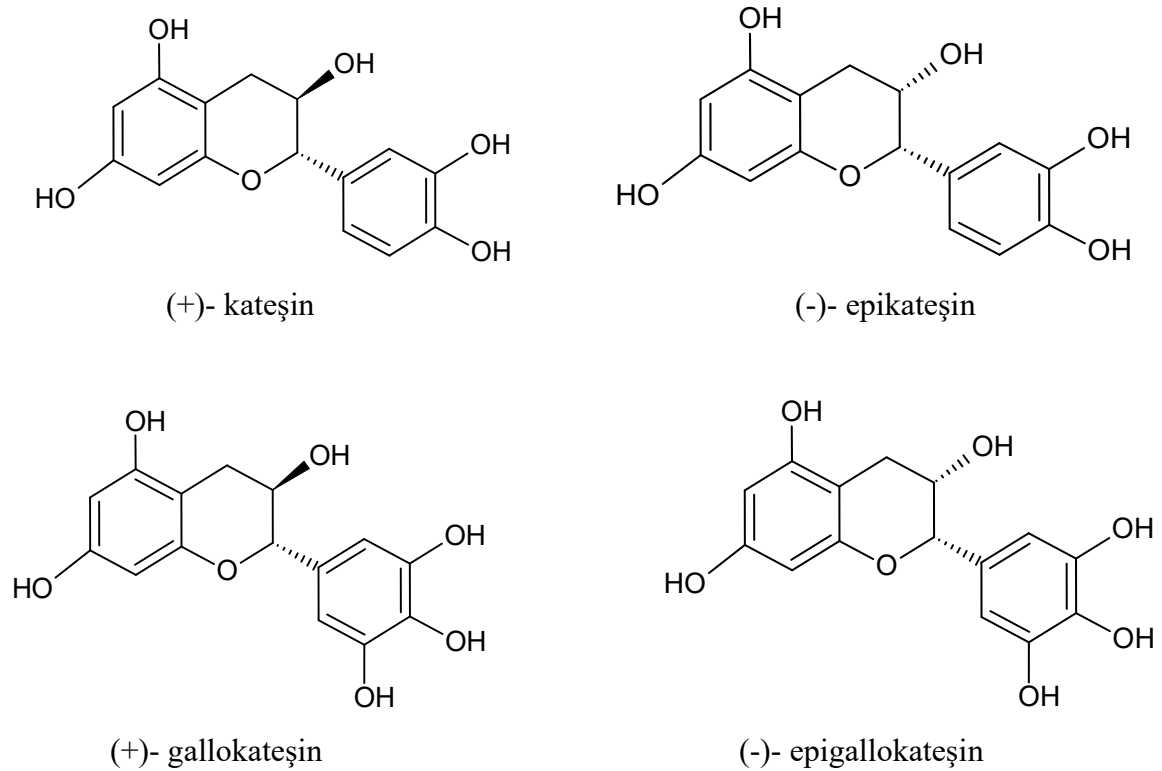
Narinjin (naringenin-7-*O*-neohesperidozit)

Şekil 1.19: Bazı flavanon bileşiklerinin kimyasal yapısı

1.5.1.5 Flavan-3-ol

Flavan-3-oller, flavonoidlerin en karmaşık alt sınıfını oluşturur (Crozier et al., 2006). Flavan-3-ol veya yaygın adıyla kateşin olarak da bilinen bileşikler, flavanol yapısının C3 pozisyonunda bir hidroksil grubu (–OH) bulundurmasıyla karakterize edilir (Özcan, 2008). Bu sınıf, basit monomerler olan (+)-kateşin ve onun izomeri (–)-epikateşin'den, aynı zamanda kondanse tanenler olarak da bilinen oligomerik ve polimerik proantosiyaniidinlere kadar uzanır (Crozier et al., 2006).

Flavonlar, flavonoller, izoflavonlar ve antosiyaniidinler gibi düzlemsel moleküllerin aksine, flavan-3-oller, proantosiyaniidinler (flavan-3,4- dioller) ve flavanonlar heterosiklik C- halkasında doymuş bir C3 elementi içerirler ve bu nedenle düzlemsel olmayan yapılardır. Flavan-3-ollerin C2 ve C3 pozisyonlarındaki iki kiral merkez, B-halkası hidroksilasyonunun her seviyesi için dört izomer üretir. Bunlardan (+)-kateşin ve (–)-epikateşin doğada yaygın olarak bulunurken, (–)-kateşin ve (+)-epikateşin nispeten nadirdir. Oligomerik ve polimerik proantosiyaniidinler ise C4'te ek bir kiral merkeze sahiptir (Crozier et al., 2006).

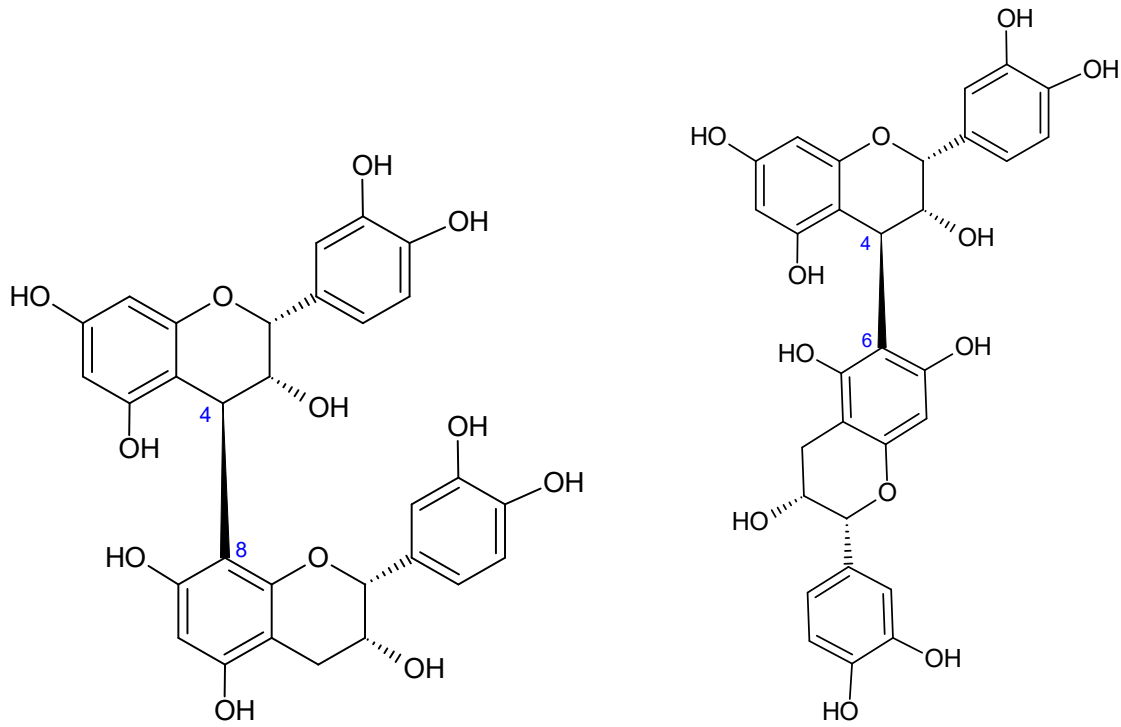


Şekil 1.20: Kateşin ve türevlerinin kimyasal yapısı

1.5.1.5.1 Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)

Bitkisel tanenler, fenolik metabolitlerin en önemli grupları arasında yer alır. Bu bileşiklerin bir alt grubu olan kondanse tanenler (aynı zamanda proantosiyanidinler olarak da adlandırılır), polihidroksi flavan-3-ol birimlerinin C-C bağları aracılığıyla bağlanmasıyla oluşan oligomerik ve polimerik yapıları kapsar (Özcan, 2008). B Tipi proantosiyanidinler, en basit ve en yaygın proantosiyanidinler olup, genellikle (+)-kateşin ve (–)-epikateşin monomerlerinin katılımıyla oluşur; oksidatif bağlanma reaksiyonu, bir heterosiklin C-4 atomu ile bitişik ünitenin C-6 veya C-8 pozisyonları arasında meydana gelerek oligomer ve polimer zincirlerini oluşturur (Crozier et al., 2006). Şekil 21’de Proantosiyanidin B1 ve Proantosiyanidin B5 yapıları örnek olarak gösterilmiştir.

Yüksek molekül ağırlığına sahip bu yapılar, karbonhidratlar ve proteinler ile güçlü kompleksler oluşturma yeteneğine sahiptirler (Özcan, 2008).



Proantosiyanidin B1

Proantosiyanidin B5

Şekil 1.21: Dimerik proantosiyanidinlerin kimyasal yapıları

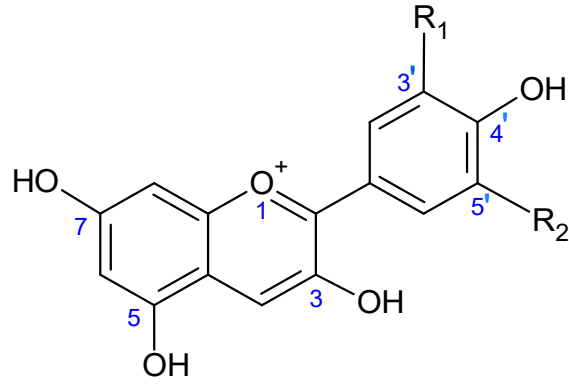
1.5.1.6 Antosiyanidinler

Antosiyanidinler, esas olarak konjuge türevleri olan antosiyaninler şeklinde, bitki aleminde yaygın olarak dağılmıştır. Antosiyaninler, yaprak mezofil hücrelerini gölgeleyerek bitkileri aşırı ışıktan korumada görev alır ve aynı zamanda tozlaşma yapan böcekleri çekmede de önemli bir role sahiptirler. Bu bileşikler, özellikle meyve ve çiçek dokularında belirgin olup, buralarda kırmızı, mavi ve mor renklerden sorumludur. Ayrıca yapraklarda, saplarda, tohumlarda ve kök dokusunda da bulunurlar (Crozier et al., 2006). Bu pigmentlerin rengi pH değerine bağlıdır: Asidik koşullarda antosiyanin kırmızı pigment olarak görünürken, alkali koşullarda mavi pigmentli antosiyanin bulunur. Kırmızı çiçeklere örnek olarak; kırmızı hibiskus, kırmızı gül, kırmızı ananas adaçayı, kırmızı yonca ve pembe çiçeği verilebilir. Bu kırmızı çiçekler yenilebilir niteliktedir. Mavi çiçekler (mavi peygamber çiçeği, mavi hindiba ve mavi biberiye) ve mor çiçekler (mor nane, mor çarkıfelek, mor adaçayı, sıradan menekşe ve lavanta) ise yaygın yenilebilir çiçeklerdir (Khoo et al., 2017).

Bu çiçeklerin bazıları geleneksel olarak halk tıbbında, renklendirici olarak ve gıda olarak kullanılmıştır. Geleneksel kullanıma ek olarak, kırmızı, mor ve mavi renkli meyveler de faydalı etkileri nedeniyle yaygın olarak tüketilmektedir. Yemişler (çilek, böğürtlen vb.), frenk üzümü ve diğer kırmızıdan maviye dönen renkli meyvelerden elde edilen antosiyanin pigmentleri güçlü antioksidanlardır. Ayrıca, antosiyanin açısından zengin olan siyah havuç, kırmızı lahana ve mor patates gibi besinler, hastalıkların önlenmesi amacıyla tüketilen potansiyel fonksiyonel gıdalardır (Khoo et al., 2017).

Şekil 1.15'te gösterildiği gibi antosiyanin, temel flavonoid yapısının C-halkasındaki oksijen atomunda pozitif yüke sahip olmasına rağmen, flavonoidlerden biri olarak kabul edilir. Aynı zamanda flavilyum (2-fenilkromenilyum) iyonu olarak da adlandırılır (Khoo et al., 2017).

En yaygın antosiyanidin yapıları, Şekil 1.22'de gösterildiği gibi pelargonidin, siyanidin, delfinidin, peonidin, petunidin ve malvidin'dir. Konjugasyon C3, C5, C7, C3' ve C5' karbonlarında gerçekleşebilse de en sık olarak C3'te meydana gelir (Crozier et al., 2006).



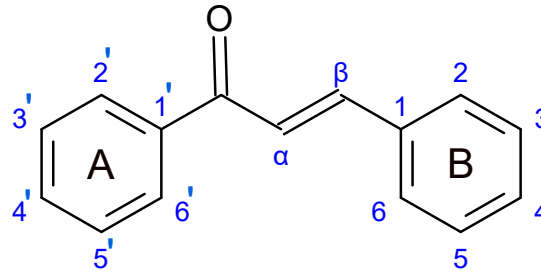
Antosiyanidin	R ₁	R ₂
pelargonidin	H	H
siyanidin,	OH	H
delfinidin	OH	OH
peonidin	OCH ₃	H
petunidin	OCH ₃	OH
malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Şekil 1.22: Başlıca antosiyanidinlerin yapıları

1.5.1.7 Şalkonlar

Flavonoid ve izoflavonoidlerin biyosentetik öncüsü olarak kabul edilen şalkonlar; meyve, sebze, baharat ve çiçek gibi pek çok doğal kaynağın yanı sıra bitkilerin odunsu kısımlarında, kabuk ve köklerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bileşikler bitki bünyesinde, 'şalkon izomeras' enziminin katalizlediği spesifik bir reaksiyonla (2S)-flavonlara dönüştürülürler. Doğada genellikle flavonlar ile birlikte bulunan bu maddeler, tozlaştırıcıları çekmek için pigment görevi üstlenmekte veya flavonoidlere benzer şekilde bitkiyi böcek ve parazitlere karşı korumaktadırlar. Kristal yapıda olan bu sekonder metabolitler; sarı, turuncu ve kahverengi arasında değişen geniş bir renk yelpazesine sahiptirler (Kale, 2022).

Şekil 1.15 'te gösterildiği gibi şalkonlar, temel olarak iki fenil halkasını birbirine bağlayan üç karbonlu bir α,β -doymamış karbonil sisteminden meydana gelen, açık zincirli 1,3-difenilprop-2-en-1-on iskeletine sahip bileşiklerdir. Şalkon yapısında pozisyonların numaralandırılması ile flavonoid yapısındaki numaralandırma arasında temel bir fark bulunmaktadır. Şalkonda mevcut olan aromatik halkalar A ve B halkası olarak adlandırılır; ancak flavonoidlerin aksine, burada A halkası üssü (') işaretli rakamlarla, B halkası ise üssü işareti içermeyen rakamlarla tanımlanmaktadır (Şekil 1. 23) (Rammohan et al,2020).



Şekil 1.23: Şalkonların sistematik numaralandırılması

1.6 Biyolojik Aktivite Çalışmaları Hakkında Genel Bilgiler

1.6.1 Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip kimyasal türlerdir. Kaçınılmaz olarak kararsız ve reaktiftirler. En basit serbest radikal, bir proton ve tek bir eşleşmemiş elektron içeren bir hidrojen atomudur. Bir serbest radikal oluştuğunda, farklı etkileşimler yoluyla başka bir radikal veya molekül ile reaksiyona girme yeteneğine sahiptir. Canlı organizmalar için önemli serbest radikal türlerine örnek olarak hidroksil (-OH), süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$), nitrik oksit ($\text{NO}^{\cdot}$), ve peroksil ($\text{RO}_2^{\cdot}$) verilebilir (Çelik, 2017).

Oksidatif stres ise vücuttaki serbest radikaller ile bu radikalleri nötralize eden antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması durumudur. Bu koşullar altında, insan vücudundaki oksidatif stresin üstesinden gelmenin anahtarı, temel olarak antioksidanlar yoluyla hücresel savunmayı güçlendirmektir (Çelik, 2017).

Antioksidanlar, diğer moleküllerin yükseltgenme hızını yavaşlatma veya bu süreci tamamen durdurma yeteneğine sahip bileşiklerdir. Canlı organizmada serbest radikallerle etkileşime girerek otooksidasyonu baskılayan bu maddeler, biyolojik savunma mekanizmasının ayrılmaz bir parçasıdır. Yaşamın sürdürülebilirliği için vazgeçilmez bir element olan oksijen, ne var ki dejeneratif süreçlerin ve pek çok kronik rahatsızlığın da temel tetikleyicilerinden biri olarak görülmektedir. Reaktif oksijen ara ürünlerinden kaynaklanan radikaller oldukça kararsızdır ve canlı sistemlerdeki diğer bileşikler ve gruplarla hızla reaksiyona girme eğilimindedir. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan yeni ve zararlı ürünler, hücre yıkımına, yaşlanmaya, hücre ölümüne ve çeşitli hastalıklara yol açabilir (Özer Sağır, 2016).

Oksidasyon, en temel tanımıyla bir atom veya molekülden elektron kopmasıyla sonuçlanan kimyasal bir süreçtir. Hücresel düzeyde hasara ve hatta hücre ölümüne yol açabilen serbest radikaller, tetikledikleri zincirleme reaksiyonlar aracılığıyla bu tahribatı gerçekleştirirler. Antioksidanlar ise bu zararlı döngüyü kırarak serbest radikalleri elimine ederler. Antioksidanlar bu süreci, polifenoller, askorbik asit veya tiyoller gibi indirgeyici bileşikler üzerinden kendilerini okside ederek sonlandırırlar (Yılmaz, 2018).

İnsan vücudu kendi içinde çeşitli antioksidanlar üretebilme yeteneğine sahip olsa da yine de vücudun kendisinin üretemediği antioksidanlara düzenli olarak gıdalar yoluyla ihtiyaç duymaktadır (Çelik, 2017). Beslenme yoluyla vücuda alınan antioksidan savunma öğeleri arasında başlıca rolü A, C, E vitaminleri ile selenyum üstlenmektedir (Yılmaz, 2018).

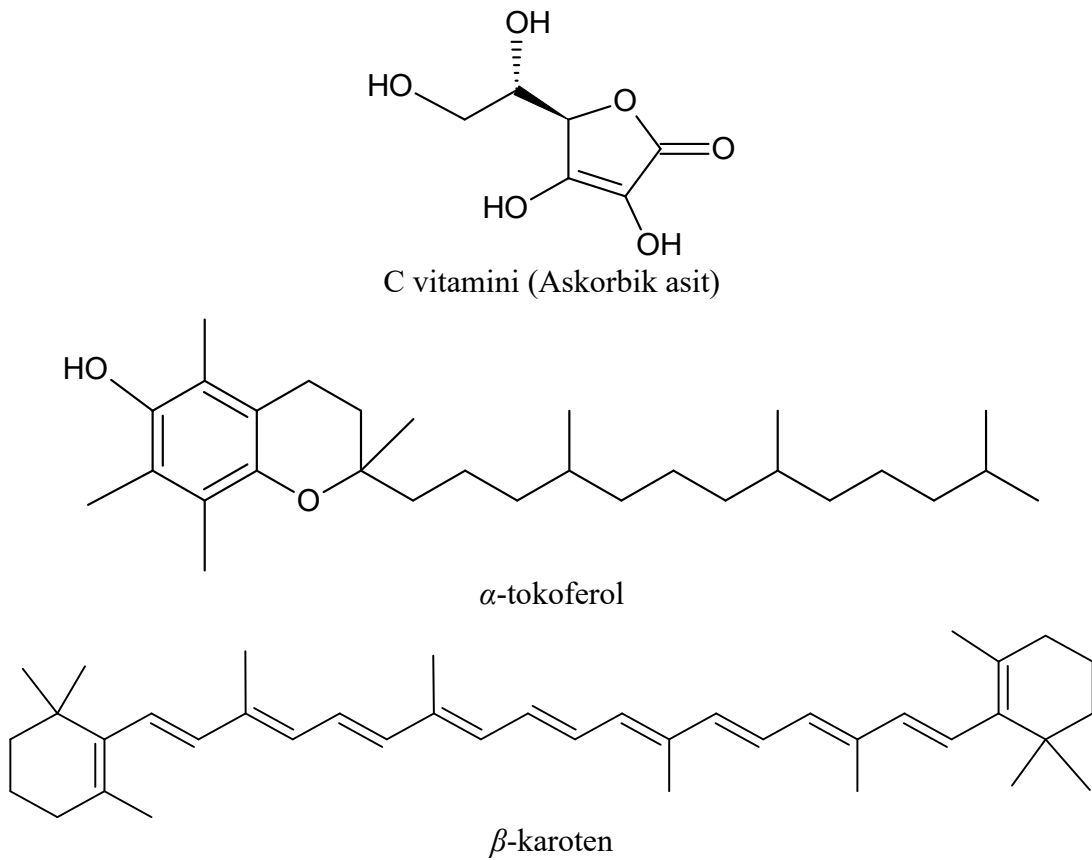
Antioksidanlar, oksidanları başlıca dört farklı yöntemle inaktive ederek hücresel hasarı önlerler:

1. Söndürme (Quenching): Bu mekanizmada antioksidan, oksidan moleküle bir hidrojen atomu aktararak onu etkisiz hale getirir. Flavonoidler, bazı vitaminler, trimetazidin ve mannitol bu yöntemle işlev görür.
2. Süpürme (Scavenging): Antioksidanlar, reaktif oksidanları daha az zararlı veya daha zayıf yeni moleküllere dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve bazı mikromoleküller bu etki şekline örnek gösterilebilir.
3. Zincir Reaksiyonlarını Kırma (Chain Breaking): Antioksidanlar, oksidatif zincir reaksiyonlarının devamını durdurur. Örneğin, hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metaller, oksidanları kendilerine bağlayarak veya şelatlayarak onları reaksiyon döngüsünden çıkarır ve etkisiz hale getirir.
4. Onarım (Repair): Bu mekanizma, oksidatif hasara uğramış olan biyomolekülleri (örneğin DNA veya proteinleri) onarma ve eski haline getirme yeteneğini içerir (Özer Sağır, 2016).

1.6.1.1 Antioksidanların Sınıflandırılması

1.6.1.1.1 Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar, bitkilerin biyosentez mekanizmaları aracılığıyla ürettiği bileşiklerdir. Başlıca doğal antioksidan türlerine; vitaminler, fenolik bileşikler, glutatyonlar, flavonoidler ve karotenoidler örnek gösterilebilir. Doğal antioksidan bileşikleri, bitkilerin çeşitli kısımlarında (sebzeler, tohumlar, yapraklar, çiçekler ve kökler) ve ayrıca kabuklu veya kabuksuz meyvelerde yoğun olarak bulunur (Yılmaz, 2018). Şekil 1.24'te doğal antioksidanlara örnek olarak C vitamini (Askorbik asit), E vitamini (α -tokoferol) ve β -karoten yapıları gösterilmiştir.



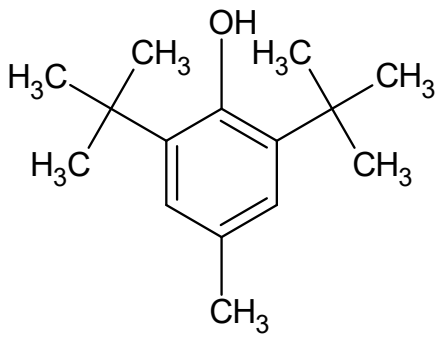
Şekil 1.24: Bazı doğal antioksidanların kimyasal yapısı

1.6.1.1.2 Sentetik Antioksidanlar

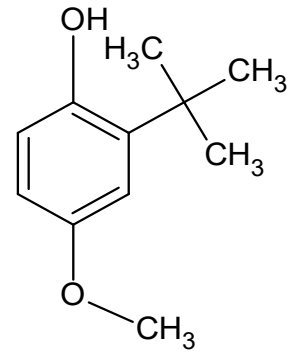
Bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT), bütillenmiş hidroksi anizol (BHA), tersiyer bütill hidrokinon (TBHQ), propil gallat (PG) ve troloks, yaygın biçimde kullanılan başlıca sentetik antioksidanlardır (Yılmaz, 2018).

Bu sentetik bileşiklerin kullanım alanları oldukça geniştir:

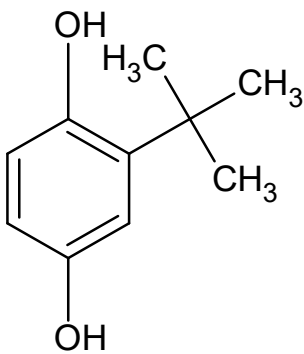
- Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT): Kauçuk, ilaç ve kozmetik sanayileri gibi alanlarda kullanılır.
 - Bütillenmiş hidroksi anizol (BHA): E320 gıda katkı maddesi ve koruyucu olarak kullanımı yaygındır.
 - Tersiyer bütıl hidrokinon (TBHQ): E319 koduyla bilinen bu antioksidan, doymamış bitkisel ve hayvansal yağlarda, depolama sürecinde meydana gelebilecek bozulmaları geciktirmek amacıyla tercih edilir.
 - Propil gallat (PG): E310 olarak da tanınan PG, kozmetik, saç ürünleri, yapıştırıcılar ve çeşitli yağlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Yılmaz, 2018).
- Şekil 1.25'te sentetik antioksidanlara örnekler gösterilmiştir.



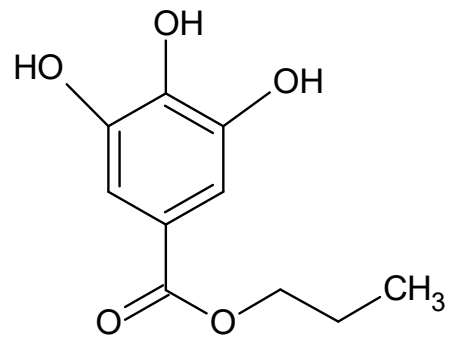
BHT (bütillenmiş hidroksi toluen)



BHA (bütillenmiş hidroksi anizol)



TBHQ (tersiyer butil hidrokinon)



PG (propil gallat)

Şekil 1.25: Bazı sentetik antioksidanların kimyasal yapısı

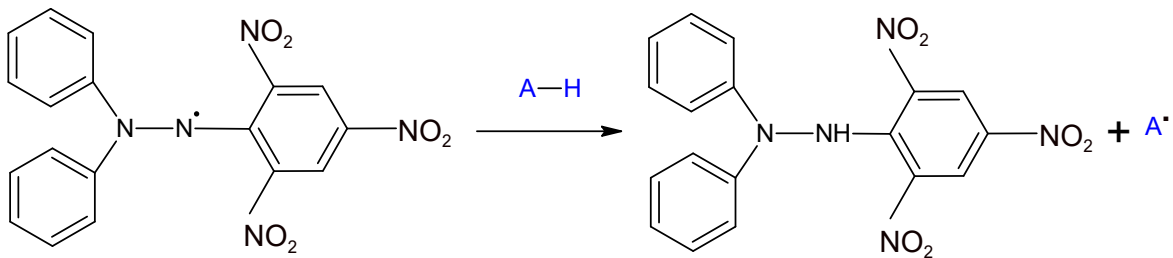
1.6.2 Kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemleri

1.6.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) ticari olarak temin edilebilen ve kararlı yapısıyla bilinen bir organik nitrojen radikali türüdür (Albayrak vd., 2010). DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) radikal giderim (süpürme) kapasitesi analiz yöntemleri, doğal ekstraktların antioksidan gücünü belirlemek amacıyla sıklıkla başvurulmuş bir metottur. Bu analiz, antioksidan bileşikler tarafından gerçekleştirilen bir redoks reaksiyonu sonucunda DPPH radikalinin nötralize edilmesi (süpürülmesi) ilkesine dayanır (Özer Sağır, 2016).

DPPH radikali, 517 nm dalga boyunda maksimum absorptans gösterir (Çarıkçı, 2010). Moleküler yapısındaki bir serbest elektronun yer değıştirmesi, koyu menekşe renginin oluşmasına neden olur. DPPH çözeltisi, hidrojen atomu verebilen bir bileşikle (yani bir antioksidan ile) karıştırıldığında, bu koyu menekşe rengi kaybolur ve radikal indirgenmiş (stabil) forma dönüşür (Albayrak vd., 2010).

Bir antioksidan (A-H) tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu gerçekleştiğinde, bu durum 517 nm dalga boyundaki absorptansın azalmasına yol açar. Bu süreç, görünür bölge spektrofotometresi kullanılarak, reaksiyon tamamlanana kadar takip edilir (Albayrak vd., 2010).



Şekil 1.26: DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve bir antioksidan ile reaksiyonu

Şekil 1.26’da DPPH radikalinin bir antioksidan ile reaksiyonu görülmektedir. Reaksiyon sonucunda oluşan DPPH-H, molekülün indirgenmiş formunu temsil eder. Bu süreçte, antioksidanın kendisi ilk adımda bir serbest radikal (A·) oluşturur. Oluşan bu yeni radikal ise daha sonraki aşamalarda başka reaksiyonlara katılma potansiyeline sahiptir (Albayrak vd., 2010).

1.6.2.2 Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi (CUPRAC) Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Bu analiz yöntemi, temelde numunedeki antioksidanlar vasıtasıyla bakır (II) iyonlarının (Cu^{+2}) bakır(I) iyonlarına (Cu^+) indirgenmesi ilkesine dayanır. 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc) ile Cu^{+2} iyonlarının oluşturduğu bakır (II)-neokuproin kompleksi $[\text{Cu (II)-Nc}]$ antioksidanlar tarafından indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasitesi hesaplanır. Bu indirgenme sonucunda, 450 nm dalga boyunda maksimum absorbands veren bakır(I) neokuproin şelatı $[\text{Cu (I)-Nc}]$ oluşur (Büyüktuncel, 2013).

CUPRAC yöntemi, antioksidan kapasite belirleme teknikleri arasında oldukça hızlı bir analiz metodu olmasıyla öne çıkar ve genellikle yalnızca 10 dakikalık bir süre gerektirir. Yöntemin uygulama süresi, analiz edilen molekülün yapısına göre farklılık gösterir. Örneğin, ürik asit, askorbik asit, gallik asit ve kuersetin gibi nispeten basit yapılı moleküller için sonuçlar birkaç dakika gibi kısa bir sürede alınabilirken, daha kompleks moleküllerin analizi 30 ila 60 dakika sürebilmektedir. Hızının yanı sıra, bu yöntemin bir diğer önemli avantajı, kullanılan ayıraçların ucuz olması ve laboratuvarlarda kolayca uygulanabilir olmasıdır (Albayrak vd., 2010).

1.6.2.3 Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Bu yöntem temel olarak, antioksidan bileşenlerin varlığında ferrik-TPTZ [Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin] kompleksinin ferro-TPTZ (Fe^{2+} -TPTZ) formuna indirgenmesi prensibine dayanır. Bu indirgenme mekanizması sırasında ortaya çıkan Fe^{2+} iyonlarının ligand ile koordinasyon kompleksi oluşturması, reaksiyon ortamında koyu lacivert bir renk değişimine neden olur. Çözeltideki bu renk dönüşümünün derecesi ile indirgenen demir miktarı, spektrofotometrik olarak 593 nm dalga boyunda ölçülen absorbands değerleri üzerinden tayin edilir ve elde edilen veriler doğrudan numunenin antioksidan kapasitesini yansıtır (Xiao ve ark., 2020). Reaksiyonun kararlı bir şekilde yürütülebilmesi için FRAP analizi asidik koşullarında (pH 3.6) gerçekleştirilmektedir (Bibi Sadeer ve ark., 2020).

Bu yöntem; kolay uygulanması, her denemede benzer ve güvenilir sonuçlar vermesi ve pahalı cihazlara ihtiyaç duymadan her laboratuvar da rahatça yapılabilmesi gibi avantajları nedeniyle antioksidan kapasite testlerinde sıkça tercih edilmektedir (Bibi Sadeer ve ark., 2020).

1.7 Antimikrobiyal Aktivite

Günümüzde bitkisel kaynaklı hammadde ve ilaçlar, reçeteli ilaçların yaklaşık %25'ini temsil etmeye devam etmektedir. Son yıllarda sentetik ilaçların bazı enfeksiyonlara karşı beklenen etkiyi gösterememesi ve çeşitli yan etkilerinin saptanması, doğal kaynaklı bileşenlerin araştırılma gerekliliğini artırmıştır. Özellikle direnç kazanan mikroorganizmalarla mücadelede yeni çözüm yolları aranması, bitkilerin antimikrobiyal potansiyelini modern tıbbın önemli bir ilgi alanı haline getirmiştir. Bu bağlamda birçok bitki türü, içerdikleri biyoaktif maddeler aracılığıyla mikrobiyolojik ve farmakolojik açılardan çok yönlü olarak incelenmektedir (Kırbağ ve Zengin, 2006). Doğal içeriklerin kullanımıyla patojen mikroorganizmalara karşı etkili olan bitki türlerinin belirlenmesi ve bu türlerdeki etken maddelerin tespit edilmesi, günümüzde üzerinde yoğunlaşılan temel bilimsel alanlardan biri olmuştur (Ertürk vd.,2010).

Söz konusu potansiyel aktif bileşenlerin, birbirinden farklı hücresel yapılara ve karakteristik özelliklere sahip mikrobiyal patojenler üzerinde meydana getirdiği biyolojik ve fizyolojik etkileri derinlemesine ve çok yönlü bir biçimde analiz etmek amacıyla, günümüz bilimsel çalışmalarında oldukça geniş bir yelpazeye yayılan çeşitli tarama ve test metodolojileri etkin olarak kullanılmaktadır. Bu modern yaklaşımların ve deneysel süreçlerin temel odağını oluşturan antimikrobiyal aktivite analizleri; laboratuvar ortamında test edilmek üzere seçilen herhangi bir sentetik kimyasal ajanın, izole edilmiş bileşiğin veya bitkisel kaynaklı doğal ekstraktların, hedef olarak belirlenen spesifik bakteri suşlarının gelişimi, çoğalması ya da hayatta kalması üzerindeki baskılayıcı etkinliğini yapay laboratuvar koşullarında (in vitro) somut verilerle ortaya koymak amacıyla tatbik edilmektedir (Yılmaz, 2018).

Yürütülen bu antimikrobiyal aktivite çalışmalarında yararlanılan mikroorganizmalar aşağıda sunulmuştur.

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Aspergillus parasiticus*
- *Penicilium chysogenum*

L.viscosa bitkisinden elde edilen bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla Disk Difüzyon Yöntemi kullanılmıştır (Irkin vd., 2021; Karaman vd., 2003; Benkeblia, 2004). Bu yöntem, bitki ekstraktlarının antimikrobiyal potansiyellerini belirlemek amacıyla kullanılan; basitliği, pratikliği ve yüksek standardizasyon kabiliyetiyle öne çıkan temel bir yöntemdir (Biemer, 1973). Bu yöntemin temel prensibi, test edilecek bitki ekstraktlarının emdirildiği steril kağıt disklerin, hedef mikroorganizmanın homojen bir şekilde yayıldığı katı besiyeri (agar) yüzeyine yerleştirilmesine dayanır (Yılmaz, 2018).

İnkübasyon sürecinde, disk üzerindeki aktif bileşenler agara doğru dairesel bir şekilde difüze olurken, mikroorganizmalar da besiyeri yüzeyinde çoğalmaya başlar. Eğer kullanılan ekstrakt mikroorganizma üzerinde inhibitör (engelleme) bir etkiye sahipse, diskin etrafında mikroorganizmanın üreyemediği şeffaf bir alan oluşur. "İnhibisyon zonu" olarak adlandırılan bu bölgenin genişliği, test edilen maddenin etkinliği ile doğrudan ilişkilidir. İnkübasyon sonunda bu zonların çapları milimetrik olarak ölçülür ve elde edilen veriler standart referans değerlerle karşılaştırılarak mikroorganizmanın ilgili ekstraktlara karşı duyarlılığı (duyarlı, orta duyarlı veya dirençli şeklinde) tayin edilir (Yılmaz, 2018).

1.8 Folin-Ciocalteu Ayracı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi

Fenolik analiz alanında, Folin-Ciocalteu analizi başlangıçta şarap çalışmaları için uygulanmış olsa da basitliği ve tekrarlanabilirliği sayesinde zamanla çok çeşitli gıdalarda ve biyolojik örneklerde fenolik bileşikler belirlemek ve miktarlarını ölçmek için referans yöntem haline gelmiştir (Pérez et al, 2023).

Folin-Ciocalteu (FCR) yöntemi, fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşikler tarafından, reaktifteki molibdenyum iyonlarına elektron transferi yapılması esasına dayanır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan mavi renkli kompleks, 750-765 nm dalga boyları arasında spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu dalga boyundaki absorpsiyon şiddeti, fenolik bileşiklerin derişimiyle orantılıdır. Yöntemde standart madde olarak çoğunlukla gallik asit tercih edilir ve analiz sonuçları gallik asit eşdeğeri (mg/L yada mg/kg) üzerinden hesaplanmaktadır (Albayrak vd., 2010). Fenolik bileşikler, FCR ile yalnızca bazik koşullar altında reaksiyon verirler. Bu durum, çözeltinin genellikle sodyum karbonat eklenerek pH değerinin 10'a ayarlanmasıyla sağlanır (Özer Sağır, 2016; Waterhouse, 2002).

FCR yöntemi, son yıllarda toplam indirgeyici kapasitenin ölçülmesinde etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntemin sonuçları, diğer popüler antioksidan kapasite belirleme yöntemleri ile ilişkili bulunmuştur. FCR yöntemi, toplam fenol içeriğinin belirlenmesinde güvenilir, basit ve tekrarlanabilir sonuçlar sunmasına rağmen, bazı dezavantajlara sahiptir: Yöntemin zaman alması, onu rutin ve yüksek hacimli analizler için uygun olmaktan çıkarmaktadır. Aynı zamanda, analizin sulu fazda gerçekleştirilmesi nedeniyle, yağda çözünen (lipofilik) antioksidan bileşiklerin ölçümü için uygulanamamaktadır (Özer Sağır, 2016).

1.9 Toplam Antosiyanin Miktarı (TAC)

Antosiyanin pigmentleri, gıdaların renk kalitesi ve görsel özellikleri üzerinde doğrudan belirleyici bir role sahiptir. Bu bileşiklerin sahip olduğu potansiyel sağlık yararları, son yıllarda hem fonksiyonel gıdalardaki hem de nutrasötik ürünlerdeki antosiyanin içeriklerine yönelik bilimsel ve endüstriyel ilgiyi önemli ölçüde artırmıştır. Toplam antosiyanin pigment miktarı; meyve suları, takviye edici gıdalar ve doğal renklendiricilerin kalite kontrol süreçlerinde, ayrıca ticari satın alma standartlarının belirlenmesinde güvenilir bir kalite kriteri olarak kabul edilmektedir (Lee et al.,2005).

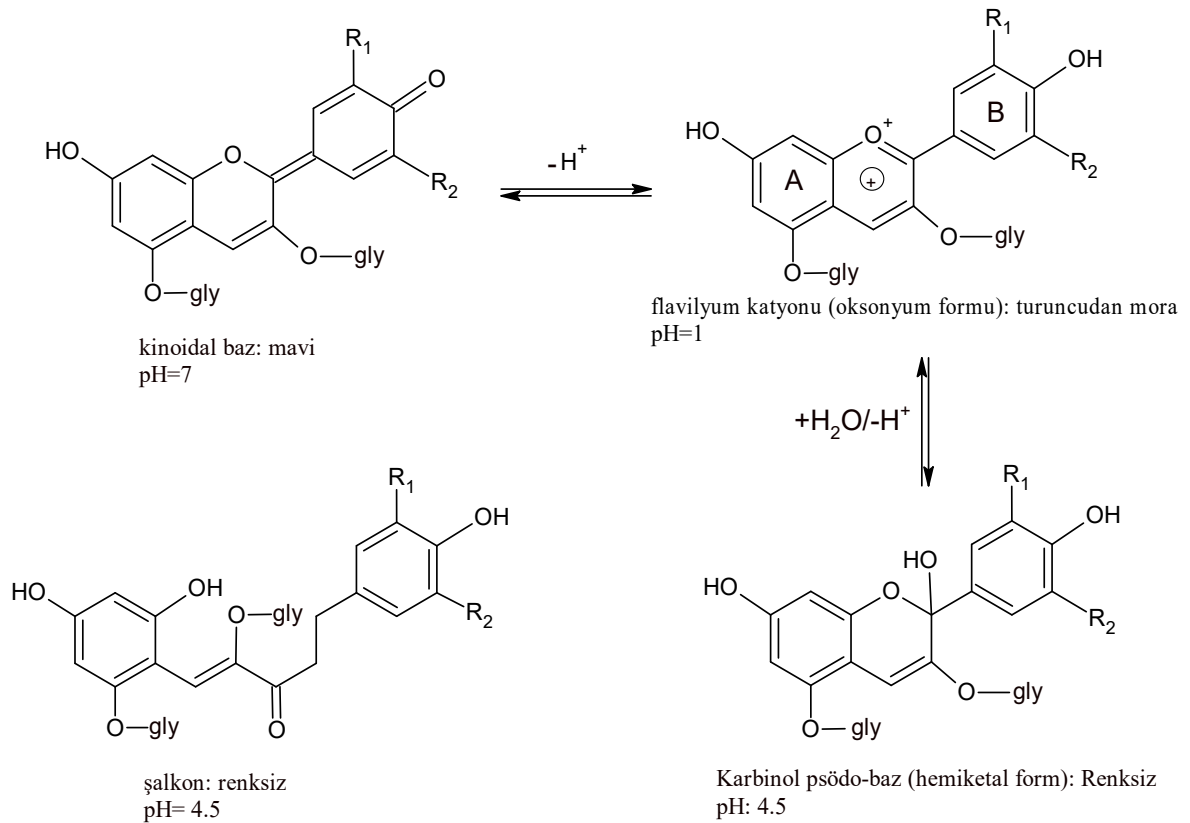
Toplam antosiyanin içeriği (TAC), pH-diferansiyel yöntemi ile belirlenmiştir. pH diferansiyel yöntemi ile antosiyanin pigment konsantrasyonunu belirlemenin geçerliliği ve temel ilkeleri, doğal ürün kimyagerleri tarafından yıllardır yaygın olarak kabul görmektedir (Lee et al.,2005).

Antosiyanin pigmentleri, ortamın pH değerine bağlı olarak geri dönüşümlü yapısal değişimlere uğrayan ve bu değişimleri belirgin farklılıktaki absorban spektrumları ile dışa vuran bileşiklerdir. Bu karakteristik özellik, "pH-diferansiyel yöntemi" olarak bilinen analiz tekniğinin temelini oluşturur (Sutharut ve Sudarat, 2012).

Yöntemin çalışma prensibi, antosiyanin kromoforunun farklı asitlik derecelerinde bulunduğu yapısal formlar arasındaki farka dayanmaktadır. pH 1.0 gibi oldukça asidik bir ortamda antosiyaninler, yoğun bir renk sergileyen oksonyum (flavilyum katyonu) formunda bulunurlar. Ancak ortamın asitliği azalıp pH 4.5 seviyesine ulaştığında, moleküler yapı değişerek renk sergilemeyen hemiketal forma dönüşür. Bu iki uç nokta arasındaki geçiş tamamen geri dönüşümlüdür (Lee et al.,2005; Sutharut and Sudarat, 2012).

Bir materyaldeki antosiyanin miktarını iki farklı pH değerindeki absorbans değişimine dayanarak ölçme kavramı, ilk kez 1948 yılında Sondheimer ve Kertesz tarafından ortaya atılmıştır. İlk çalışmalarda pH 2.0 ve 3.4 değerleri kullanılmış olsa da daha sonraki araştırmalar sonucunda yöntemin hassasiyetini artırmak adına pH 1.0 ve 4.5 değerlerinin kullanılması standart hale gelmiştir (Lee et al.,2005).

Bu yöntemde, pigmentin maksimum görünür dalga boyundaki (yaklaşık 520 nm) absorbans farkı, doğrudan pigment konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Elde edilen sonuçlar standart olarak siyanidin-3-glukozit eşdeğeri cinsinden ifade edilir. pH-diferansiyel yönteminin en büyük avantajı; polimerize olmuş bozulmuş pigmentlerin veya diğer engelleyici bileşiklerin ortamda bulunması durumunda bile, toplam monomerik antosiyanin içeriğinin hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesine olanak tanınmasıdır (Lee et al.,2005; Sutharut and Sudarat, 2012).



Şekil 1.27: Farklı pH seviyelerinde baskın olan antosiyanin yapısal formları

2. DENEYSEL BÖLÜM

2.1 Materyal

2.1.1 Bitki Materyali

I. viscosa (L.) Aiton çiçeklenme döneminden önce, gövde ve yaprak kısımları olmak üzere Ege Bölgesinde, Akhisar/ MANİSA- Hasköy bölgesinden (38°55'33.0"N, 27°55'35.3"E, Rakım: ~340 m) 10 kg kadar toplanmıştır. Toplanan bitki materyallerinin tanımlaması, Türkiye, Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Tuncay Dirmenci tarafından yapıldı.

2.1.2 Kimyasal Materyal

Bu çalışmada kullanılan tüm çözücüler ve reaktifler analitik saflıkta olup, laboratuvar standartlarına uygun şekilde hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinde n-hekzan (C_6H_{14}), petrol eteri (KN: 40-60 °C), kloroform ($CHCl_3$), diklorometan (CH_2Cl_2), aseton ($(CH_3)_2CO$), etil asetat ($CH_3COOC_2H_5$) ve metanol (CH_3OH) kullanılmıştır.

Kolon kromatografisi için Kieselgel 60G (0.063–0.200 mm, Merck) kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi (İTK) ve preparatif İTK işlemlerinde silikajel kaplı alüminyum plaklar (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) tercih edilmiştir.

Toplam fenolik madde tayininde kullanılan sodyum karbonattan (Na_2CO_3) doymuş çözelti hazırlanmış, Folin–Ciocalteu reaktifi hazır çözelti olarak temin edilmiştir. Toplam antosiyanin tayininde, sodyum asetat ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$, pH=4,5) ve potasyum klorür (KCl, pH=1) çözeltileri, pH ayarlamalarında %37'lik hidroklorik asit (HCl) kullanılmıştır.

DPPH ve CUPRAC aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler hazırlanmış olup, standart bileşikler olarak BHT (Butilhidroksitoluen), BHA (Butilhidroksianisol), Cvitamini, kurkumin ve α -tokoferol kullanılmıştır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Uçucu Yağ Eldesi

Uçucu yağların eldesi Şekil 2.1 gösterildiği üzere Clevenger tipi aparat kullanılarak hidrodestilasyon tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 150 gram kuru bitki 2 L'lik reaksiyon balonuna konuldu ve bitkinin üzerini örtecek kadar saf su ilave edilerek 4-6 saat boyunca hidrodestilasyona tabi tutuldu. Hidrodestilasyon işlemi tamamlandığında Clevenger aparatının ince boru hattında yoğunlaşarak biriken üst katmandan uçucu bileşenler izole edilirken, alt fazda kalan sulu kısım (hidrosol) da ayrı bir kapta toplanmıştır. Elde edilen her iki ürün +4 °C'de ve ışık almayan ortamda muhafaza edilmiştir.

Uçucu yağ ürünü, GC-MS analizine gönderilmek amacıyla uygun koşullarda saklanarak hazır hale getirilmiştir.



Şekil 2.1: Uçucu yağ elde etme düzeneği

2.2.2 Ekstraksiyon

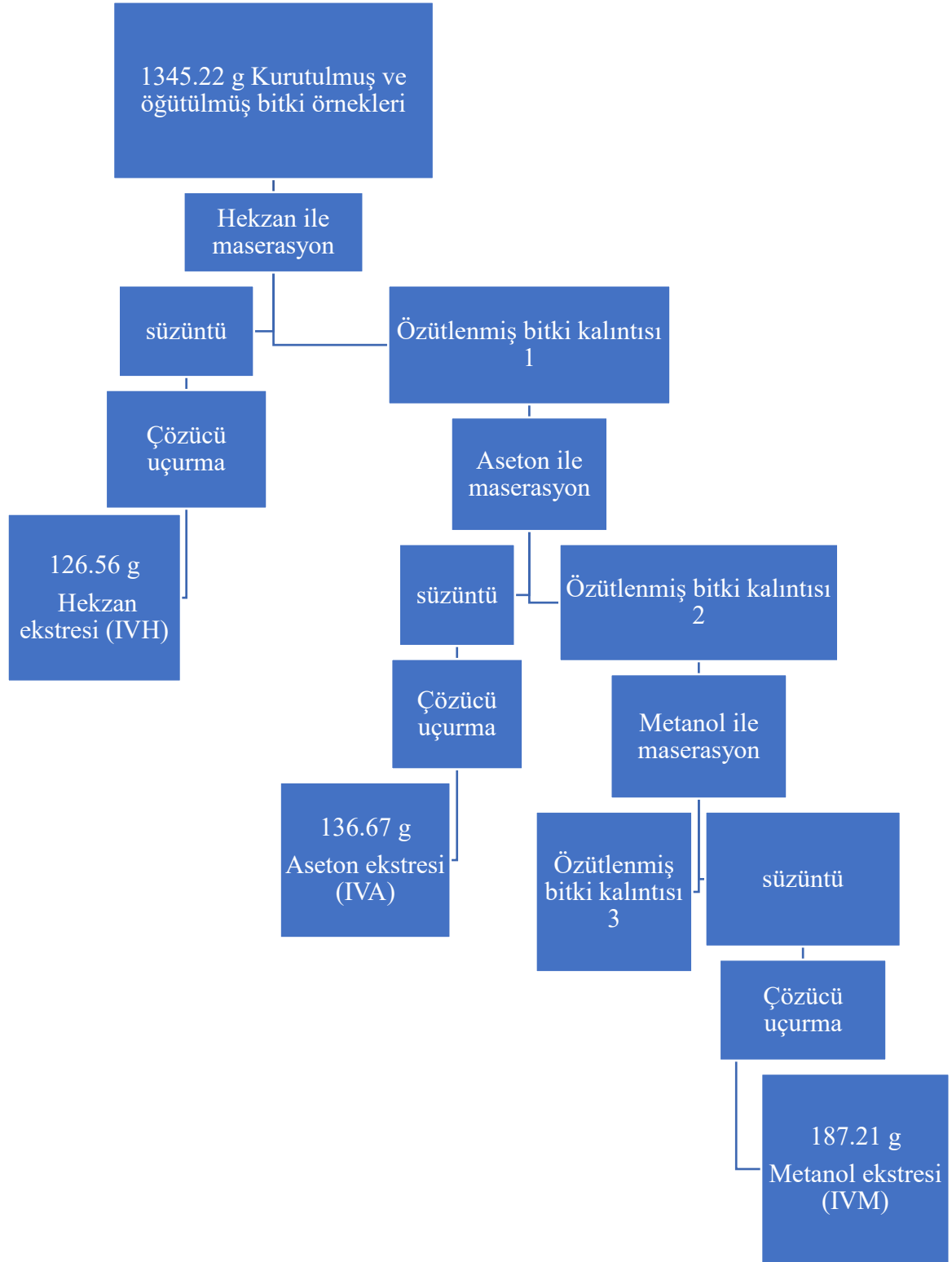
10 kg yaş olarak toplanan *I.viscosa* bitkisi, gölgede 15-20 gün süre kurutulup, gövde ve yaprakları öğütücü yardımı ile toz haline getirilmiştir. 10 kg olan yaş bitki, kurutulduğunda yaklaşık 3,75 kg olarak elde edilmiştir.

Bileşenlerin analizi için kurutulan bitkiden 1345.22 gram alınıp yeterli miktarda farklı polaritelere sahip çözücülerle (hekzan, aseton ve metanol) kapalı cam bir kapta önce sisteme hekzan ile başlanıp maserasyona tabi tutulmuş, 15 gün bekletildikten sonra süzülüp 1 gün kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan bitki kalıntısı bu kez aseton ile maserasyona tabi tutulup, 15 gün bekletildikten sonra süzülüp tekrar 1 gün kurumaya bırakılmıştır. Yine kuruyan bitki kalıntısı son olarak metanol ile maserasyona tabi tutularak, 15 gün bekletildikten sonra süzümüştür. Hekzan ile başlanıp maserasyona tabi tutulan bitki süzüntüsünün çözücüsü, çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktlar; *I. viscosa* hekzan ekstresi için IVH, aseton ekstresi için IVA ve metanol ekstresi için IVM kodları verilmiş ve sırasıyla 126.56 g, 136.67 g ve 187.21 g kuru ekstrakt elde edilmiştir. Uygulama adımları şematik olarak Şekil 2.2’te gösterilmiştir.

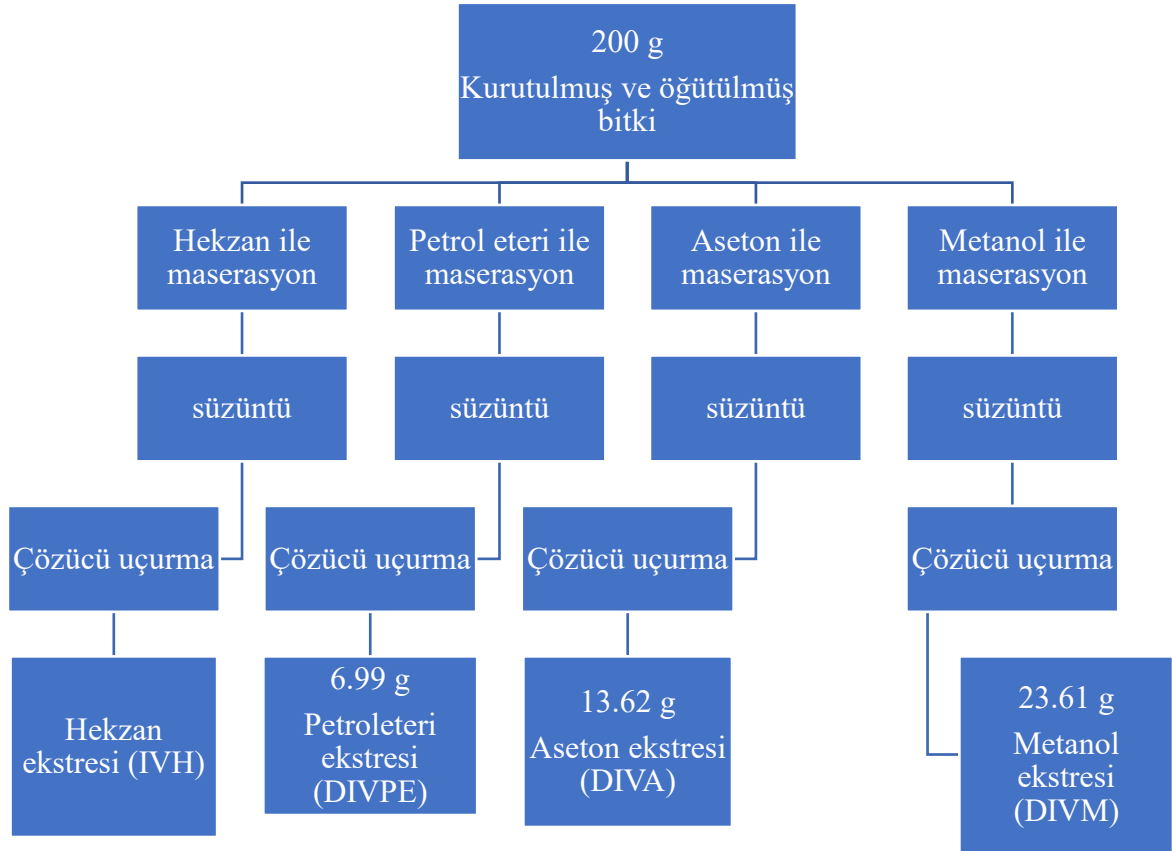
Ayrıca kurutulmuş ve öğütülmüş bitkiden 200’er g tartılarak ayrı ayrı petrol eteri, aseton ve metanol ile maserasyona tabi tutulmuş, 15 gün bekletildikten sonra süzülüp yine çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile çözücülerini uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ekstraktlar; *I. viscosa* petrol eteri ekstresi için DIVPE, aseton ekstresi için DIVA ve metanol ekstresi için DIVM kodları verilmiş ve sırasıyla 6.99 g, 13.62 g ve 23.61 g kuru ekstrakt elde edilmiştir. Bu ekstraksiyonun uygulama adımları şematik olarak Şekil 2.3’te gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan bitkilerin infüzyon ve dekoksasyon örnekleri, söz konusu yöntemlerin literatürdeki prensipleri esas alınarak hazırlanmıştır. İnfüzyon eldesi için 2 g bitki materyali, 98 mL distile kaynar su içerisinde 15 dakika süreyle bekletilmiştir. Dekoksasyon yöntemi için ise 2 g bitki materyali 98 mL distile suya eklenerek çelik bir ısıtıcı üzerinde ısıtılarak kaynadıktan sonra 15 dakika bekletilmiştir. Elde edilen her iki çay örneği külsüz filtre kâğıdı kullanılarak süzümüş; ardından elde edilen süzüntüler 25 mL distile su ilavesiyle seyreltilmiştir (Özer, 2019).

Toplamda 8 adet ekstre elde edilmiştir.



Şekil 2.2: Hekzan,aseton ve metanol ekstrelerinin hazırlanma şeması



Şekil 2.3: Direkt petrol eteri,aseton ve metanol ekstrelerinin hazırlanma şeması

2.2.3 Kromatografik Ayırma Teknikleri

2.2.3.1 Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi, elde edilen ekstreleri fraksiyonlarına ayırmak için kullanıldı.

Hekzan ekstresi ile kolon kromatografisine başlandı. Elde edilen ekstre bir miktar hekzanda iyice karıştırılarak çözüldü ve bu çözeltiye 0.040-0.060 (230-400 mesh E. Merck) partikül boyutuna sahip silikajel 60G (Merck 9385) ilavesi gerçekleştirilmiştir. Düşük basınç altında solventin evaporasyonu tamamlandıktan sonra numunenin silikajel üzerinde eşit dağılımını sağlamak için ekstre silikajelle iyice kurutulup toz haline getirildi.

Ekstrakt miktarına bağlı olarak seçilen kolonun alt kısmına küçük bir parça cam pamuğu yerleştirilmiş ve kolonun yaklaşık 2/3'ü silikajel ile doldurulmuştur. Daha sonra hazırlanan hekzan ekstresi, kolonun üst kısmına homojen bir şekilde eklenmiştir. Kolon kromatografisi hekzan ile başlatılmış ve kolona toplam 1000 mL hekzan uygulanmıştır. Kolonun alt kısmından çıkan fraksiyonlar, her biri 100 mL olacak şekilde cam erlenler yardımıyla toplanmıştır.

Ardından, çözücünün polaritesi artan oranlarda kloroform ilavesiyle kademeli olarak artırılmış ve fraksiyonlar yine 100 mL'lik hacimlerde toplanmıştır. Kloroform oranı %100'e ulaştıktan sonra aynı işlem sırasıyla aseton ve metanol çözücüleri için tekrarlanmıştır. Metanol oranı %100'e ulaşıncaya kadar yıkama işlemine devam edilmiş ve kolon kromatografisi bu aşamada sonlandırılmıştır.

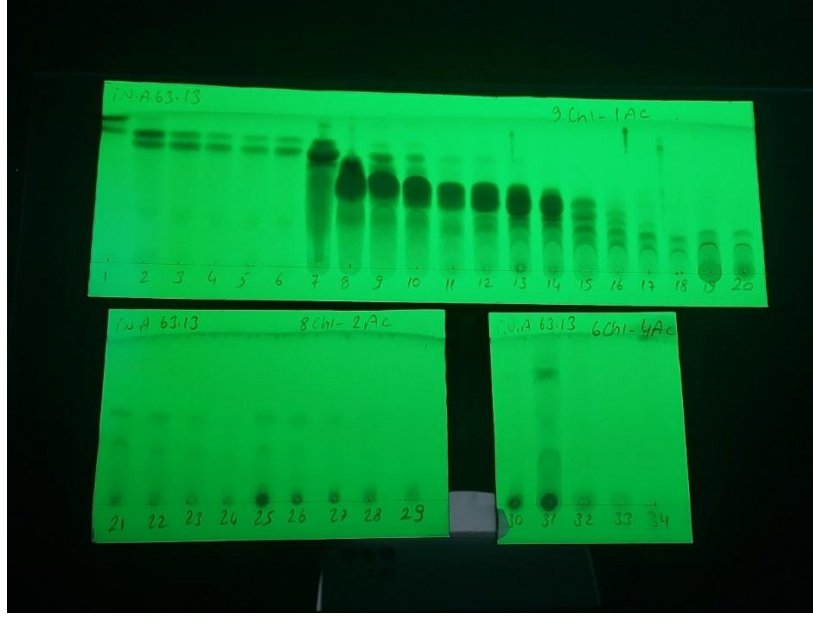
Aynı prosedür aseton ve metanol ekstraktları için de uygulanmış; her ekstrakt çözelti hâline getirilip silikajel ile karıştırılmış, kolon yaklaşık 2/3 silikajel ile doldurulduktan sonra ekstraktlar üst kısımdan ilave edilmiş ve fraksiyonlar artan polarite sırasına göre toplanmıştır.

Toplanan fraksiyonların çözücüsü ekstraksiyon yöntemi ile uzaklaştırılarak ekstraktlar elde edilmiş, bu ekstraktlar ince tabaka kromatografisi için ve daha ileri analizler yapılana kadar, ağzı kapatılarak +4 °C'de saklanmıştır. Elde edilen fraksiyon miktarına bağlı olarak ayrımı derinleştirmek amacıyla daha dar çaplı kolonlar tercih edilerek sabit faz sisteminde tekrar kolon kromatografisi yapılmıştır.

2.2.3.2 İnce Tabaka Kromatografisi

Çalışmamızda ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi sonucunda toplanan fraksiyonların bileşenlerini incelemek, benzer içerikli fraksiyonları belirleyerek birleştirmek ve ön saflaştırma yapmak amacıyla kullanılmıştır. Kolon kromatografisi sonucu toplanan fraksiyonlar, miktarlarına göre silika jel kaplı hazır alüminyum plakalar (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, Merck) üzerine uygulanarak uygun çözücü sistemlerinde yürütülmüştür. Elde edilen lekeler UV ışığı (254 nm) altında incelenmiştir. Daha sonra, plakalara serik sülfat belirteci püskürtülmüş ve 105 °C'deki etüvde ısıtılarak oluşan lekeler değerlendirilmiştir. Renk değişimleri dikkate alınarak benzer R_f değerine sahip fraksiyonlar birleştirilmiş ve bu işlem, kolon kromatografisinden elde edilen tüm fraksiyonlar analiz edilene kadar sürdürülmüştür.

Tüm ekstraktlardan elde edilen fraksiyonlara ait lekeler de benzer şekilde değerlendirilmiştir. İçerisinde birden fazla bileşen bulunduğu belirlenen fraksiyonlar, daha küçük boyutlu kolonlar kullanılarak yeniden ayrıştırma işlemi yapılmak üzere belirlenmiştir.



Şekil 2.4: Gerçekleştirilen fraksiyon takiplerine dair örnek TLC kromatogramları (IVA 63.13; UV 254 nm; Mobil faz: kloroform:aseton, 9:1, 8:2 ve 6:4

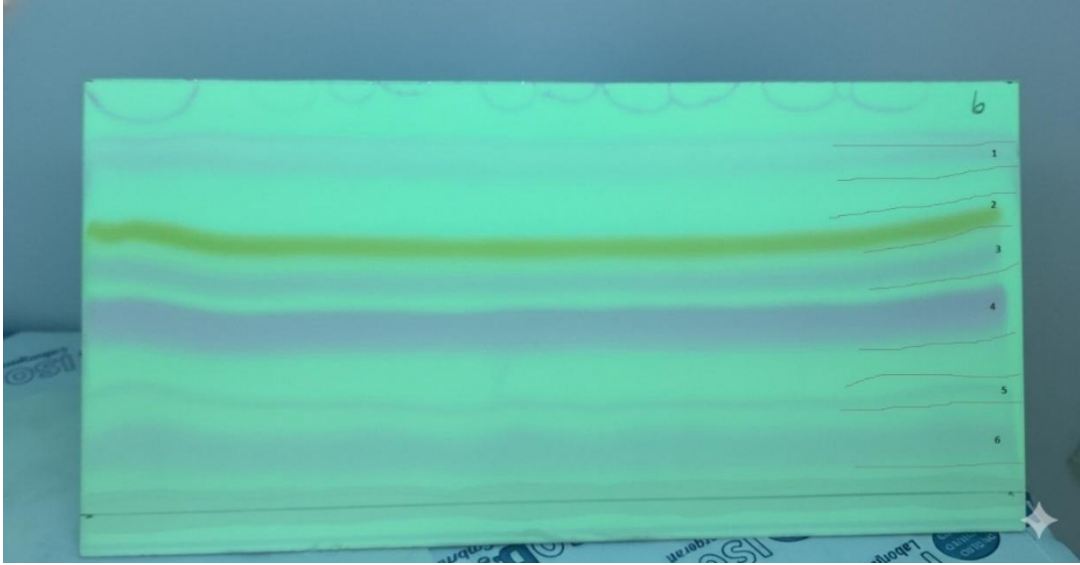
2.2.3.2.1 Serik Sülfat Çözeltilisinin Hazırlanması

Terpenlerin tespiti için seryum (IV) sülfat (serik sülfat) çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla, 10 g Seryum (IV) sülfat, 50 mL %98'lik sülfürik asit çözeltisinde çözüldükten sonra hacmi distile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Serik sülfat belirteci plakalara püskürtüldükten sonra, lekeler oluşana kadar yaklaşık beş dakika boyunca 105 °C'deki etüvde bekletildi.

2.2.3.3 Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Preparatif ince tabaka kromatografisi, fraksiyonların bileşenlerine ayrılması ve saf maddelerin elde edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Karışım hâlinde bulunan fraksiyonlar, miktarlarına göre silika jel kaplı hazır alüminyum plakalar (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, Merck) üzerine uygulanmış ve uygun çözücü sistemleri kullanılarak ayrılmıştır. En elverişli mobil faz, gerçekleştirilen bir dizi ön deneme neticesinde belirlenmiştir. Gerektiğinde her bir fraksiyon için farklı çözücü sistemleri uygulanarak en iyi ayrımın sağlandığı koşullar seçilmiştir. Maddelere ait bantlar UV ışığı (254 nm) altında belirlenmiş, işaretlenen bölgeler tek tek kesilerek erlenlere aktarılmıştır. Uygun çözücü ile bir gün boyunca bekletilen örnekler süzülmüş, ardından çözücülerini buharlaştırılarak saf bileşikler elde edilmiştir. Bu işlem, tüm maddeler saflaştırılınca kadar sürdürülmüştür.



Şekil 2.5: Elde edilen bazı fraksiyonlara ait örnek TLC kromatogramı

2.3 Spektroskopik Yöntemler

2.3.1 GS-MS Analizi

Inula viscosa bitkisinden elde edilen uçucu yağ, Thermo Scientific AI 1310 otosampler, Thermo Scientific Trace 1300 GC gaz kromatografisi ve Thermo Scientific TSQ 9610 MS-MS kütle spektrometresi sisteminden oluşan bir GC-MS düzeneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, $(23,0 \pm 3,0)$ °C ortam sıcaklığı ve $\%50 \pm 15$ bağıl nem içeren kontrollü çevre şartlarında yürütülmüştür.

Analiz öncesinde, bitki ekstraktından 50 µL alınarak 1500 µL diklorometan içerisinde çözülmüş ve homojen hale getirilen bu çözelti analiz sistemine enjekte edilmiştir.

Bileşenlerin ayrımı için VF-WAX (Varian FactorFOUR, Faz: VF-WAXms) kapiler kolonu ($60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ iç çap, $0,25 \text{ µm}$ film kalınlığı) kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum, $1,0 \text{ mL/dk}$ sabit akış hızında tercih edilmiştir. Enjektör sıcaklığı 250 °C olarak ayarlanmış ve hazırlanan numuneden $0,5 \text{ µL}$ hacminde enjeksiyon, 25:1 bölünme oranında sisteme verilmiştir.

Başlangıçta fırın sıcaklığı 40 °C 'de 5 dakika boyunca izotermal olarak tutulmuş, ardından 3 °C/dk artış hızıyla 220 °C 'ye yükseltilmiş, son olarak bu sıcaklıkta 20 dakika boyunca sabit tutulmuştur.

Toplam analiz süresi 85 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Solvent gecikmesi 11. dakikaya ayarlanmıştır. Kütle spektrometresi transfer hat sıcaklığı 250 °C, iyon kaynağı sıcaklığı ise 245 °C olarak set edilmiştir. Kütle spektrumları 70 eV elektron enerjisinde (EI) ve m/z 20 ila 850 tarama aralığında kaydedilmiştir.

2.3.2 Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Bitki ekstraları ile infüzyon ve dekoksasyon yöntemleriyle hazırlanan sulu ekstraların sekonder metabolit bileşimleri, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) kullanılarak analiz edilmiştir.

2.3.2.1 Bitki Ekstrelerin LC-MS/MS Analizine Hazırlanması

Her bir ekstrenin yaklaşık 100 mg'ı 5 mL metanolda çözülmüş, 1 dakika vortekslenmiş ve 0,22 µm membran filtreden geçirilmiştir. Nihai örnek hacminde 1,5 ppm iç standart konsantrasyonu elde etmek için 30 µL teofilin çözeltisi (50 ppm, MeOH) eklenmiştir.

Kromatografik ayırım, Troyasil C18 kolonu (3,5 µm, 150 × 2,1 mm) ve 25 °C'de gradyan elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar A, %1 formik asit içeren su; B, %10 metanol –%10 su–%80 asetonitril olarak kullanılmış ve akış hızı 0,25 mL/dakika olarak ayarlanmıştır.

Kütle spektrometrik analizler, pozitif ve negatif iyon modlarında çalışan Thermo TSQ Quantis cihazı ve ısıtmalı elektrospray iyonizasyon (H-ESI) kaynağı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler, 23 ± 3 °C sıcaklık ve %50 ± 15 bağıl nem ortamında yürütülmüştür.

Tablo 2.1: LC-MS/MS metot parametreleri

Bileşik ismi	Beklenen RT* (dk)	Polarite	Öncül iyon (m/z)	Ürün iyonu 1 (m/z)	Çarpışma enerjisi 1 (V)	Ürün iyonu 2 (m/z)	Çarpışma enerjisi 2 (V)
(+)-kateşin	5.90	Negative	289.13	203.05	18.85	245.05	14.10
4-hidroksibenzoik asit	6.10	Negative	136.93	92.88	14.25	64.88	29.41
Akasetin	9.80	Positive	285.12	241.97	35.23	-	-
Apigenin-7-glikozit	6.97	Negative	431.25	238.97	50.04	268.05	34.12
Kafeik asit	6.29	Negative	179.03	134.97	15.26	106.97	21.83
Şikorik asit	7.09	Negative	473.10	148.97	21.73	311.05	11.07
Siyanidin klorür	7.98	Positive	287.12	136.88	34.22	212.97	32.90
Dihidrokaempferol	7.58	Negative	287.05	124.97	21.02	259.05	12.94
Ellajik asit	6.88	Negative	301.03	283.97	30.17	300.05	31.69
Emodin	11.25	Negative	269.07	224.97	25.12	240.97	26.58
Öpatilin	9.55	Negative	343.12	313.05	24.61	328.05	17.89
Hiperosid	6.70	Negative	463.30	270.97	43.97	300.05	27.14
İzosakuranetin	9.78	Negative	283.18	210.97	38.97	267.97	22.64
L-Teanin	1.62	Positive	175.12	157.97	9.14	83.88	18.75
Luteolin	7.97	Negative	285.03	132.88	34.67	150.88	26.18
Luteolin 7-rutinozit	6.47	Negative	593.32	150.88	62.57	285.05	37.65
Mirisetin	7.48	Negative	317.07	150.88	24.87	178.88	20.01
Narinjenin	8.46	Negative	271.05	118.97	27.39	150.97	17.23
Narinjin	6.83	Negative	579.36	150.88	41.70	271.05	31.54
Nepetin	8.01	Negative	315.05	136.88	31.08	299.97	20.47

Tablo 2.1: (devam)							
Nepetin-7-glikozit	6.73	Negative	478.23	300.05	34.97	316.05	23.96
Orientin	6.35	Negative	447.20	327.05	21.48	357.05	19.61
p-kumarik asit	7.02	Negative	162.85	92.88	31.59	118.97	13.09
Penduletin	9.55	Negative	343.23	241.97	39.93	328.13	16.27
Polidatin	6.70	Negative	389.25	184.97	35.94	227.05	16.17
Kuersetin	8.06	Negative	301.05	150.88	21.23	178.97	17.49
Ramnositrin	9.90	Positive	301.20	106.88	43.62	258.05	33.36
Rosmarinik asit	7.25	Negative	359.13	160.97	16.78	196.97	16.07
Rutin	6.46	Negative	609.32	270.97	58.68	300.05	37.65
Salisilik asit	8.17	Negative	137.02	64.97	29.06	92.97	16.37
Skutellarein	7.63	Negative	285.12	116.97	38.97	136.88	31.34
Taksifolin	7.16	Negative	303.13	124.88	20.62	285.05	10.36
Verbaskosit	6.53	Negative	623.42	132.97	63.18	160.97	37.30
Teofilin	5.45	Positive	181.12	95.97	23.50	123.97	18.95

[?]RT: Beklenen alıkonma (retansiyon) süresi

Tablo 2.2: LC-MS/MS validasyon verileri

Bileşik ismi	İyonlaşma modu (negatif/pozitif)	Ana iyon (m/z)	Doğrusal regresyon denklemi	R ²	Doğrusallık aralığı, mg/L	Doğrusallık aralığı, mg/kg	LOD**/ LOQ*** µg/L	Geri kazanım %
(+)-kateşin	Negative	289.133	$Y = 0.046926 * X + 0.000646$	0.999	0.01- 2.00	0.5- 100	2/6	100.5
4-hidroksibenzoik asit	Negative	136.933	$Y = 0.004296 * X + 0.000302$	0.996	0.25 – 2.50	12.5- 125	0.1/ 0.3	101.2
Akasetin	Positive	285.117	$Y = 2.70306 * X + 0.00477909$	0.999	0.01 – 2.00	0.5- 100	0.4/ 1.2	99.0
Apigenin-7-glikozit	Negative	431.250	$Y = 0.228047 * X + 0.000584383$	0.997	0.01 – 2.50	0.5- 125	2/6	103.2
Kafeik asit	Negative	179.033	$Y = 0.247735 * X + 0.061756$	0.979	0.25 – 2.50	12.5- 125	10/30	102.4
Şikorik asit	Negative	473.100	$Y = 0.0984357 * X + 0.0002116$	0.999	0.01 – 2.00	0.5- 100	2/6	99.5
Siyanidin klorür	Positive	287.117	$Y = 0.0296193 * X + 0.000280064$	0.998	0.05 – 2.00	2.5- 100	2/6	97.5
Dihidrokamferol	Negative	287.050	$Y = 0.603951 * X - 0.000526715$	0.999	0.01 – 2.00	0.5- 100	2/6	101.5
Ellajik asit	Negative	301.033	$Y = 0.0240094 * X + 0.0000256596$	0.997	0.05 – 2.50	2.5- 125	10/30	101.6
Emodin	Negative	269.067	$Y = 0.931501 * X + 0.00155472$	0.995	0.01 – 0.50	5- 25	2/6	98.0
Öpatilin	Negative	343.117	$Y = 2.66727 * X + 0.00164862$	0.998	0.01 – 2.50	0.5- 125	2/6	104.0
Hiperozit	Negative	463.300	$Y = 0.101524 * X + 0.000614595$	1.000	0.01 – 2.00	0.5- 100	2/6	98.5
İzosakuranetin	Negative	283.183	$Y = 1.61626 * X + 0.00417164$	0.999	0.01 – 0.50	0.5- 25	2/6	98.0
L-Teanin	Positive	175.117	$Y = 0.189111 * X - 0.002062$	1.000	0.05 – 1.00	2.5- 50	0.3/ 0.9	100.5

Tablo 2.2 (devam)								
Luteolin	Negative	285.033	$Y = 0.0787429 \cdot X + 0.0000165593$	0.999	0.01 – 1.00	0.5- 50	2/6	98,0
Luteolin 7-rutinozit	Negative	593.317	$Y = 0.372884 \cdot X + 0.0000635256$	0.999	0.01 – 0.50	0.5- 25	2/6	98,0
Mirisetin	Negative	317.067	$Y = 0.141347 \cdot X - 0.00069684$	0.999	0.01 – 2.00	0.5- 100	2/6	102,5
Narinjenin	Negative	271.050	$Y = 0.519426 \cdot X + 0.00159216$	0.997	0.01 – 2.50	0.5- 125	2/6	101,2
Narinjin	Negative	579.357	$Y = 0.0836879 \cdot X - 0.0000343842$	0.999	0.01 – 2.00	0.5- 100	0.4/ 1.2	101,5
Nepetin	Negative	315.050	$Y = 1.84238 \cdot X - 0.000504039$	0.996	0.01 – 0.50	0.5- 25	2/6	96,0
Nepetin-7-glikozit	Negative	478.233	$Y = 0.0192981 \cdot X - 0.000109195$	0.998	0.01 – 2.00	0.5- 100	2/6	101,5
Orientin	Negative	447.200	$Y = 0.141617 \cdot X - 0.000309574$	0.999	0.01 – 2.00	0.5- 100	2/6	102,0
p-kumarik asit	Negative	162.850	$Y = 0.0470189 \cdot X + 0.000216374$	0.998	0.01 – 2.00	0.5 - 100	10/30	97,5
Penduletin	Negative	343.233	$Y = 1.66347 \cdot X + 0.0022623$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	0.4/ 1.2	99,0
Polidatin	Negative	389.250	$Y = 0.119379 \cdot X - 0.00127263$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	0.4/ 1.2	102,5
Kuersetin	Negative	301.050	$Y = 0.728079 \cdot X - 0.000232193$	1.000	0.01 – 0.50	0.5 - 25	2/6	98,0
Ramnositrin	Positive	301.200	$Y = 0.35796 \cdot X + 0.00152986$	1.000	0.01 – 2.00	0.5 - 100	3/9	101,5
Rosmarinik asit	Negative	359.133	$Y = 0.208922 \cdot X + 0.00119202$	1.000	0.01 – 1.00	0.5 - 50	3/9	99,0
Rutin	Negative	609.317	$Y = 0.06852 \cdot X + 0.000318723$	0.999	0.01 – 1.00	0.5 - 50	2/6	97,0

Tablo 2.2 (devam)								
Salisilik asit	Negative	137.017	$Y = 1.1382 * X + 0.0543838$	0.991	0.01 – 0.50	0.5 - 25	2/6	94,0
Skutellarein	Negative	285.117	$Y = 0.0756392 * X + 0.000130407$	0.998	0.01 – 2.50	0.5 - 125	2/6	101,6
Taksifolin	Negative	303.133	$Y = 0.499145 * X + 0.000507966$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	0.8/ 2.4	98,0
Verbaskosit	Negative	623.417	$Y = 0.0262293 * X + 0.000228909$	0.998	0.01 – 2.00	0.5 - 100	13/39	97,0

* Kafeik asidin kantifikasyonunu düzeltmek amacıyla enjeksiyon hacmi 20 µL'ye artırıldı.

R² : Korelasyon katsayısı

LOD** (Limit of Detection) : Tespit limiti; Yöntemle güvenilir şekilde tespit edilebilen en düşük konsantrasyon

LOQ*** (Limit of Quantification) : Tayin limiti; Yöntemle nicel olarak güvenilir biçimde ölçülebilen en düşük konsantrasyon.

2.3.2.2 İnfüzyon ve Dekoksiyon Örneklerinin LC-MS/MS Analizine Hazırlanması

İnfüzyonlar veya dekoksiyonlar, bitkilerin en çok tüketilen içilebilir formlarıdır (Fotakis vd., 2016). İnfüzyon; bitki materyalinin soğuk veya kaynar su ile kısa bir süre bekletilmesi yoluyla hazırlanır. Bunlar, bitki materyalindeki kolayca çözünebilen bileşenlerini içeren seyreltik çözeltilerdir. Dekoksiyon; bitki materyalinin belirli bir hacimdeki su içerisinde, tanımlanmış bir süre boyunca kaynatılmasını, ardından soğutularak süzülmesini içeren bir yöntemdir. Bu prosedür, suda çözünen ve ısıya dayanıklı bileşenlerin özütlenmesi için uygundur (Singh, 2008).

Inula viscosa dekoksiyon (IV-dek) ve infüzyon (IV-inf) çay örneklerinin sekonder metabolit bileşiminin LC-MS/MS yöntemiyle belirlenmesi amacıyla; 970 µL çay örneği çözeltisi, nihai örnek hacminde 1,5 ppm iç standart konsantrasyonu sağlayacak şekilde 30 µL teofilin çözeltisi (MeOH içerisinde 50 ppm teofilin) ile 1,5 mL'lik saklama şişesinde karıştırılmıştır.

Kromatografik ayırım, Troyasil C18 kolonu (3,5 µm, 150 × 2,1 mm) kullanılarak 25 °C kolon sıcaklığında ve 0,25 mL/dakika akış hızında gradyan elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A, %1 formik asit içeren su; mobil faz B ise %10 metanol – %10 su – %80 asetonitril karışımı olarak tercih edilmiştir.

Tablo 2.3: LC-MS/MS metot parametreleri

Bileşik ismi	Beklenen RT (Dakika)	Polarite	Öncül İyon (<i>m/z</i>)	Birinci Ürün İyonu (<i>m/z</i>)	Birinci Çarpışma Enerjisi (Volt)	İkinci Ürün İyonu (<i>m/z</i>)	İkinci Çarpışma Enerjisi (Volt)
Akasetin	9.10	Pozitif	285.12	241.97	35.23	-	-
Apigenin 7-glukozit	6.20	Negatif	431.25	238.97	50.04	268.05	34.12
Apigenin	7.60	Pozitif	271.30	118.88	30.63	152.88	29.47
Kaffeik asit	5.60	Negatif	179.03	134.97	15.26	106.97	21.83
Dihidrokamferol	6.75	Negatif	287.05	124.97	21.02	259.05	12.94
Ellajik asit	6.08	Negatif	301.03	283.97	30.17	300.05	31.69
Emodin	10.58	Negatif	269.07	224.97	25.12	240.97	26.58
Öpatilin	8.80	Negatif	343.12	313.05	24.61	328.05	17.89
Hiperozit	5.70	Negatif	463.30	270.97	43.97	300.05	27.14
Izosakuranetin	8.90	Negatif	283.18	210.97	38.97	267.97	22.64
Luteolin	7.22	Negatif	285.03	132.88	34.67	150.88	26.18
Luteolin 7-rutinozit	5.67	Negatif	593.32	150.88	62.57	285.05	37.65
Nepetin	7.23	Negatif	315.05	136.83	31.08	299.97	20.47
Nepetin-7-glukozit	6.10	Negatif	478.23	300.05	34.97	316.05	23.96
Orientin	5.45	Negatif	447.20	327.05	21.48	357.05	19.61
<i>p</i> -kumarik asit	6.27	Negatif	162.85	92.88	31.59	118.97	13.09
Kuersetin	7.29	Negatif	301.05	150.88	21.23	178.97	17.49
Rutin	5.75	Negatif	609.32	270.97	58.68	300.05	37.65
Verbaskozit	5.74	Negatif	623.42	132.97	63.18	160.97	37.30
Teofilin	4.70	Pozitif	181.12	95.97	23.50	123.97	18.95

RT: Beklenen alıkonma (retansiyon) süresi

Tablo 2.4: LC-MS/MS validasyon verileri

Bileşik ismi	İyonlaşma modu	Ana iyon (m/z)	Doğrusal regresyon denklemi	R ²	Doğrusallık aralığı, mg/L	Doğrusallık aralığı, mg/kg	LOD ^{**} / LOQ ^{**} * µg/L	Geri kazanım %
Akasetin	Pozitif	285.117	$Y = 2.70306 * X + 0.00477909$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	0.4/ 1.2	99.0
Apigenin 7-glukozit	Negatif	431.250	$Y = 0.228047 * X + 0.000584383$	0.997	0.01 – 2.50	0.5 - 125	2/6	103.2
Apigenin	Pozitif	271.300	$Y = 0.230611 * X + 0.020491$	99.91	0.01 - 5.00	0.5 - 250	2 / 6	99.26
Kaffeik asit	Negatif	179.033	$Y = 0.247735 * X + 0.061756$	0.979	0.25 – 2.50	12.5 - 125	10/30	102.4
Dihidrokamferol	Negatif	287.050	$Y = 0.603951 * X - 0.000526715$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	2/6	101.5
Ellajik asit	Negatif	301.03	$y = 0.010212 * x - 0.000663$	0.998	0.25 – 5.00	12.5 - 500	10/30	100.26
Emodin	Negatif	269.07	$Y = 1.023324 * X + 0.030409$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	2/6	100.5
Öpatilin	Negatif	343.12	$Y = 2.005271 * X$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	2/6	100.3
Hiperozit	Negatif	463.300	$Y = 0.101524 * X + 0.000614595$	1.000	0.01 – 2.00	0.5 - 100	2/6	98.5
Izosakuranetin	Negatif	283.183	$Y = 1.61626 * X + 0.00417164$	0.999	0.01 – 0.50	0.5 - 25	2/6	98.0
Luteolin	Negatif	285.033	$Y = 0.0787429 * X + 0.0000165593$	0.999	0.01 – 1.00	0.5 - 50	2/6	98.0
Luteolin 7-rutinozit	Negatif	593.317	$Y = 0.372884 * X + 0.0000635256$	0.999	0.01 – 0.50	0.5 - 25	2/6	98.0
Nepetin	Negatif	315.05	$Y = 1.842380 * X - 0.000504$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	2/6	99.5
Nepetin-7-glukozit	Negatif	478.23	$Y = 0.008686 * X - 0.000021$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	2/6	99.6
Orientin	Negatif	447.200	$Y = 0.141617 * X - 0.000309574$	0.999	0.01 – 2.00	0.5 - 100	2/6	102.0
<i>p-kumarik asit</i>	Negatif	162.850	$Y = 0.0470189 * X + 0.000216374$	0.998	0.01 – 2.00	0.5 - 100	10/30	97.5

Tablo 2.4: (devam)								
Kuersetin	Negatif	301.05	$y = 0.251355 \cdot x + 0.011436$	0.998	0.05 – 2.00	1 – 100	10/30	100.86
Rutin	Negatif	609.317	$Y = 0.06852 \cdot X + 0.000318723$	0.999	0.01 – 1.00	0.5 - 50	2/6	97.0
Verbaskozit	Negatif	623.417	$Y = 0.0262293 \cdot X + 0.000228909$	0.998	0.01 – 2.00	0.5 - 100	13/39	97.0

R^2 : Korelasyon katsayısı

LOD** (Limit of Detection) : Tespit limiti; Yöntemle güvenilir şekilde tespit edilebilen en düşük konsantrasyon

LOQ*** (Limit of Quantification) : Tayin limiti; Yöntemle nicel olarak güvenilir biçimde ölçülebilen en düşük konsantrasyon.

2.3.3 NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY)

Saf olarak elde edilen maddelerin ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrumları, dötoro kloroform (CDCl₃)’daki çözeltilerinden Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi’nde, BRUKER ULTRASHIELD PLUS BIOSPIN 500 MHz NMR spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir.

2.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı (TPC)

Toplam fenolik içerik Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlendi. Örneklerin spektrofotometrik ölçümleri, 190-1100 nm dalga boyu aralığında tarama yapabilen Shimadzu UV-1280 marka UV-Vis spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analizde kullanılan doymuş Na₂CO₃ çözeltisi için, 100 mL distile suda 35 g susuz Na₂CO₃ çözdürülmüş, bir gece bekletildikten sonra içine birkaç Na₂CO₃.10H₂O kristali eklenmiştir. Kristalizasyon tamamlanınca da içerik cam pamuktan filtre edilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi ise hazır çözelti olarak alınmıştır.

Bitki örneklerinden 10 mg tartılarak 10 mL çözücü içerisinde çözüldürülerek 1000 ppm stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltisinden 1 mL alınarak 10 mL’lik balon joje içerisine aktarılmış, üzerine 1 mL Folin reaktifi eklenip çalkalandıktan sonra 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında üzerine doymuş Na₂CO₃ çözeltisinden 1 mL eklenmiş ve toplam hacim distile su ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. Homojen hale getirilen karışım 90 dakika boyunca karanlık bir ortamda bekletilmeye bırakılmıştır. 90 dakika sonunda spektrofotometrede 720 nm dalga boyunda okunmuştur. Her bir örnek üç tekrarlı çalışılmış, ortalama absorbans değeri hesaplandıktan sonra toplam fenolik madde miktarı, seyreltme faktörü dikkate alınarak “mg Gallik Asit Eşdeğeri (GAE)/ g örnek” cinsinden hesaplanmıştır (Uylaşer ve Başoğlu 2016). Hesaplamalarda aşağıdaki formül esas alınmıştır:

$$TPC (mg GAE/g) = \frac{C \times V \times SF}{m} \quad (2.1)$$

C: Kalibrasyon eğrisinden elde edilen gallik asit konsantrasyonu (mg/L),

V: Ekstraksiyon çözeltisinin toplam hacmi (L),

SF: Seyreltme faktörü,

m: Analizde kullanılan numune miktarı (g)

2.5 Toplam Antosiyanin Miktarı (TAC)

Ekstrelerin toplam monomerik antosiyanin içeriği, pH diferansiyel yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bu kapsamda, her bir ekstrakt çözeltisinden 1'er mL alınarak iki ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarılmıştır. Balon jøjelerden ilki pH 1.0 potasyum klorür (KCl) tamponu ile, ikincisi ise pH 4.5 sodyum asetat (CH₃COONa) tamponu ile seyreltilerek hacimleri tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler kimyasal dengeye ulaşması için oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından, her bir çözeltinin absorbans değerleri saf su ile hazırlanan köre (blank) karşı hem 520 nm hem de 700 nm dalga boylarında ölçülmüştür. 700 nm'deki ölçüm, numunenin absorbans göstermediği bu bölgede meydana gelebilecek ışık saçılmalarını (bulanıklık) tespit etmek ve gerekli düzeltmeleri yapmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Seyreltilmiş numunelerin net absorbans değerleri (A) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Sutharut ve Sudarat, 2012):

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (2.2)$$

A: Absorbans farkı

A₅₂₀: Antosiyaninlerin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyundaki ölçüm değeri

A₇₀₀: Numunedeki bulanıklığın veya olası safsızlıkların neden olduğu ışık saçılmasını düzeltmek için kullanılan referans dalga boyundaki ölçüm değeri

Toplam monomerik antosiyanin pigment konsantrasyonu, aşağıdaki formül kullanılarak siyanidin-3-glukozit eşdeğeri (mg/L) cinsinden hesaplanmıştır (Sutharut ve Sudarat, 2012):

$$\text{Antosiyanin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (2.3)$$

A: Absorbans farkı

MW: Molekül Ağırlığı. Siyanidin-3-glukozit için 449,2 g/mol'dür .

DF: Seyreltme faktörü

ε: Molar Absorptivite Katsayısı. Siyanidin-3-glukozit için 26.900 L/mol.cm

l: Işık Yolu. Küvetin genişliğini ifade eder (genellikle 1 cm)

10³: Sonucu g/L biriminden mg/L birimine dönüştürmek için kullanılan katsayı

2.6 Antioksidan Aktivite Analizi

2.6.1 DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderim Kapasitesi Yöntemi

Ekstraktların antioksidan aktivitesi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bu yöntemde, numunelerin serbest radikalleri indirgeme yetenekleri pozitif kontrol olarak seçilen standart antioksidan bileşiklerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

DPPH yöntemi için standart bileşikler olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), kurkumin, C vitamini ve α -tokoferol (α -toc) kullanılmıştır. Aktivite değerlendirmeleri; Hem örnekler hemde standartlar için 10 μ g/mL, 25 μ g/mL, 50 μ g/mL ve 100 μ g/mL olmak üzere dört farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Analiz prosedürü kapsamında, 1000 μ g/mL olarak hazırlanan örneklerin ve standartların stok çözeltilerinden sırasıyla 2, 5, 10 ve 20 μ L alınmış ve son hacim etil alkol ile 40 μ L'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımları, radikalın ışığa duyarlı yapısı nedeniyle 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, numunelerin DPPH radikalini indirgeme kapasiteleri bir mikroparka okuyucuda 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler, eş zamanlı olarak test edilen standart antioksidanların sonuçlarıyla karşılaştırılarak numunelerin radikal giderim potansiyelleri tespit edilmiştir.

Radikal giderme kapasitesinin belirlenmesinde, aşağıda sunulan denklemden faydalanılarak sayısal veriler elde edilmiştir (Alam vd.,2013):

$$\text{DPPH giderim aktivitesi (\% inhibisyon)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (2.4)$$

A_{kontrol} : Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: Örneğin absorbansı

DPPH radikalini indirgenmesi sonucu meydana gelen renk açılması, spektrofotometrik ölçümlerde absorbans değerlerinin düşmesine neden olur. Dolayısıyla, reaksiyon ortamında gözlenen düşük absorbans değerleri, test edilen örneğin serbest radikal giderim kapasitesinin yüksekliğine işaret eder.

2.6.2 CUPRAC Yöntemi

Ekstrelerin indirgeme kapasiteleri, CUPRAC yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Analiz kapsamında öncelikle; 1 mM DMF, 10 mM CuCl₂, 7.5 mM Neokuproin, 1 M NH₄CH₃COO (pH 7.0) çözeltisi ve distile suyun 1:1:1:0.6 hacimsel oranlarında karıştırılmasıyla bir çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışımdan 180 µL alınarak mikropilaya kuyucuklarına dağıtılmıştır. Ardından, etanol (EtOH) içerisinde 1:20 oranında seyreltilmiş olan numune çözeltilerinden 25 µL ilave edilmiştir. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, reaktif körüne karşı 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deneyde negatif kontrol olarak etanol, pozitif kontrol (standart) olarak ise bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), kurkumin, C vitamini ve α-tokoferol kullanılmıştır.

Elde edilen absorbans değerleri, troloks standart maddesi kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi üzerinden hesaplanmış ve sonuçlar gram numune başına milimol troloks eşdeğeri (mmol TR g⁻¹) olarak ifade edilmiştir. Hesaplamalarda aşağıdaki formül (2.5) kullanılmıştır (Apak vd., 2008):

$$CUPRAC \text{ değeri (mmol TR g}^{-1}\text{)} = \frac{A_{\text{örnek}} - A_{\text{kontrol}}}{\epsilon \times l} \times DF \quad (2.5)$$

A_{kontrol}: Kontrolün absorbansı

A_{örnek}: Örneğin absorbansı

ε: Molar Absorptivite Katsayısı. 1.67x10⁴ L mol⁻¹ cm⁻¹

l: ışık yolu (1 cm)

DF: seyreltme faktörü

Çalışmada, bitki örneklerinden hem infüzyon hem de dekoksiyon yöntemleriyle hazırlanan çayların ve distilasyon süreci sonunda elde edilen hidrosolün de CUPRAC yöntemi ile aktiviteleri belirlenmiştir. Standart prosedüre uygun olarak; bakır (II) klorür, neokuproin ve amonyum asetat tampon çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımına, farklı derişimlerde hazırlanan çay örnekleri ve hidrosol örneği ilave edilmiştir. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak, örneklerin bakır iyonlarını indirgeme kapasiteleri formül 2.5 yardımıyla hesaplanmış ve sonuçlar standart antioksidanlarla karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

2.6.3 FRAP Tayini

Bitki ekstralarının ve uçucu yağdan elde edilen hidrosolün antioksidan kapasiteleri, demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir (Donoso-Bustamante ve ark., 2025).

Analizde kullanılan FRAP çalışma reaktifi; 100 mL asetat tamponu (0,3 mM, pH 3,6), 40 mmol/L hidroklorik asit içerisinde hazırlanmış 10 mL 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ, 10 mM) çözeltisi ve 10 mL demir (III) klorürün (20 mmol/L) karıştırılmasıyla taze olarak elde edilmiştir. Analiz öncesinde, FRAP çalışma reaktifini oluşturacak üç temel stok çözelti laboratuvar ortamında şu şekilde hazırlanmıştır:

- Asetat Tamponu (0.3mM, pH 3.6): 3.1 g sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) tartılarak 800 mL saf su içinde çözülmüştür. Üzerine 16 mL glisial asetik asit eklenmiş ve pH değeri 3.6'ya ayarlanmıştır.
- TPTZ Çözeltisi (10 mM): 156 mg TPTZ reaktifi tartılarak 50 mL 40 mmol/L HCl çözeltisi içerisinde çözülmüştür.
- Demir (III) Klorür (FeCl_3) Çözeltisi (20 mmol/L): 270 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 50 mL saf suda çözülmüştür.

Literatürdeki standart 10:1:1 hacimsel karışım oranı korunarak; 100 mL Asetat tamponu, 10 mL TPTZ çözeltisi ve 10 mL FeCl_3 çözeltisi temiz bir kapta birleştirilerek toplamda 120 mL hacminde taze FRAP çalışma çözeltisi elde edilmiştir.

Reaksiyon karışımını oluşturmak için hazırlanan FRAP çözeltisinden 1.8 mL, etanol ile seyreltilmiş bitki ekstralarından ise 0.2 mL alınarak 2 mL'lik küvetlere aktarılmıştır. Karışım, 20 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümüne tabi tutulmuştur. Örneklerin demir indirgeyici antioksidan potansiyellerini hesaplamak amacıyla troloks standart kalibrasyon eğrisi kullanılmış ve sonuçlar troloks eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.

2.7 Antimikrobiyal Aktivite Yöntemi

Çalışma kapsamında *I. viscosa* bitkisinden elde edilen ekstraların antimikrobiyal aktiviteleri, disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Deneylerde test mikroorganizması olarak; Gram-negatif bakteri *Escherichia coli*, Gram-pozitif bakteri

Staphylococcus aureus ile küf mantarları *Aspergillus parasiticus* ve *Penicillium chrysogenum* kullanılmıştır.

Steril haldeki Sabouraud Dextrose Agar (SDA-Oxoid CM0041) ve Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerleri, 43-45 °C sıcaklığa kadar soğutularak 9 cm çapındaki petri kaplarına dökülmüştür. Besiyerinin tam olarak katılaşması için +4 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Stok kültürlerden alınan mikroorganizmalar Malt Extract Broth içerisinde 28 °C'de 24 saat bekletilerek aktif hale getirilmiş ve sayıları 10^5 kob/ml olacak şekilde standardize edilmiştir. Hazırlanan her bir plak üzerine 0,2 mL kültür inoküle edilmiş ve bu inokulum, steril bir cam L-baget (spreader) yardımıyla agar yüzeyine homojen bir şekilde yayılmıştır. Agar yüzeyinin kuruması için petri kapları tekrar +4 °C'de 1 saat bekletilmiştir.

Kültür ortamı üzerine steril filtre kağıtları (Schleicher and Schüll 2668, Almanya, 6 mm çapında) yerleştirilmiştir. Etil alkol içerisinde çözülmüş olan bitki ekstraktlarından disklerle 40, 80 ve 100 µl hacimlerinde damlatılmıştır. Kontrol grubu (kör) olarak, sadece ekstraktları çözmede kullanılan saf etil alkol disklerle uygulanarak çözücünün etkisi test edilmiştir.

Disklerin besiyerine tam nüfuz etmesi için sağlanan 30 dakikalık bir ön bekletmenin ardından plaklar ters çevrilerek inkübasyona bırakılmıştır. Petri kapları 28 °C'de 3-7 gün bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disklerin çevresinde oluşan şeffaf zonların antifungal ve antibakteriyel inhibisyon çapları milimetre cinsinden ölçülmüştür. Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Uçucu Yağ Analiz Sonuçları

Bitkisel materyaldeki uçucu yağ bileşenleri, Clevenger tipi bir düzenek yardımıyla hidrodestilasyon tekniği uygulanarak ekstrakte edilmiştir. 150 gram kuru bitki tartıldı ve hidrodestilasyon sonucunda 0.0654 gram uçucu yağ elde edildi. Uçucu yağ bileşen tayini, GC-MS düzeneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Inula viscosa bitkisinden elde edilen numunenin GC-MS analizi sonucunda toplam 74 bileşen tespit edilmiş ve kromatogramda saptanan piklerin toplam alana oranları üzerinden bağıntılı (%) miktarları belirlenmiştir. Analiz edilen uçucu bileşenlerin toplam alan içerisindeki payı %100,0 olup, bu bileşenlerin %22,20'sini oluşturan 22 adet pik tanımlanamayan bileşik olarak kaydedilmiştir.

Tayin edilen bileşikler beş kategoride incelenmiştir:

- I. Monoterpen hidrokarbonlar ve oksijenli monoterpenler
- II. Seskiterpen hidrokarbonlar
- III. Oksijenli seskiterpenler
- IV. Alifatik esterler, ketonlar ve diğer aromatik bileşikler
- V. Tanımlanamayan bileşikler

Tablo 3.1: Uçucu yağ ekstraktının kimyasal bileşenleri

Bitki Türü: <i>Inula viscosa</i>			
Bileşik ismi	Bağıl Alan (%)	RI	RI (lit.)
Monoterpen hidrokarbonlar ve Oksijenli monoterpenler			
L-linalool	0.28	1502	1540, 1544, 1547
Hotrienol	0.22	1560	1570, 1612
α -terpineol	0.25	1648	1675, 1697
Limonen-6-ol pivalat	1.84	2185	
Limonen-6-ol pivalat	5.93	2187	
Limonen-6-ol pivalat	0.51	2482	
Seskiterpen hidrokarbonlar			
Kopaen	0.44	1484	1470, 1493
Aromadendren	0.33	1628	1622, 1637
α -muurolen	0.51	1668	1701, 1716, 1734

Tablo 3.1. (devam)			
β -selinen	0.72	1697	1708, 1729
α -muurolen	0.25	1701	1701, 1734
δ -kadinen	0.38	1733	1752, 1764, 1772
(-)-kalamenen	0.35	1801	1818, 1826
α -kalacoren	0.81	1878	1887, 1894, 1914
Oksijenli seskiterpenler			
Germakron	2.94	1785	
Diepisedren-1-oksit	0.76	1787	
(-)-karyofillen oksit	5.65	1946	1980, 1985
Nerolidol	6.04	1990	2012, 2046, 2050, 2052
α -kopaen-11-ol	0.41	1998	1999, 2023, 2065, 2109
Viridiflorol	0.32	2036	2046, 2084
Platambin	3.65	2095	
(Z)- α -trans-bergamotol	10.60	2109	2328
Selina-6-en-4-ol	2.41	2111	2302, 2325
β -Ödesmol	5.38	2175	2157, 2220, 2234
Globulol	2.53	2194	2055, 2057, 2075, 2083, 2109
Korimbolon	1.96	2213	
Farnesol	0.46	2398	2350, 2378,
Nerolidol-epoksiasetat	3.62	2404	
8-sedren-13-ol	0.23	2489	2359
Alifatik esterler, Ketonlar ve Diğer aromatik bileşikler			
2,6,10,10-tetrametil-1-oksa-spiro[4.5]dek-6-en	0.30	1515	1500, 1540
Etanon, 1-(2-metil-1-siklopenten-1-yl)-	0.22	1544	
Asetik asit, 6,6-dimetil-2-metilen-7-(3-oksobutiliden)oksepan-3-ilmetil ester	0.33	1681	
(1R*,2R*,4R*)-1,6,6-trimetil-10-oksatrisiklo[5.3.0.0(2,4)]dek-7-en-9-ilmetil keton	0.68	1772	
7,8-epoksi- α -ionon	0.34	1779	
Farnesil aseton C	0.23	1811	

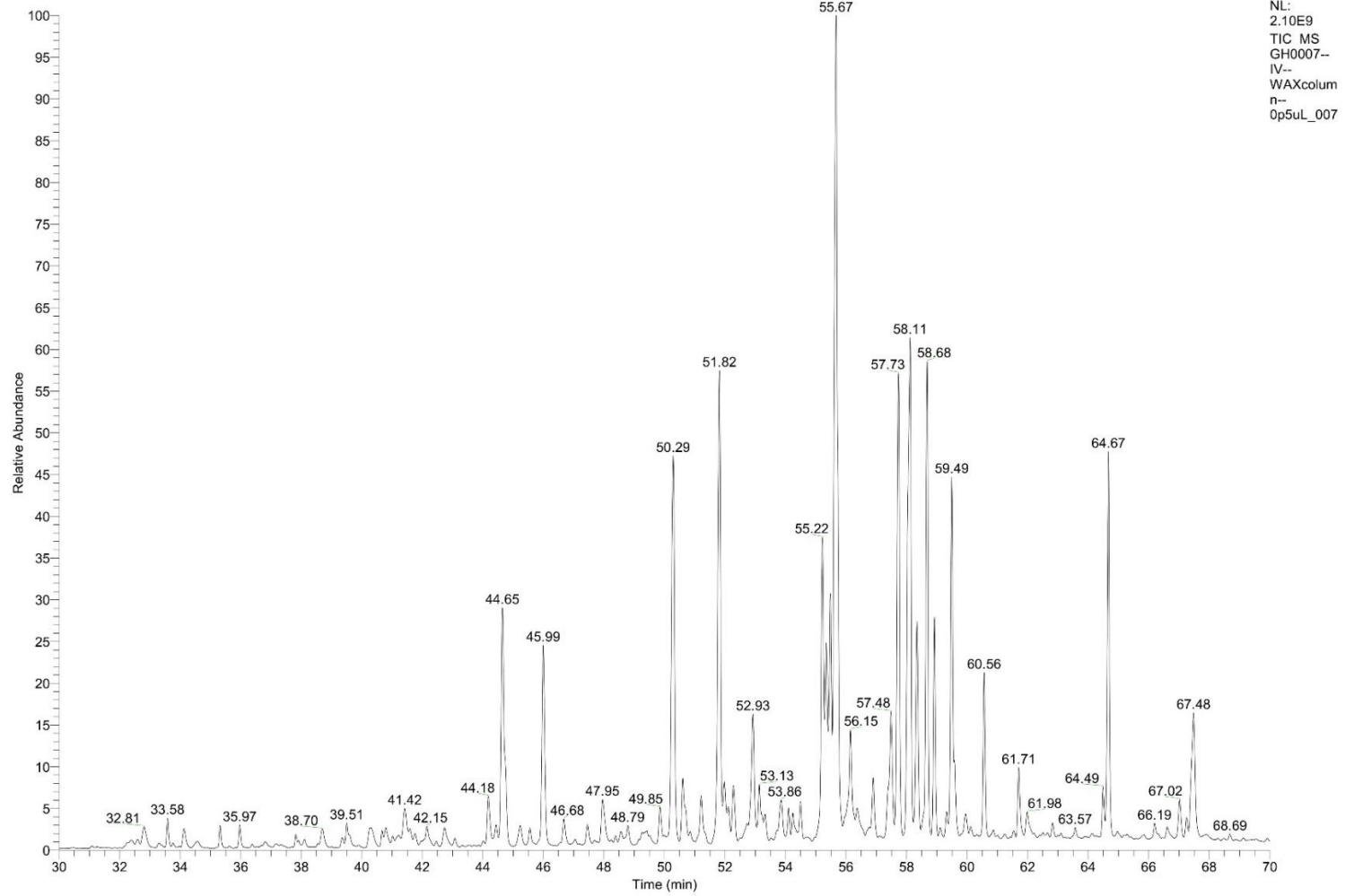
Tablo 3.1. (devam)			
1D-(1,2,5/3,4)-1',2'-anhidro-1-(hidroksimetil)- 2-(hidroksimetilamino)-3,4-O-izopropiliden- 3,4,5-siklopentantriol	2.56	1823	
1,1,3,5-tetrametil-3-neopentil-2,3-dihidroinden	0.37	1842	
Benzen, 1,3-dimetil-2-propoksi	0.29	1864	
Vinil 10-undesenoat	0.30	1902	
(E,E)-2,6,10-Dodekatrien,12-acetoksi-6- hidroksimetil-2,10-dimetil	0.46	1933	
β -ionol	0.35	1957	1939, 1968
(+)-longikamfenilon	2.17	2099	
8-okso-neoisolongifolen	2.82	2104	
(1R,5S,8R,9R)-4,4,8- trimetiltrisiklo[6.3.1.0(1,5)]dodeka-2-en-9-ol	0.57	2131	
2H-2,4a-metanonaftalen-8(5H)-on, 1,3,4,6,7,8a-hekzahidro-1,1,5,5-tetrametil-	0.48	2165	
4,4-dimetiltetrasiklo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)] tridekan-9-ol,	3.57	2232	
3-izopropiltrisiklo[4.3.1.1(2,5)]undek-3-en-10- ol	1.54	2268	
5-(1,1-dimethylethyl)-2,3-dihidro-3,3-dimetil- 1H-inden-1-on,	0.44	2315	
Tanımlanamayan bileşikler			
Toplam 22 adet tanımlanamayan bileşik			
Toplam pik alanı %100			
Toplam tanımlanamayan alan % 22.20			

Bağıl Alan (%): Kromatogramdaki ilgili pikin toplam pik alanına göre yüzdece oranını ifade eder

RI (Retention Index): Alıkonma İndeksi ya da Retansiyon İndeksi (Bileşiğin kolondaki kalış süresinin n-alkan standartlarına göre hesaplanmış standart değeridir.)

RI (literature): Literatür Alıkonma İndeksi ya da Literatür Retansiyon İndeksi (Bileşiğin daha önce yapılmış bilimsel çalışmalarda veya veri tabanlarında yayınlanmış olan alıkonma indeksi değeridir)

RT: 30.00 - 70.00 SM: 7G



Şekil 3.1: *Inula viscosa* uçucu yağının GS-MS kromatogramı

3.2 Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Analizi Sonuçları

3.2.1 Bitki Ekstrelerinin LC-MS/MS Analizi Sonuçları

Gölgede kurutulup toz haline getirilen bitki örneklerinden iki farklı ekstraksiyon serisi hazırlanmıştır. İlk grupta hekzan, aseton ve metanol; ikinci grupta ise petrol eteri, aseton ve metanol çözücülerini kullanılarak toplam 6 adet ekstre elde edilmiştir. Bu ekstratların fenolik bileşen profilleri ve miktarları LC-MS/MS tekniği kullanılarak analiz edilmiştir.

Ekstrelerin Kodları:

- IVH : *I.viscosa* hekzan ekstresi
IVA : *I.viscosa* aseton ekstresi
IVM : *I.viscosa* metanol ekstresi
DIVPE : Direkt *I.viscosa* petrol eteri ekstresi
DIVA : Direkt *I.viscosa* aseton ekstresi
DIVM : Direkt *I.viscosa* metanol ekstresi

Tayin edilen bileşikler beş kategoride incelenmiştir:

- I. Flavonoidler ve türevleri,
- II. Fenolik asitler,
- III. Antosiyaninler,
- IV. Fenolik Glikozitler ve Diğer Polifenoller,
- V. Diğer Bileşikler (Antrakınonlar ve Aminoasitler)

Ekstrelerin fenolik bileşenlerinin analiz sonuçları Tablo 3.1 ve 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Bitki ekstratlarında (IVH, IVA, IVM) tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg)

Bileşik ismi	Ekstreler		
	<i>I.viscosa</i> hekzan	<i>I.viscosa</i> aseton	<i>I.viscosa</i> metanol
Flavonoidler ve türevleri			
(+)-kateşin	0.35*	< LOD	< LOD
Akasetin	23.43	216.04	103.16
Apigenin-7-glukozit	< LOD	0.01	< LOQ
Dihidro Kempferol	0.28	13.57	1.19
Öpatilin	0.28	1.07	0.38
Hiperözit	0.10	1.88	2.78

Tablo 3.2 (devam)			
İzosakuranetin	9.43	17.07	8.76
Kuersetin	1.67	168.83	54.32
Luteolin	< LOD	12.64	19.69
Luteolin-7-rutinozit	< LOD	0.27	0.41
Mirisetin	0.25	2.01	0.60
Narinjenin	0.81	35.23	10.45
Narinjin	0.02	0.62	0.62
Nepetin	7.32	345.28	141.87
Nepetin-7-glukozit	0.28	304.79	410.06
Orientin	< LOD	0.46	2.94
Penduletin	9.30	49.78	17.92
Ramnositrin	488.18	2273.07	1828.77
Rutin	< LOD	9.22	29.72
Skutellarein	0.63*	3.21	< LOD
Taksifolin	2.67	150.31	15.49
Fenolik asitler			
4-hidroksibenzoik asit	< LOD	16.22	7.95
Elajik asit	< LOD	< LOD	< LOD
Kafeik asit	< LOD	1.91	2.34
Rosmarinik asit	10.33*	19.02	22.95
p-kumarik asit	0.29*	2.95	0.83
Salisilik asit	5.24	11.05	96.72
Şikorik asit	< LOD	0.01	0.05
Antosiyaninler			
Siyanidin klorür	0.15	12.56	5.05
Fenolik Glikozitler ve Diğer Polifenoller			
Polidatin	0.39*	0.53	0.53
Verbaskozit	< LOD	168.55	54.90
Diğer Bileşikler (Antrakinonlar ve Aminoasitler)			
Emodin	0.14*	< LOD	0.13*
L-Teanin	< LOQ	< LOQ	0.06
Toplam kuru bitki (mg/kg)	561.54	3838.16	2840.64

*Bileşiğin miktar tayininin (kantifikasyonunun) doğru bir şekilde yapılabilmesi amacıyla enjeksiyon hacmi 20 µL'ye artırılmıştır.

LOD (Limit of Detection): Analiz edilen yöntemin numune içerisinde bulunan bir maddeyi tespit edebildiği en düşük konsantrasyon

LOQ (Limit of Quantification): Numune içerisindeki bir maddenin sayısal olarak ölçülebildiği en düşük konsantrasyon

Tablo 3.3: Bitki ekstralarında (DIVPE, DIVA, DIVM) tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg)

Bileşik ismi	Ekstreler		
	Direkt <i>I. viscosa</i> petrol eteri	Direkt <i>I. viscosa</i> aseton	Direkt <i>I. viscosa</i> metanol
Flavonoidler ve türevleri			
(+)-kateşin	0.34*	< LOD	0.35*
Akasetin	5.44	164.20	118.14
Apigenin-7-glukozit	< LOD	0.01	0.00
Dihidro Kempferol	0.07	0.04	< LOD
Öpatilin	0.04	0.99	0.70
Hiperozit	0.10	1.41	1.75
İzosakuranetin	3.10	16.90	13.30
Kuersetin	1.25	162.73	50.97
Luteolin	< LOD	8.32	11.46
Luteolin-7-rutinozit	< LOD	0.18	0.25
Mirisetin	0.25	1.68	0.60
Narinjenin	0.04	30.44	13.76
Narinjin	< LOD	0.62	0.62
Nepetin	1.77	284.36	166.44
Nepetin-7-glukozit	0.28	170.23	268.22
Orientin	< LOD	0.11	0.82
Penduletin	1.76	45.97	32.43
Ramnositrin	156.18	1942.06	1640.75
Rutin	< LOD	7.13	15.88
Skutellarein	0.57	3.92	0.10*
Taksifolin	0.75	146.11	26.90

Tablo 3.3 (devam)			
Fenolik asitler			
4-hidroksibenzoik asit	< LOD	13.51	10.79
Elajik asit	< LOD	0.28*	< LOD
Kafeik asit	< LOD	1.41	1.72
Rosmarinik asit	10.25*	7.44	8.36
p-kumarik asit	< LOD	0.84	0.84
Salisilik asit	1.52	9.16	57.72
Şikorik asit	< LOD	0.07	0.04
Antosiyaninler			
Siyanidin klorür	< LOQ	10.32	4.71
Fenolik Glikozitler ve Diğer Polifenoller			
Polidatin	0.53	0.54	0.54
Verbaskozit	< LOD	155.37	58.89
Diğer Bileşikler (Antrakınonlar ve Aminoasitler)			
Emodin	0.13*	0.13*	0.13*
L-teanin	< LOD	< LOD	0.04
Toplam (mg/kg) kuru bitki			
	184.37	3189.14	2509.39

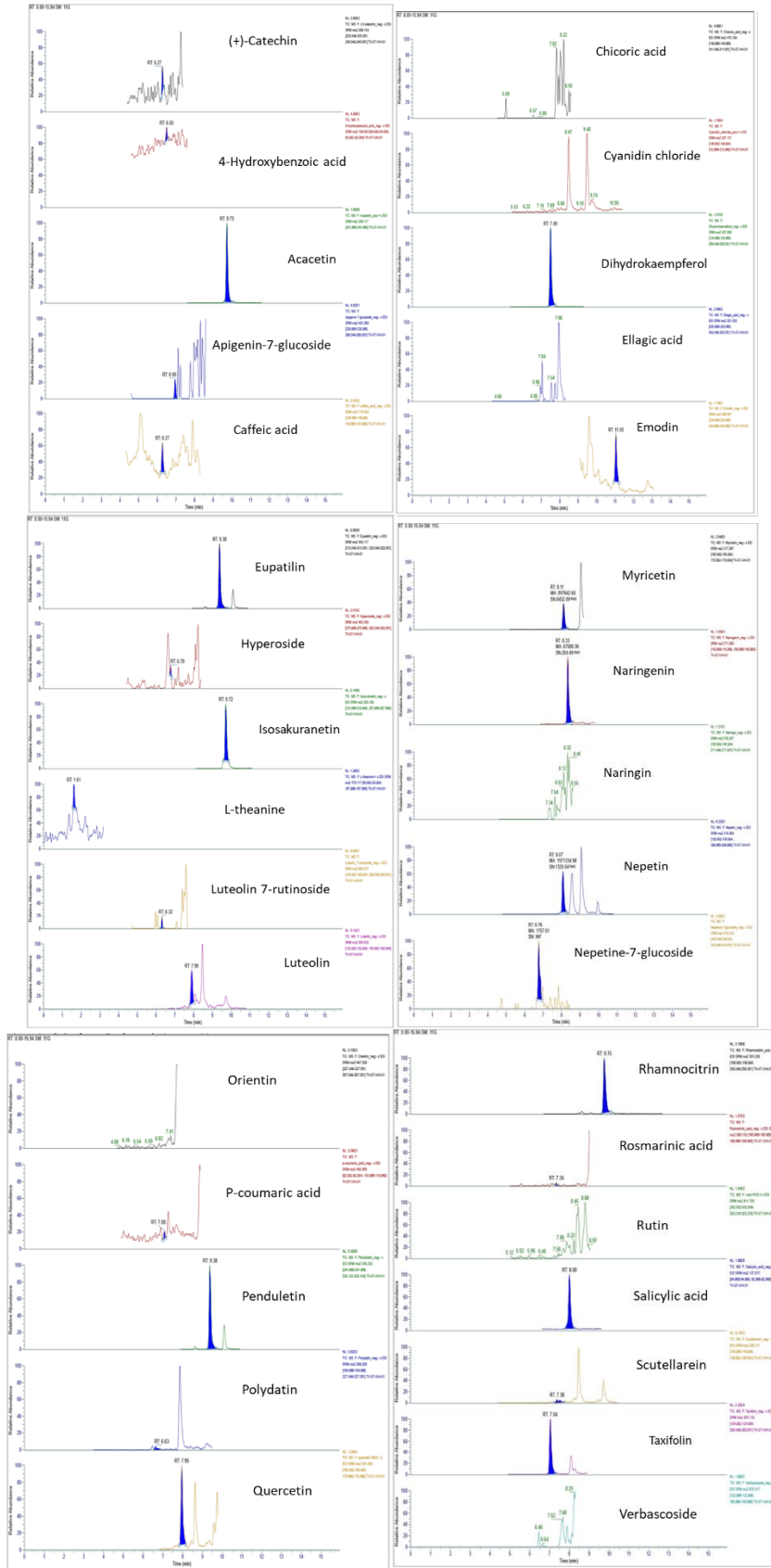
*Bileşiğin miktar tayininin doğru bir şekilde yapılabilmesi amacıyla enjeksiyon hacmi 20 µL'ye artırılmıştır.

LOD (Limit of Detection): Analiz edilen yöntemin numune içerisinde bulunan bir maddeyi tespit edebildiği en düşük konsantrasyon

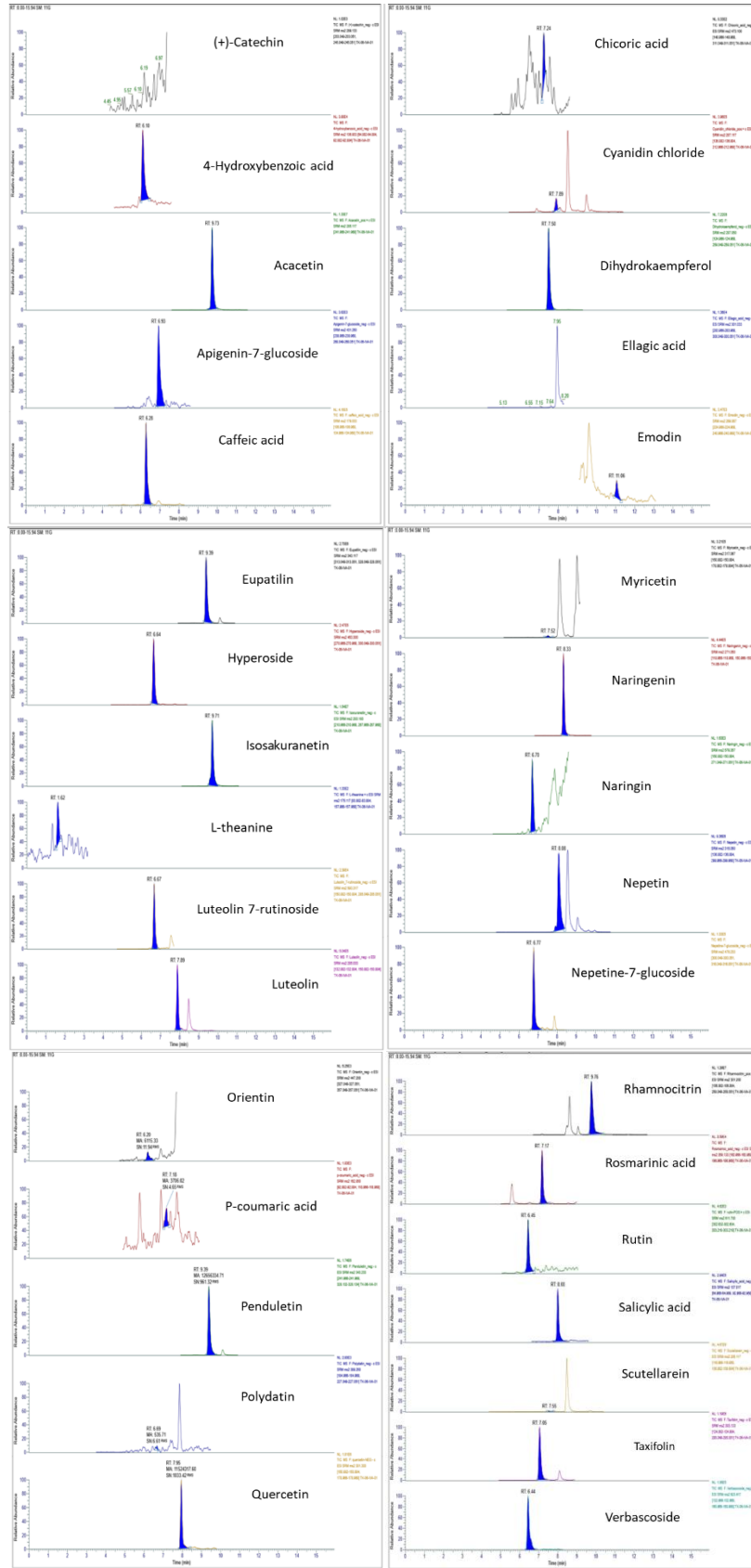
LOQ (Limit of Quantification): Numune içerisindeki bir maddenin sayısal olarak ölçülebildiği en düşük konsantrasyon

Fenolik içerik zenginliği bakımından ekstrelerin büyükten küçüğe sıralaması şu şekildedir:

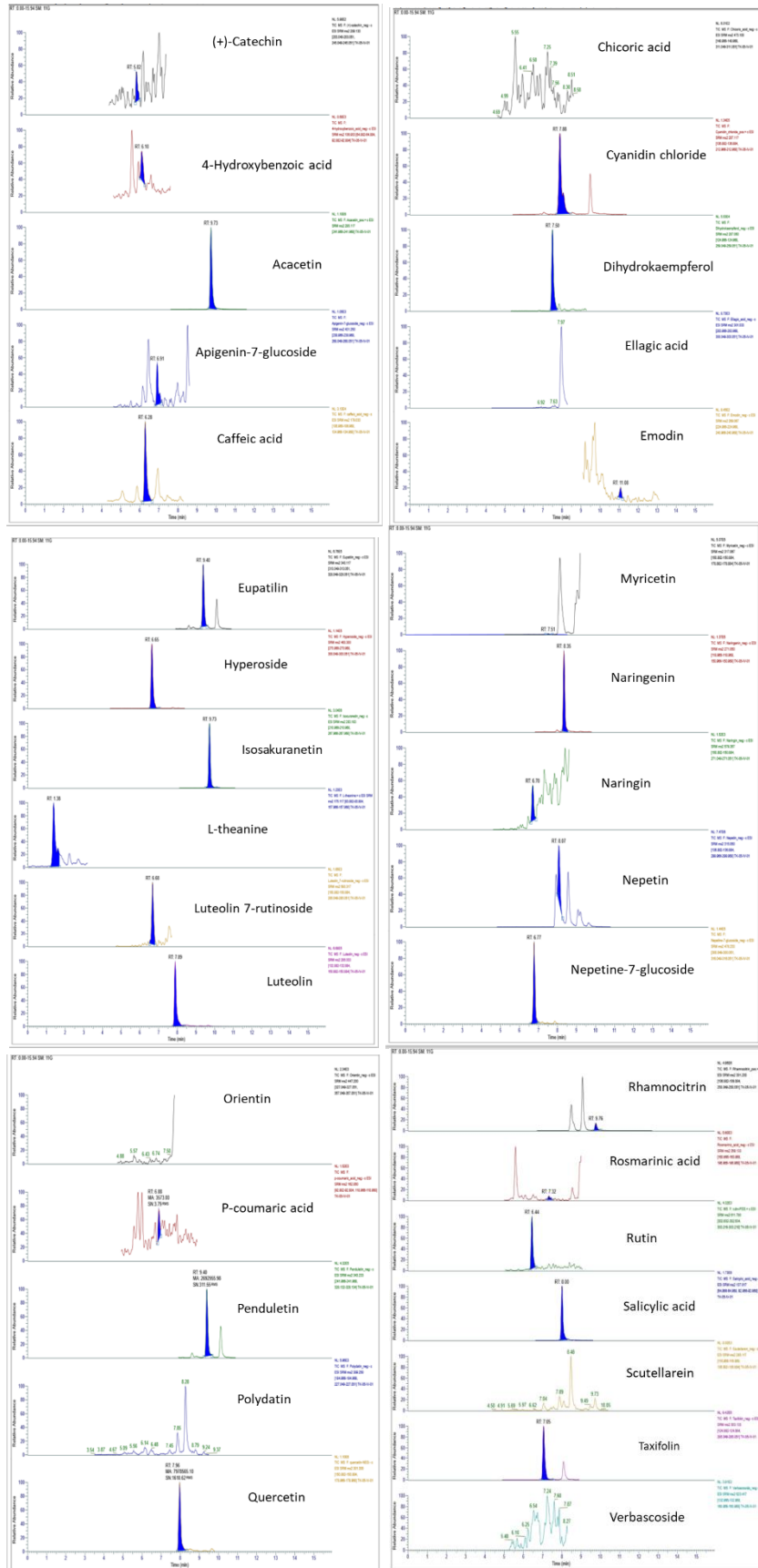
1. IVA (*I. viscosa* Aseton): 3838,16 mg/kg
2. DIVA (Direkt *I. viscosa* Aseton): 3189,14 mg/kg
3. IVM (*I. viscosa* Metanol): 2840,64 mg/kg
4. DIVM (Direkt *I. viscosa* Metanol): 2509,39 mg/kg
5. IVH (*I. viscosa* Hekzan): 561,54 mg/kg
6. DIVPE (Direkt *I. viscosa* Petrol Eteri): 184,37 mg/kg



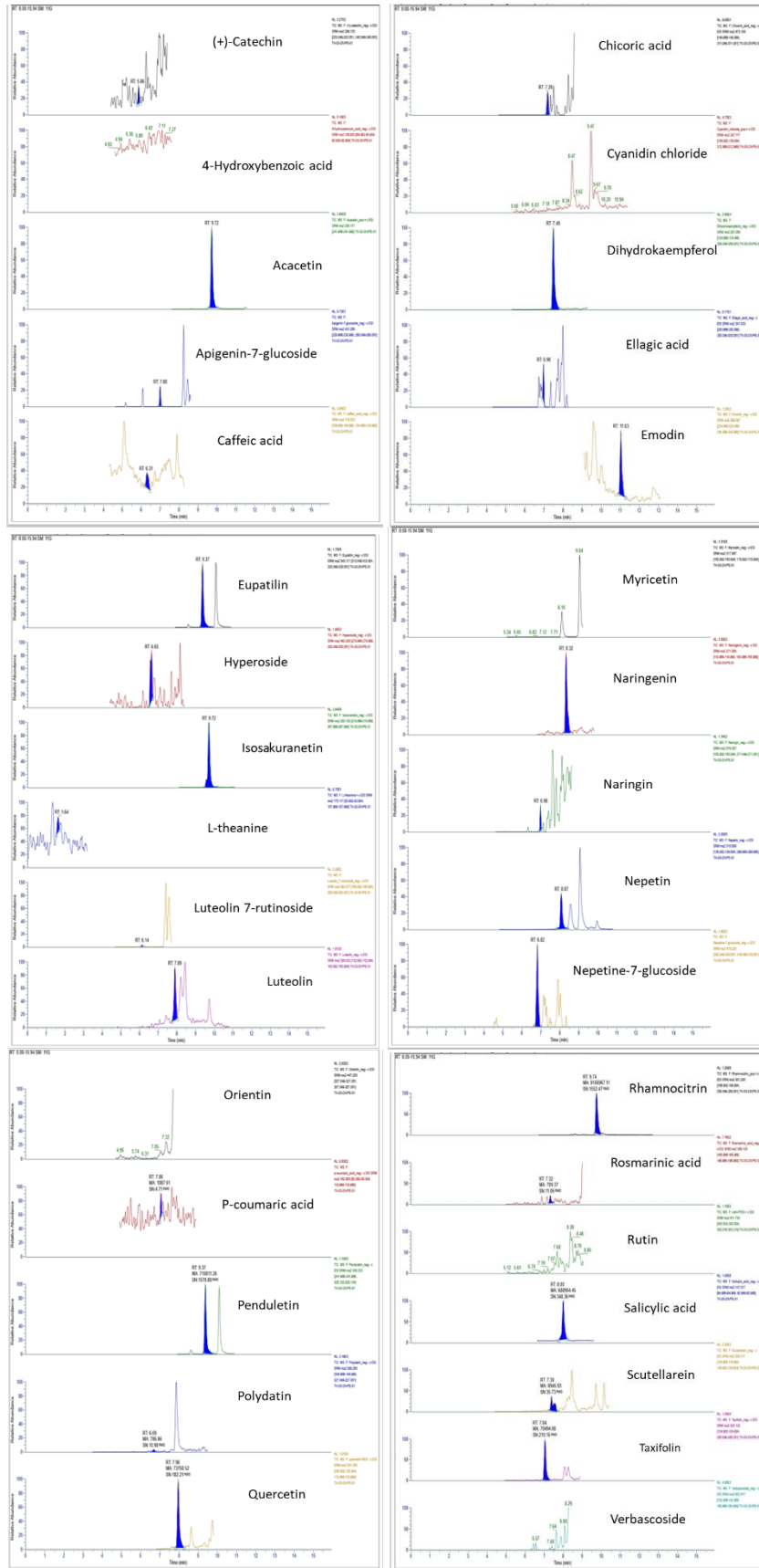
Şekil 3.2: IVH ekstreğine ait kromatogramlar



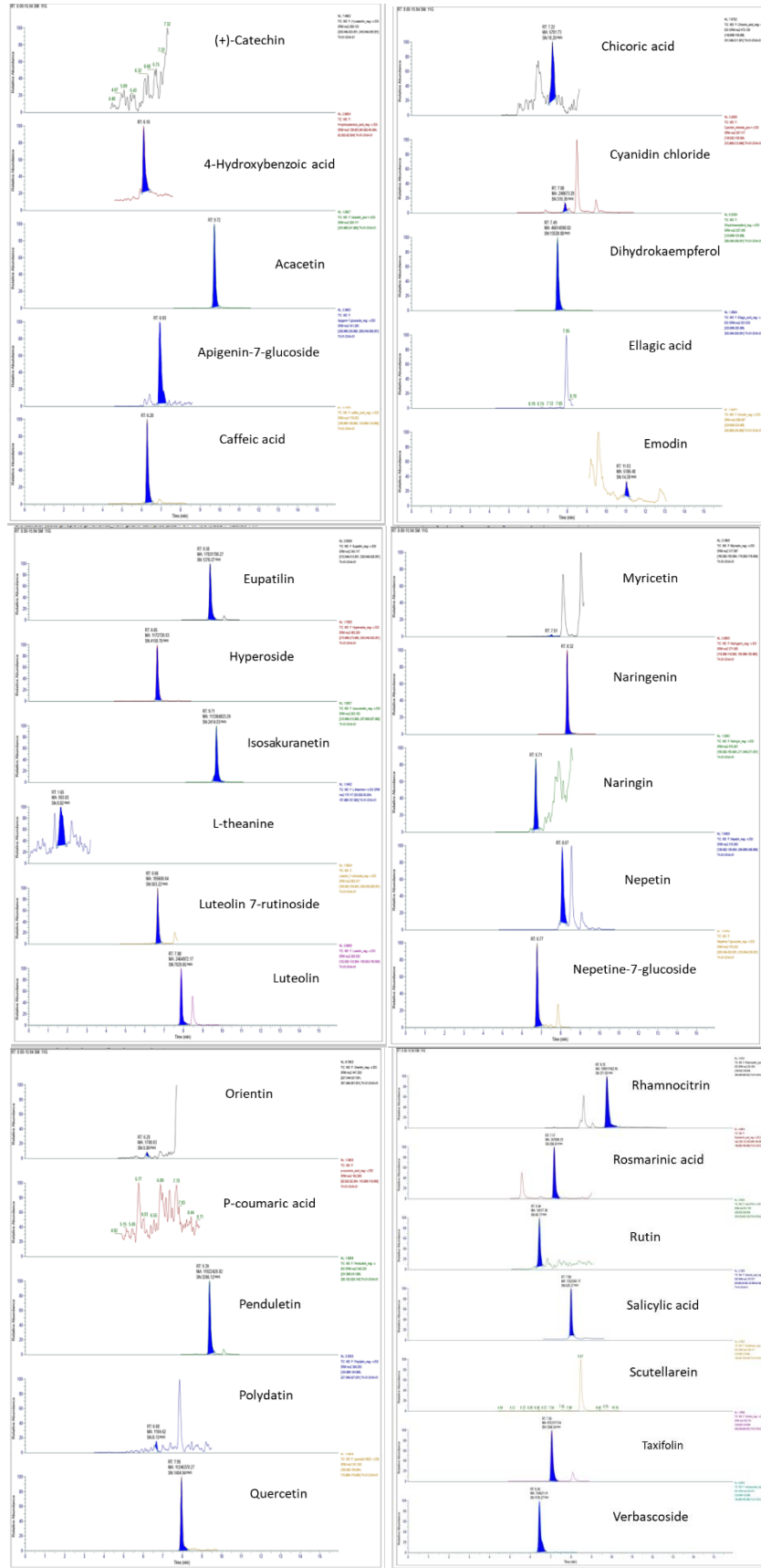
Şekil 3.3: IVA ekstresine ait kromatogramlar



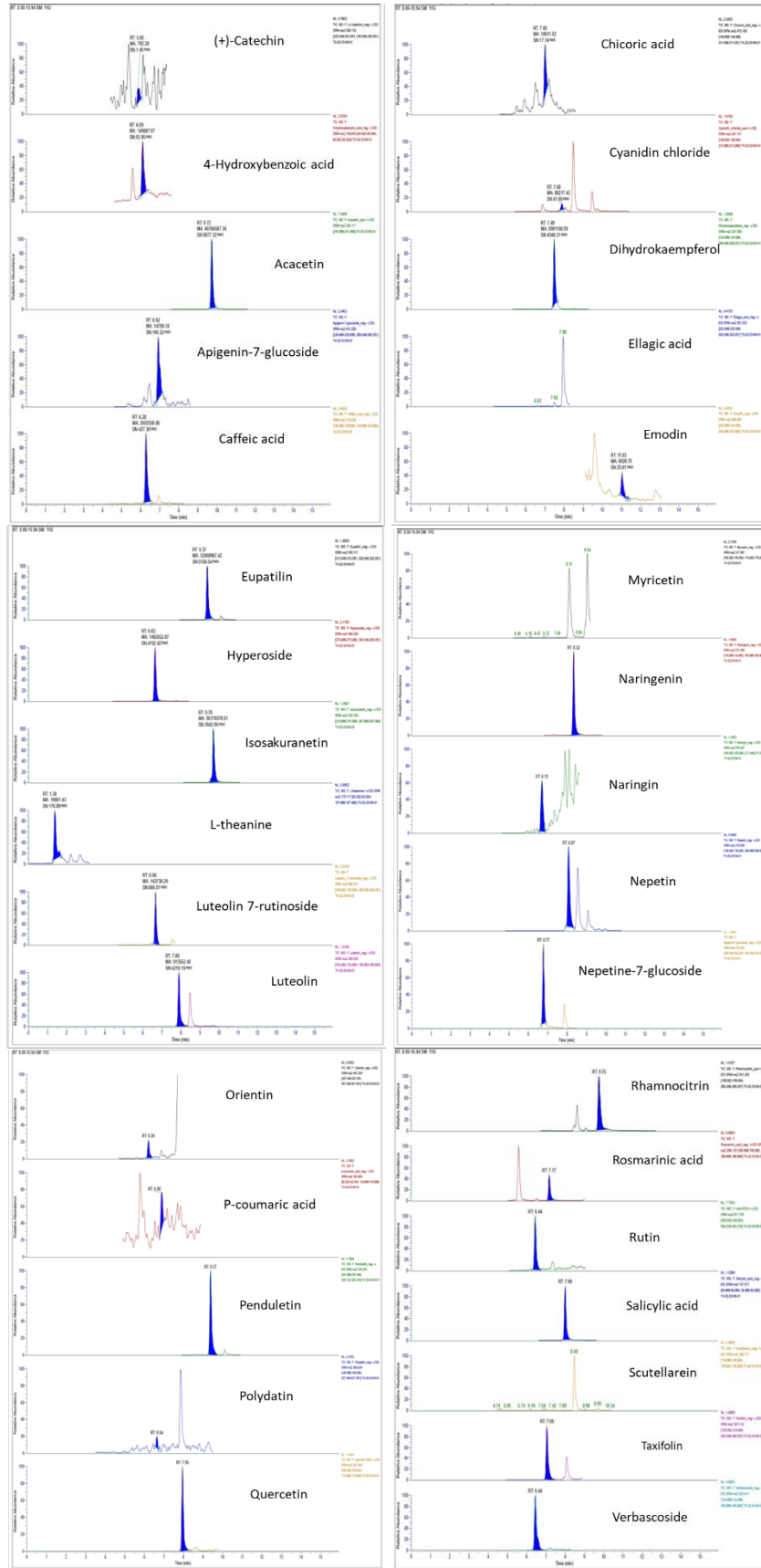
Şekil 3.4: IVM ekstreğine ait kromatogramlar



Şekil 3.5: DIVPE ekstresine ait kromatogramlar



Şekil 3.6: DIVA ekstresine ait kromatogramlar



Şekil 3.7: DIVM ekstreğine ait kromatogramlar

3.2.2 Bitki Çayının LC-MS/MS Analizi Sonuçları

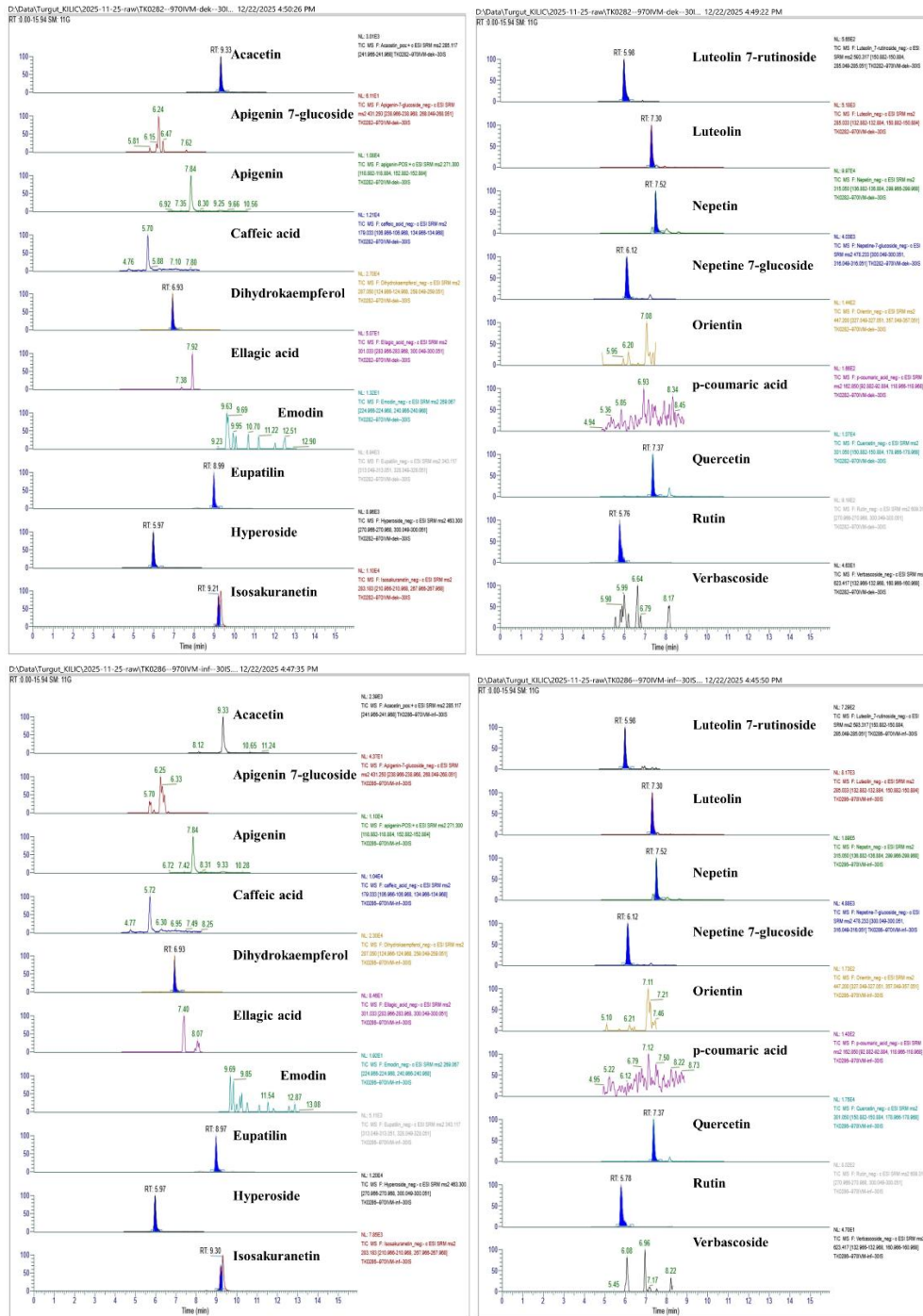
Inula viscosa bitki materyalinden hazırlanan dekoksasyon (IV-dek) ve infüzyon (IV-inf) ekstraktlarının LC-MS/MS analizi ile belirlenen fitokimyasal profili ve bileşen dağılımları Tablo 3.4’te sunulmuştur.

Tablo 3.4: Sulu ekstrelerde tayin edilen bileşikler ve miktarları (mg/kg)

	Örneğin Kodu		Bağl
Bileşik ismi	IV-dek	IV-inf	Belirsizlik %
Flavonoidler ve türevleri			
Akasetin	0.001	<LOQ	5.2
Apigenin-7-glukozit	<LOQ	<LOQ	4.5
Apigenin	<LOQ	<LOQ	4.8
Dihidro Kempferol	0.091	0.055	4.1
Öpatilin	0.005	0.003	5.2
Hiperozit	0.154	0.142	5.6
İzosakuranetin	0.023	0.010	6.4
Luteolin-7-rutinozit	0.005	0.003	3.7
Luteolin	0.120	0.142	5.7
Nepetin	0.151	0.181	5.4
Nepetin-7-glukozit	0.654	0.530	3.9
Orientin	<LOD	<LOD	6.0
Kuersetin	0.115	0.140	4.4
Rutin	0.022	0.020	4.1
Fenolik asitler			
Kafeik asit	<LOQ	<LOQ	6.3
Elajik asit	<LOD	<LOD	3.8
p-kumarik asit	<LOQ	<LOQ	4.2
Fenolik Glikozitler ve Diğer Polifenoller			
Verbaskozit	<LOD	<LOD	4.6
Antrakınon			
Emodin	<LOD	<LOD	3.9
Toplam (mg/kg) kuru bitki	1.341	1.226	

LOD (Limit of Detection): Analiz edilen yöntemin numune içerisinde bulunan bir maddeyi tespit edebildiği en düşük konsantrasyon

LOQ (Limit of Quantification): Numune içerisindeki bir maddenin sayısal olarak ölçülebildiği en düşük konsantrasyon

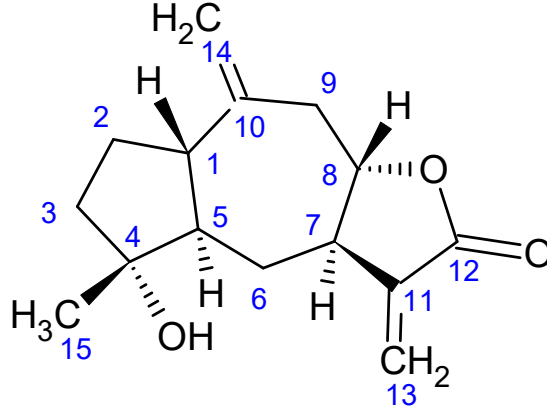


3.3 *Inula viscosa* Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler

Inula viscosa bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlan hekzan, aseton ve metanol ekstrelerinden 3 seskiterpen lakton, 1 şalkon bileşiği izole edildi. Elde edilen bileşiklerin yapıları:

- İnuviskolit [(3aS,5aS,8R,8aR,9aR)-8-hidroksi-8-metil-1,5-dimetiliden-3a,4,5a,6,7,8a,9,9a-oktahidroazuleno[6,5-b]furan-2-on] **(1)**
- Tomentosin [(3aR,7S,8aR)-7-metil-3-metiliden-6-(3-oksobütil)-4,7,8,8a-tetrahidro-3aH-siklohepta[b]furan-2-on)] **(2)**
- Karabron [(3aR,4aS,5S,5aR,6aR)-5a-metil-3-metiliden-5-(3-oksobütil)-3a,4,4a,5,6,6a-heksahidrosiklopropa[f][1] benzofuran-2-on] **(3)**
- Pulişalkonoit C [(2S,3R)-1-(2-Metoksi-4,6-dihidroksifenil)-2,3-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-1-propanon] **(4)**

3.3.1 İnuviskolit [(3aS,5aS,8R,8aR,9aR)-8- hidroksi-8-metil-1,5-dimetiliden-3a,4,5a,6,7,8a,9,9a-oktahidroazuleno[6,5-b]furan-2-on]



İnuviskolit bileşiği *I.viscosa* bitkisinin metanol ekstresinden, 9.5 DCM(CH₂Cl₂): 0.5 Ac (aseton) sisteminde toplam 0.43 g beyaz toz şeklinde elde edilmiştir.

¹H-NMR spektrumunda δ 6.24 ve 5.55 ppm'de (A ve B piki) izlenen doublet pikler lakton halkasına bağlı olan ekzometilenin (C-13) üzerindeki hidrojenlerdir. Karbonil grubuna çok yakın oldukları için "deshielding" (perdelememe) etkisinden dolayı daha aşağı alanda izlenmiştir. C ve D pikleri (5.11 ve 4.98 ppm) ana halka üzerindeki diğer ekzometilen (C14) grubunun hidrojenleridir. Etraflarında güçlü bir elektron çekici grup (karbonil gibi) olmadığı için daha yukarı alanda izlenmiştir. E piki (δ 4.32 ddd) lakton halkasının iskelete bağlandığı karbon (C-8) üzerindedir. Molekülün stereokimyasını ve halka kapanmasını kanıtlayan bir sinyaldir. Protonun doğrudan bir oksijen atomuna komşu olması, onun elektron yoğunluğunu azaltarak sinyali aşağı alana kaydırır. Sinyalin 'ddd' olmasının anlamı, H-8 protonunun üç farklı komşu protonla etkileşime (coupling) girmesidir (H-7, H-9a ve H-9b). δ 2.8-1.4 ppm arası bölge, molekülün ana iskeletini oluşturan alifatik protonların bulunduğu bölgedir.

¹³C-APT NMR spektrumunda 1 metil, 6 metilen, 4 metin, 4 kuaterner olmak üzere toplam 15 adet karbon piki gözlemlendi. δ 170.15 ppm bir ester veya lakton karbonili için çok karakteristiktir. Karbonil karbonu (C=O), oksijene çift bağla bağlı olduğu için çok şiddetli bir perdelememe etkisine maruz kalır ve en aşağı alanda çıkar. 170 ppm olması, bunun bir α,β -doymamış- γ -lakton karbonili olduğunu kanıtlar. δ 146.60 ppm (C11) piki lakton halkasındaki çift bağın halkaya bağlı kısmıdır. Yanındaki karbonil grubu elektron çektiği

için sinyal daha aşağı alana kaymıştır. δ 139.58 ppm (C10) piki ana halkadaki ekzometilenin halkaya bağlı olduğu kuaterner karbondur. δ 120.46 ve δ 111.76 ppm uç =CH₂ karbonları, aşağı yönde (negatif faz) ve δ 82.35 ppm olan pik ise laktonun halkaya kapandığı yerdeki CH karbondur. 80.51 ppm üzerinde -OH grubu taşıyan kuaterner karbondur. Spektrumda negatif fazda izlenen sinyallerin varlığı, yapıda bulunan dört adet metin -CH karbonu ile -CH₃ grubunun varlığını ve bunların stereokimyasal çevrelerini kanıtlamaktadır.

Bileşiğin HSQC spektrumu incelendiğinde, proton ve karbon sinyalleri arasındaki doğrudan etkileşimler net bir şekilde gözlenmiştir. Spektrumdaki çapraz pikleri (cross-peaks) incelediğimizde, δ 119.21 ppm'deki C piki δ 6.17 ve 5.48 piki ile eşleşiyor. Bu durumda C13 karbonuna H-13a ve H-13b protonları ile korelasyon göstermesi bu karbonun iki proton taşıyan bir -CH₂ karbonu olduğunu kanıtlamaktadır. Aynı durum δ 5.03 ve 4.90 protonlarının δ 110.51 ppm'deki karbon sinyali ile eşleşmesi C14 ekzometileni için de geçerlidir. δ 1.14 protonların δ 23.19 karbonu ile kurduğu etkileşim ise -CH₃ için en net kanıttır. δ 170.15, 146.60, 139.58 ve 80.51 ppm'de rezonans olan karbon sinyallerinin, HSQC spektrumunda proton eşleşmesine sahip olmaması, bu merkezlerin hidrojen taşımayan kuaterner karakterini 2D NMR verileriyle doğrulamaktadır.

İnuiskolit: beyaz toz formunda, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 6.24 (1H, d, J= 3.5 Hz, H-13a), 5.55 (1H, d, J=3.0 Hz, H-13b), 5.11 (1H, s, H-14a), 4.98 (1H, s, H-14b), 4.32 (1H, ddd, J=14.0, 9.5, 4.5 Hz, H-8), 3.20 (1H, m, H-1), 2.66 (1H, m, H-7), 2.57 (1H, dd, J=14.0, 4.0 Hz, H-9a), 2.31 (1H, m, H-5), 1.96-1.56 (9H, m, iskelet protonları: H-2, H-3, H-6, H-9b), 1.25 (3H, s, H-15).

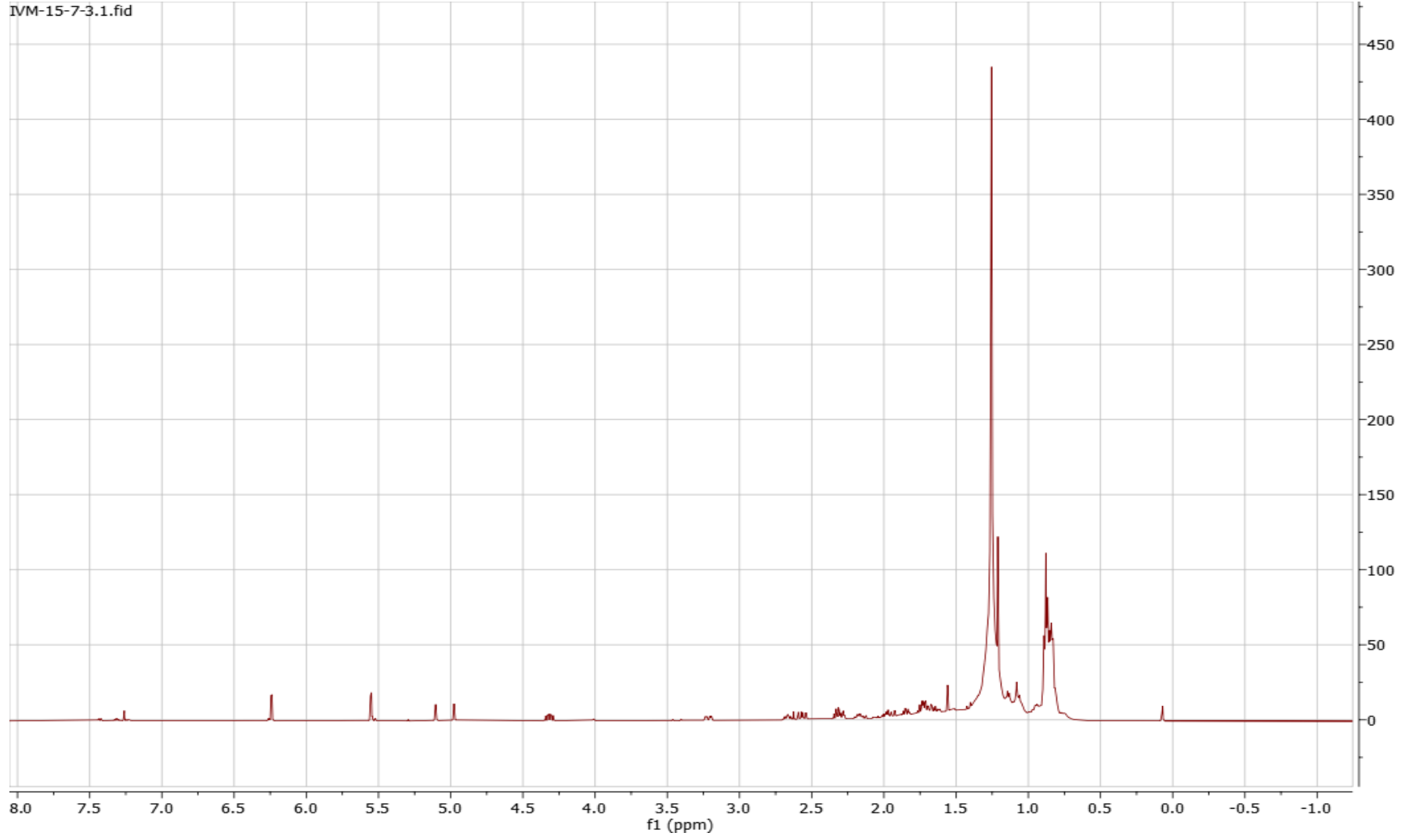
¹³C APT NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.15 (C-12, C=O), 146.40 (C-11), 139.58 (C-10), 120.46 (C-13, =CH₂), 111.76 (C-14, =CH₂), 82.35 (C-8, C-O), 80.51 (C-4), 59.19 (C-5), 45.39 (C-7), 46.9 (C-1), 41.00 (C-3), 38.01 (C-9), 29.76 (C-6), 26.93 (C-2), 24.03 (C-15 -CH₃).

HSQC: δ_C/δ_H : 119.21/6.17 (C-13/H-13a), 119.21/5.48 (C-13/H-13b), 110.51/5.03 (C-14/H-14a), 110.51/4.90 (C-14/H-14b), 23.19/1.14 (C-15/H-15).

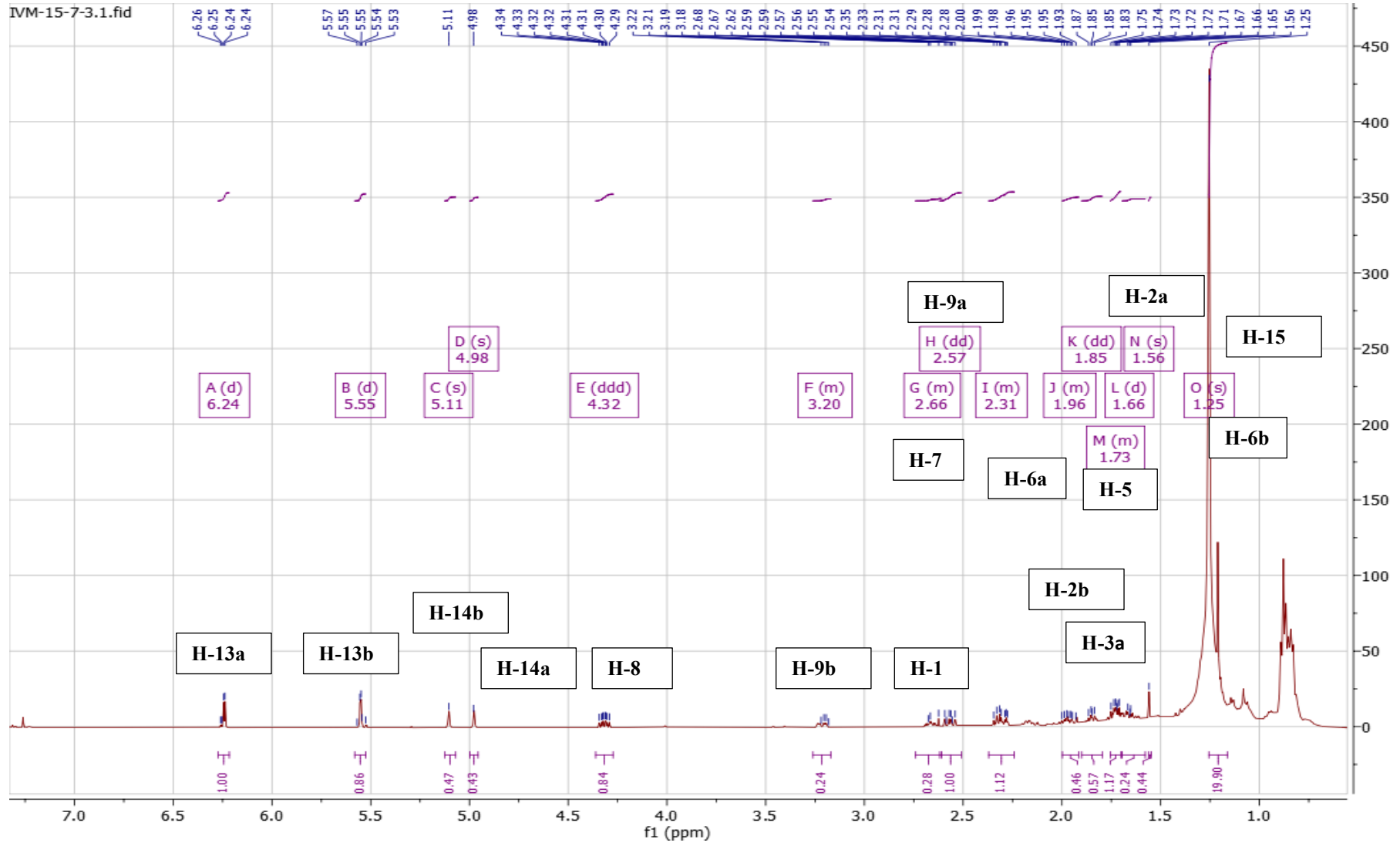
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olması yapının inuviskolit olduğu görüşünü desteklemiştir (Mossa vd.,1997).

Tablo 3.5: İnuviskolit bileşiğinin ^1H -NMR ve ^{13}C -APT NMR verileri

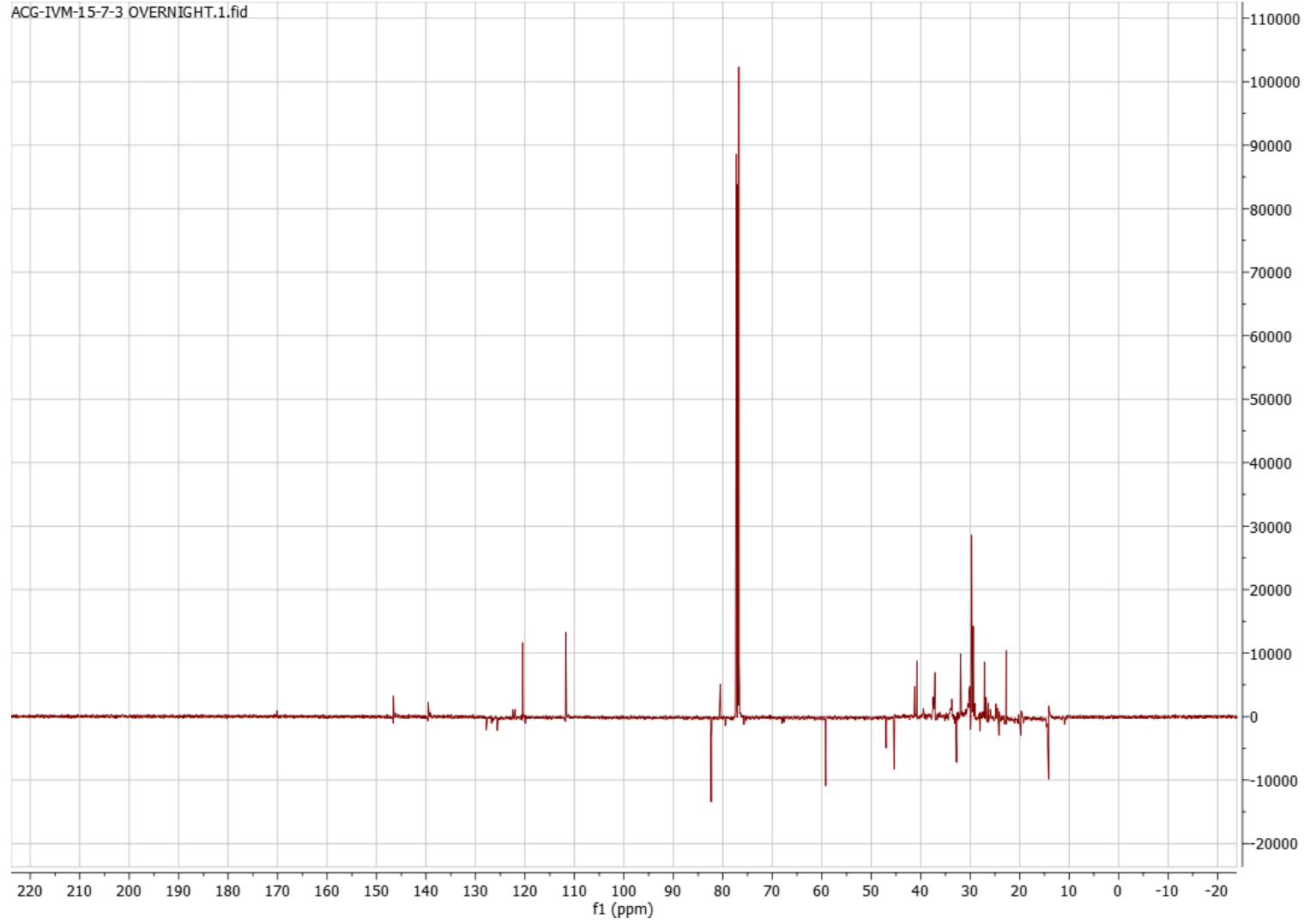
Karbon ve proton no	^1H NMR	^{13}C APT NMR
1	2.66	46.90
2a	1.96 m	26.93
2b	1.56 s	
3a	1.85 dd	41.00
3b	1.66 d	
4		80.51
5	1.73 m	59.19
6a	2.31 m	29.76
6b	1.25 s	
7	2.66 m	45.39
8	4.32 ddd (14.0, 9.5, 4.5 Hz)	82.35
9a	2.57 dd	38.01
9b	(14.0, 4.0 Hz) 3.20 m	
10		139.58
11		146.40
12		170.15
13a	6.24 d (3.5 Hz)	120.46
13b	5.55 d (3.0 Hz)	
14a	4.98 s	111.76
14b	5.11 s	
15	1.25 s	24.03



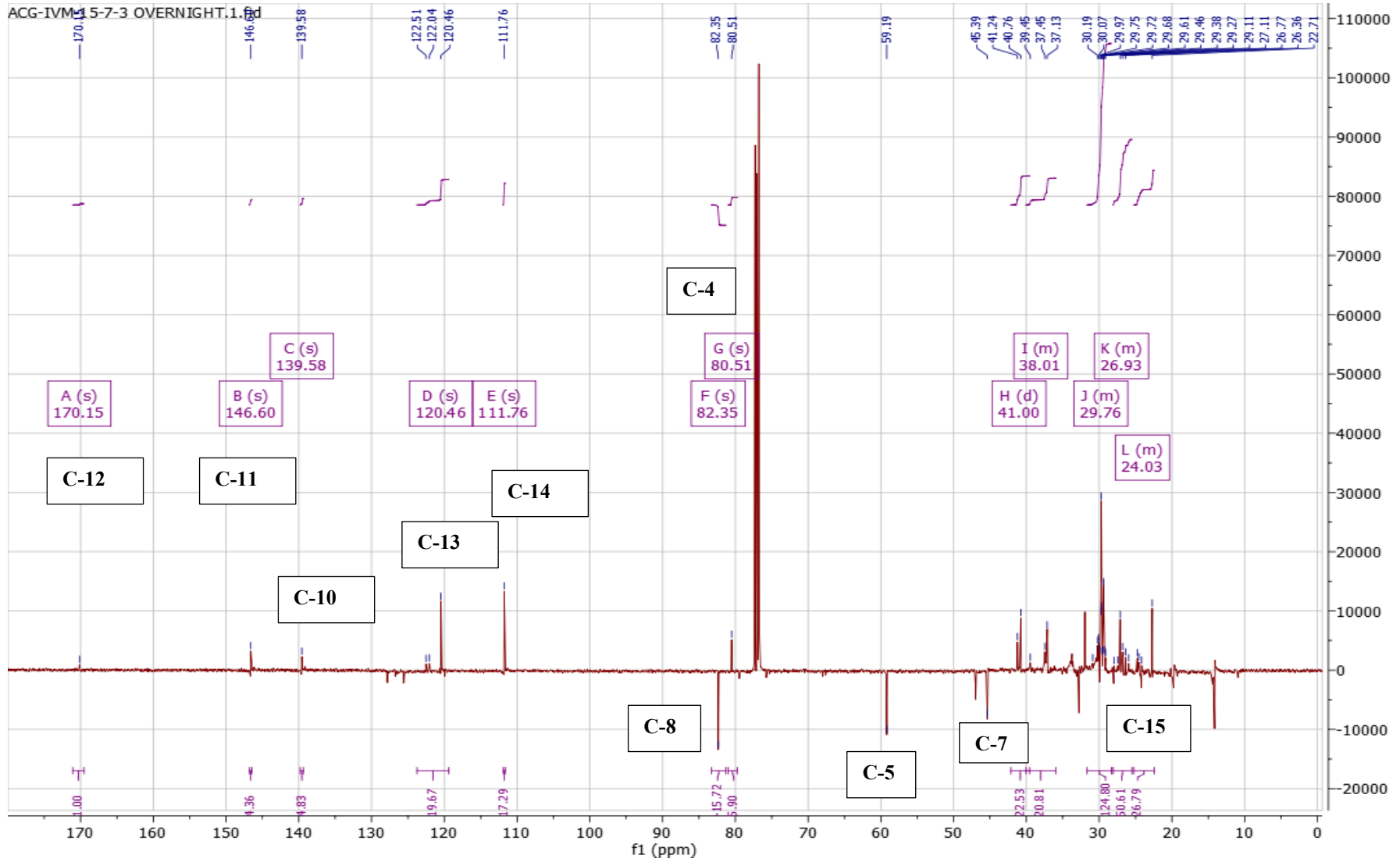
Şekil 3.9: İnviskolit bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu 1



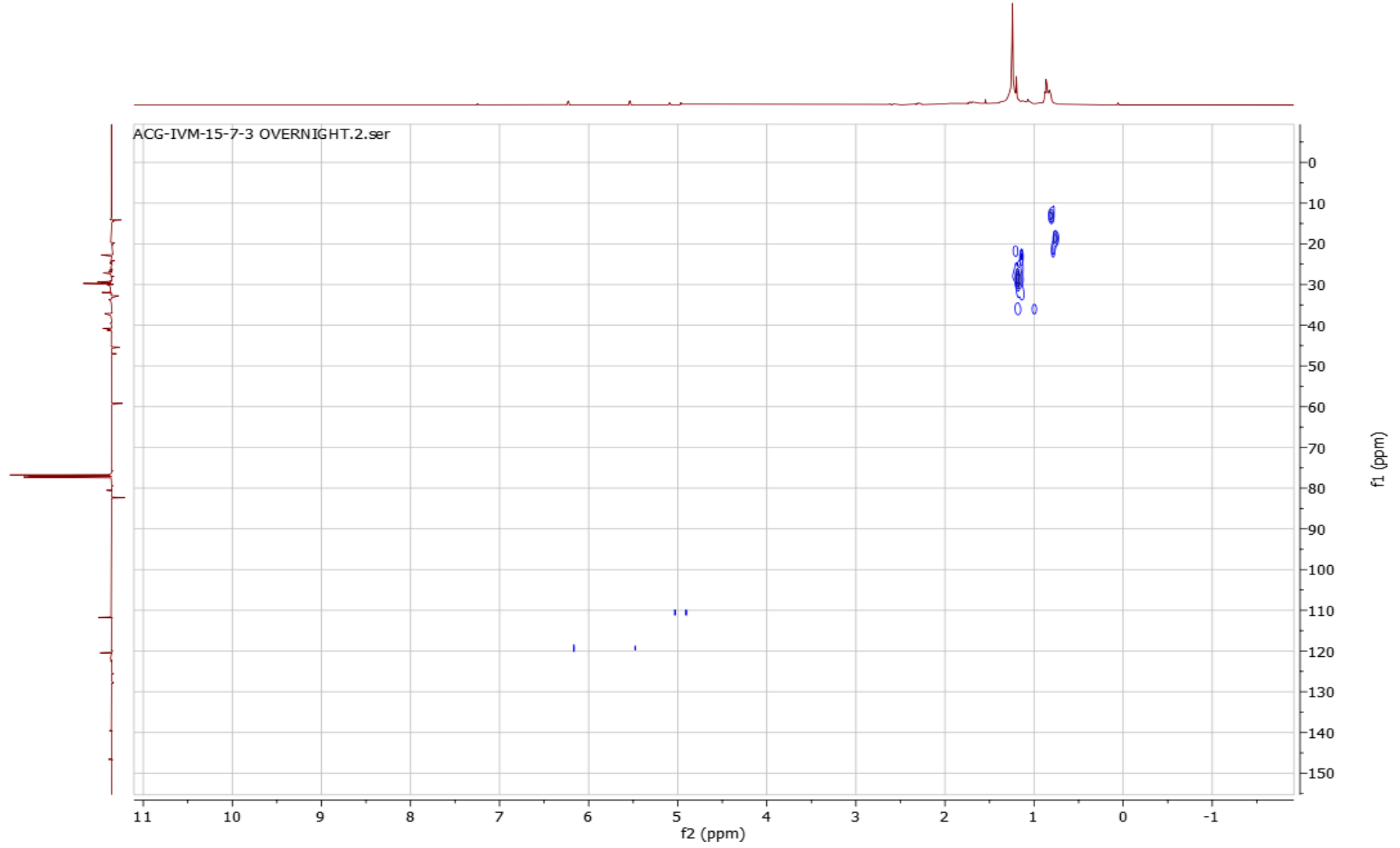
Şekil 3.10: İnuviskolit bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu 2



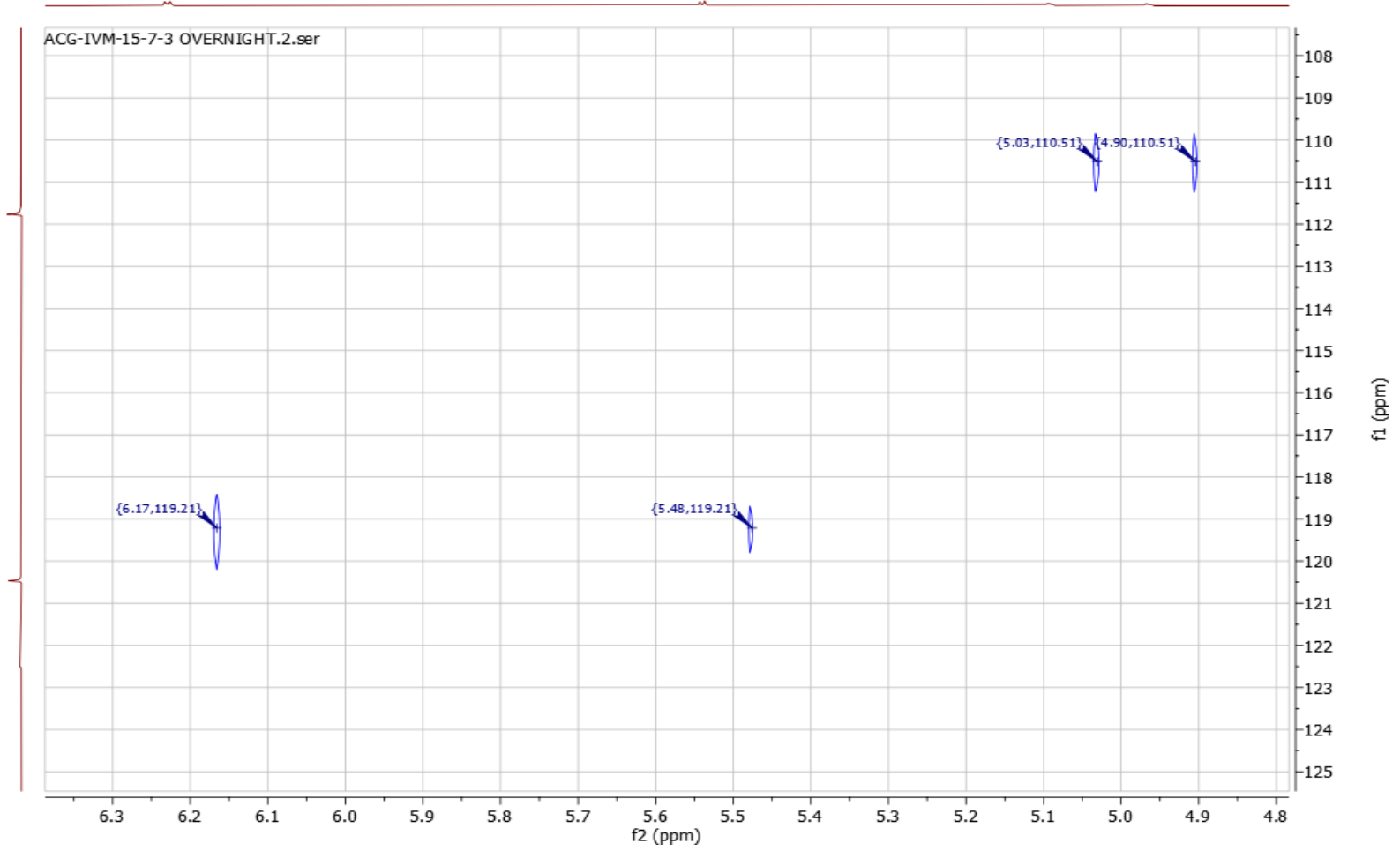
Şekil 3.11: İnuiskolit bileşiğinin ^{13}C -APT NMR Spektrumu 1



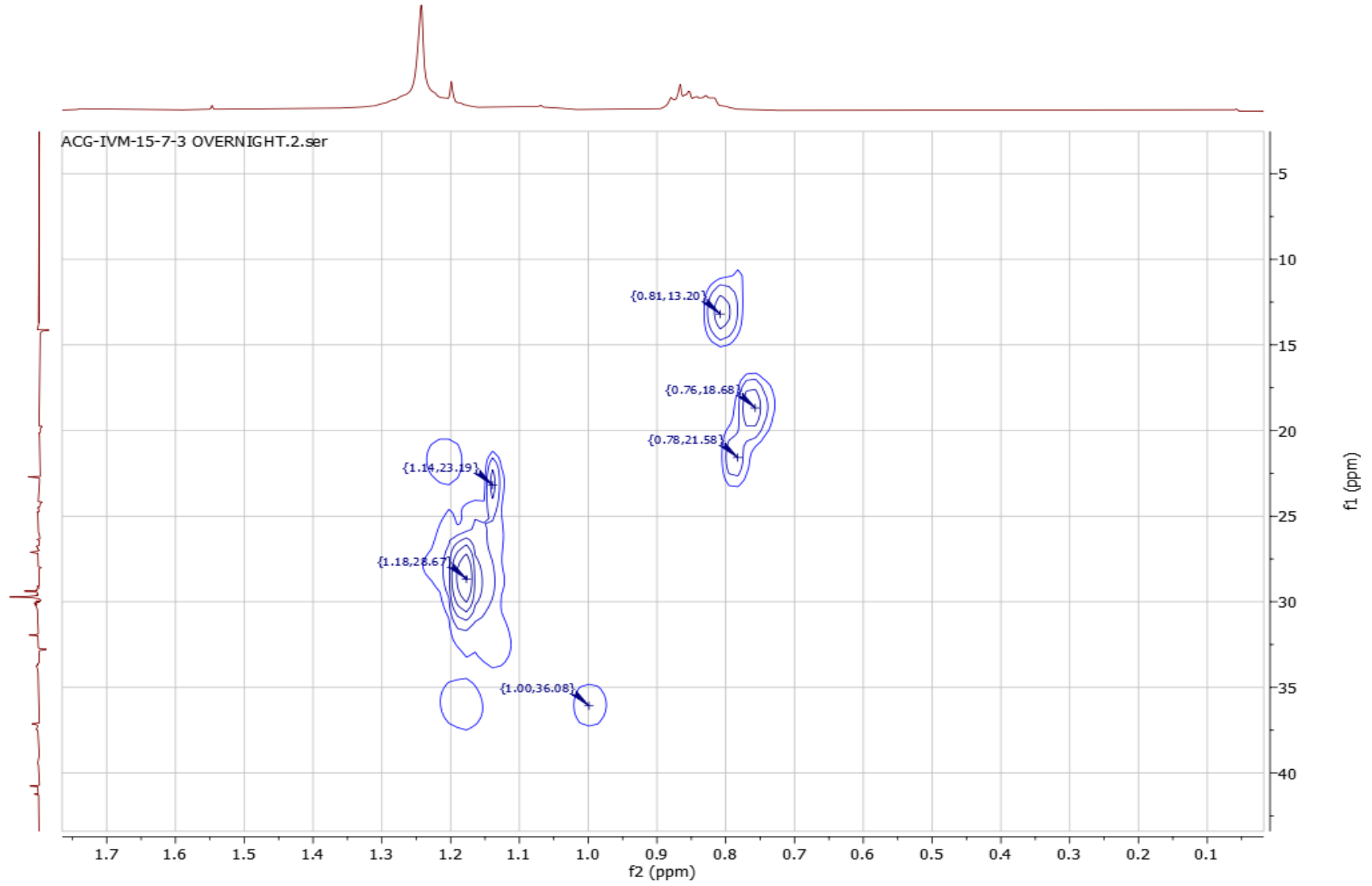
Şekil 3.12: İnuviskolit bileşiğinin ^{13}C -APT NMR Spektrumu 2



Şekil 3.13: İnuviskolit bileşiğinin HSQC Spektrumu 1

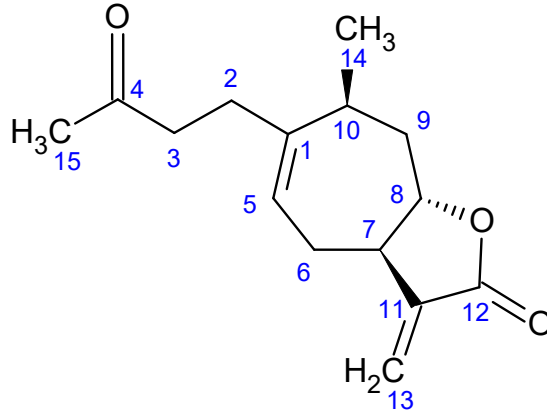


Şekil 3.14: İnuviskolit bileşiğinin HSQC Spektrumu 2



Şekil 3.15: İnuviskolit bileşiğinin HSQC Spektrumu 3

3.3.2 Tomentosin [(3aR,7S,8aR)-7-metil-3-metiliden-6-(3-oksobütil)-4,7,8,8a-tetrahidro-3aH-siklohepta[b]furan-2-on)]



Elde edilen NMR spektrumları detaylıca incelendiğinde, numunenin saf bir bileşikten ziyade, yapısal olarak birbirine çok yakın iki seskiterpen lakton olan karabron ve tomentosin'in bir karışımı olduğu görülmektedir. Spektrumdaki sinyal şiddetleri (integral değerleri) ve karakteristik kimyasal kaymalar, karabron'un majör bileşen, tomentosin'in ise minör bileşen olarak yapıda yer aldığını kanıtlamaktadır.

^1H NMR spektrumu incelendiğinde; en düşük alanda, $\delta 6.24$ ppm ve 5.44 ppm değerlerinde gözlenen iki ayrı dubletin dubleti (dd) sinyali, yapıdaki, α -metilen- γ -lakton birimine ait H-13a ve H-13b ekzometilen protonlarını temsil etmektedir. Bu protonların farklı kaymaları, karbonil grubuna olan mesafelerinden kaynaklanan manyetik anizotropi etkisidir. 5.53 ppm'deki sinyal, C-4 ketonuna komşu olan H-5 protonunu temsil ederken; 4.77 ppm'deki sinyal laktonun bağlandığı C-8 üzerindeki H-8 protonuna karşılık gelir. H-8 sinyalinin düşük alanda çıkması oksijenin perdeleme etkisinden, yüksek kenetlenme sabiti (11.4 Hz) ise H-7 ile trans/aksial yöneliminden kaynaklanır. Alifatik bölgede, 2.15 ppm'deki singlet sinyali C-15 metil protonlarına, 1.13 ppm'deki dublet sinyali ise sekonder karakterdeki C-14 metil protonlarına atfedilmiştir.

^{13}C NMR spektrumu incelendiğinde $\delta 208.46$ ppm (C-4) ve 169.85 ppm (C-11) değerlerinde gözlenen kuaterner sinyaller, sırasıyla yapıdaki keton ve lakton karbonlarına atfedilmiştir. 146.84 ppm (C-12) ve 139.77 ppm (C-1) sinyalleri, iskelet üzerindeki çift bağlara ait kuaterner karbonları temsil etmektedir. 122.28 ppm'deki sinyal (C-13), ekzometilen grubunun CH_2 karbonuna; 120.35 ppm'deki sinyal (C-5) ise halka üzerindeki CH karbonuna karşılık gelmektedir. Halkadaki lakton kapanma noktasını gösteren 79.49

ppm'deki sinyal (C-8), oksijene komşu metin karbonuna atfedilmiştir. Alifatik bölgede 42.88 ppm (C-3), 42.38 ppm (C-7) ve 37.13 ppm (C-9) sinyalleri iskeletin ana gövdesini oluşturmaktadır. Metil gruplarına bakıldığında; 30.68 ppm'deki sinyal (C-15) keton komşusu metil grubunu, 22.93 ppm'deki sinyal (C-14) ise sekonder metil grubunu temsil etmektedir.

Spektrum genelinde gözlenen sinyal çiftleri ve integral oranları, numunenin majör bileşen olarak karabron, minör bileşen olarak ise tomentosin içerdiğini göstermiştir. Bu ayrımın en belirgin kanıtı, ^1H NMR spektrumunda δ 4.77 ppm ve 4.64 ppm değerlerinde gözlenen iki farklı H-8 sinylidir; burada karabron'a ait olan 4.77 ppm sinyali belirgin şekilde daha yüksek bir şiddete sahiptir. Benzer şekilde, ^{13}C NMR spektrumunda 139.77 ppm (C-1) ve 122.28 ppm (C-13) gibi temel iskelet karbonlarının yanında gözlenen düşük şiddetli pikler, iki yapının izomerik benzerliğini ve karışım oranını desteklemektedir. Karabron'un baskınlığı, özellikle alifatik bölgedeki metil sinyallerinin integral değerleri ve ekzometilen protonlarının (H-13a, b) net yarıma modelleri ile doğrulanmıştır. Bu temel verilerin yanı sıra, ekzometilen bölgesindeki H-13b sinyalinin (5.44 ppm) majör bileşen için 0.99 integral değeri vermesi, ancak hemen yanında 0.35 şiddetinde minör bir sinyalin eşlik etmesi, karışım oranının yaklaşık 3:1 olduğunu nicel olarak göstermektedir.

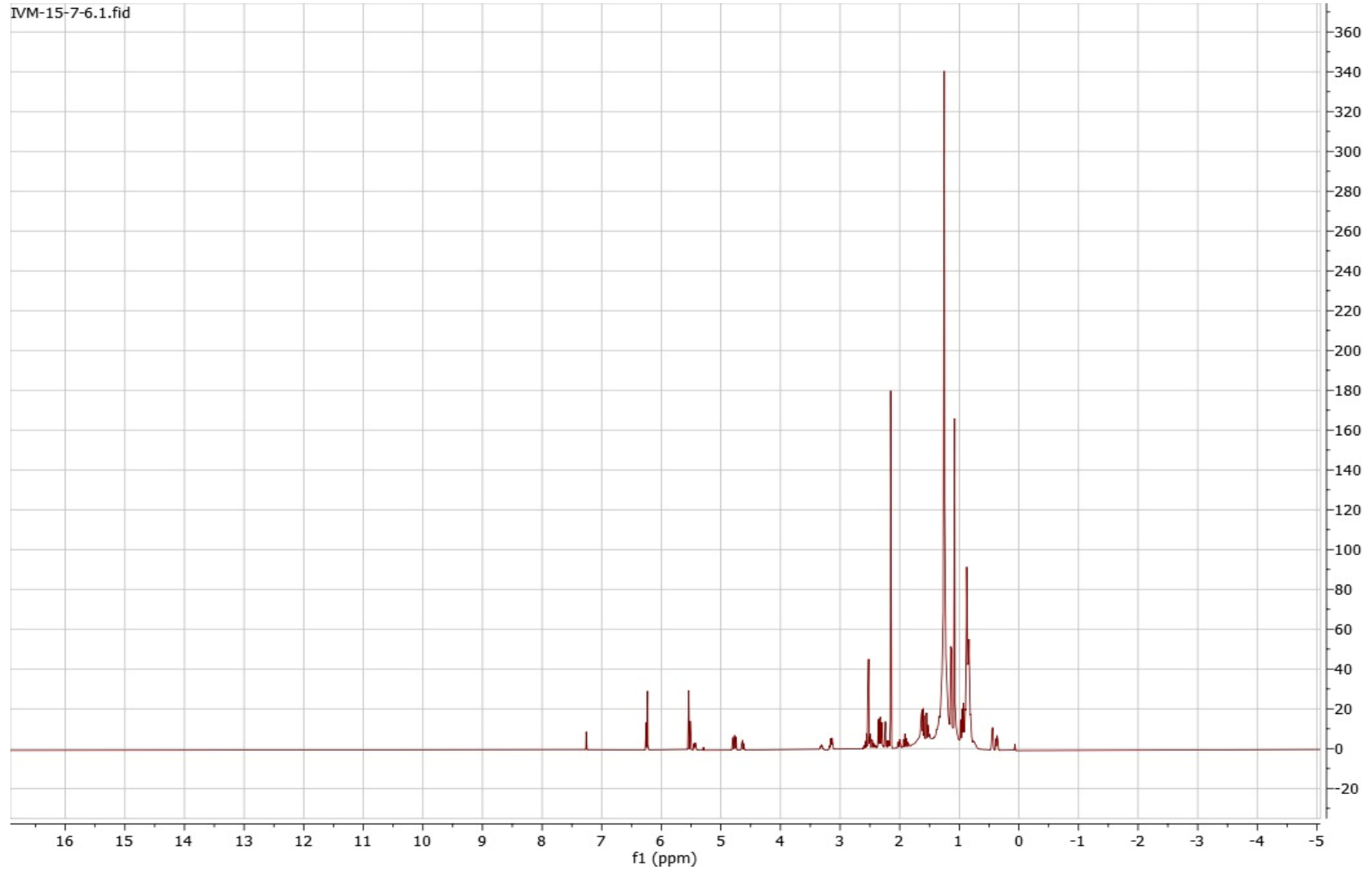
Tomentosin: renksiz toz formunda; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 6.24 (1H, dd, $J=9.9$, 3.0 Hz, H-13a), 5.53 (1H, dd, $J=13.9$, 2.6 Hz, H-5), 5.44 (1H, dd, $J=9.2$, 5.3 Hz, H-13b), 4.77 (1H, ddd, $J=11.4$, 8.8, 6.1 Hz, H-8), 2.55 (1H, m, H-7), 2.47 (1H, m, H-3a), 2.33 (1H, m, H-2a), 2.22 (2H, m, H-6a/H-10), 2.15 (3H, s, H-15), 2.00 (1H, m, H-6b), 1.90 (1H, d, H-9a), 1.13 (3H, d, $J=7$ Hz, H-14).

^{13}C APT NMR (125 MHz, CDCl_3): 208.46 (C-4, C=O), 169.85 (C-11, C=O lakton), 146.84 (C-12), 139.77 (C-1), 122.28 (C-13), 120.35 (C-5), 79.49 (C-8), 42.88 (C-3), 42.38 (C-7), 37.13 (C-9), 35.34 (C-2), 34.50 (C-10), 30.68 (C-15), 27.33 (C-6), 22.93 (C-14).

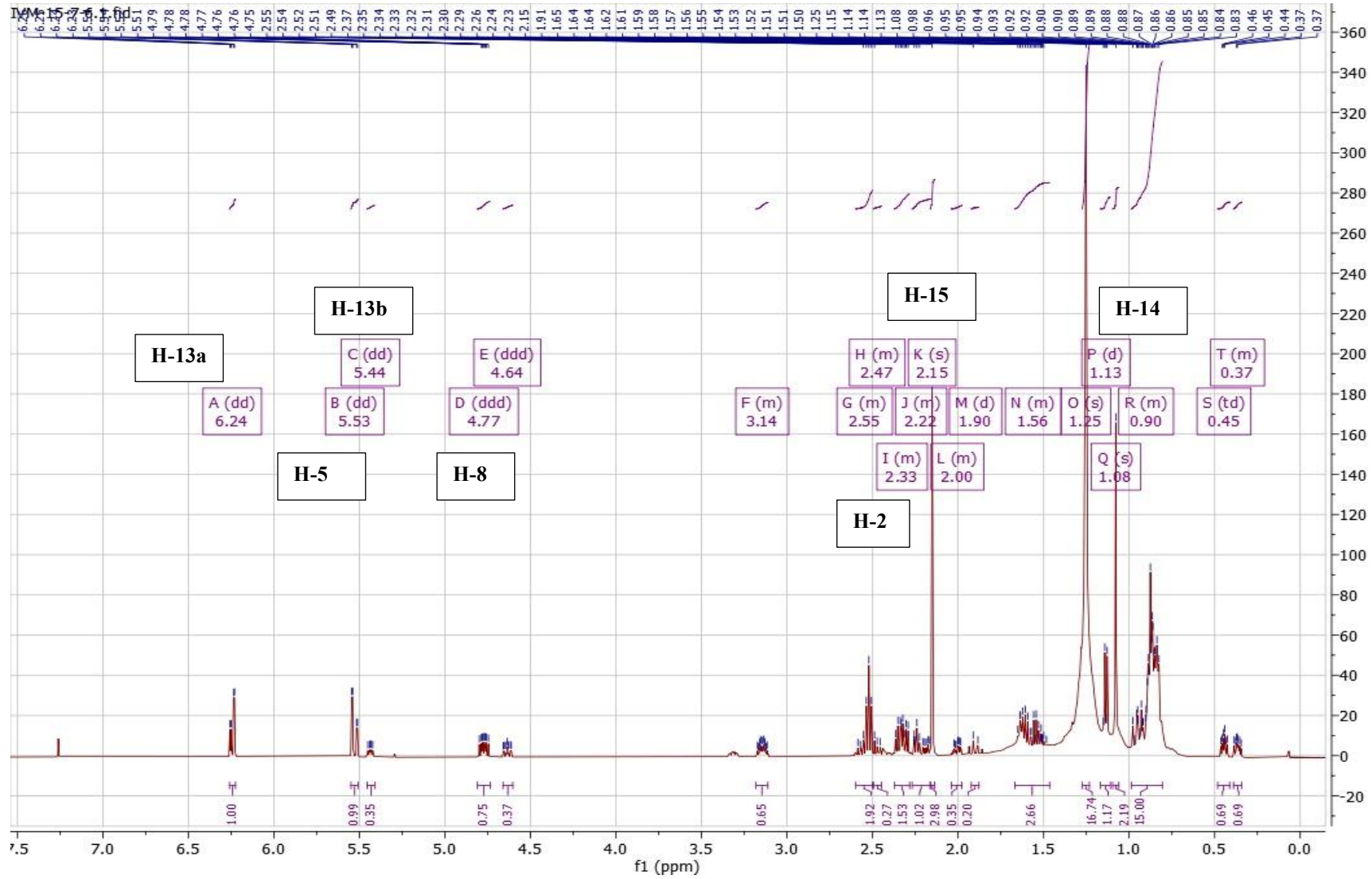
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olması yapının tomentosin olduğu görüşünü desteklemiştir (Alpaslan, 2013; Aydın vd.,2022)

Tablo 3.6: Tomentosin bileşığının ^1H -NMR ve ^{13}C -APT NMR verileri

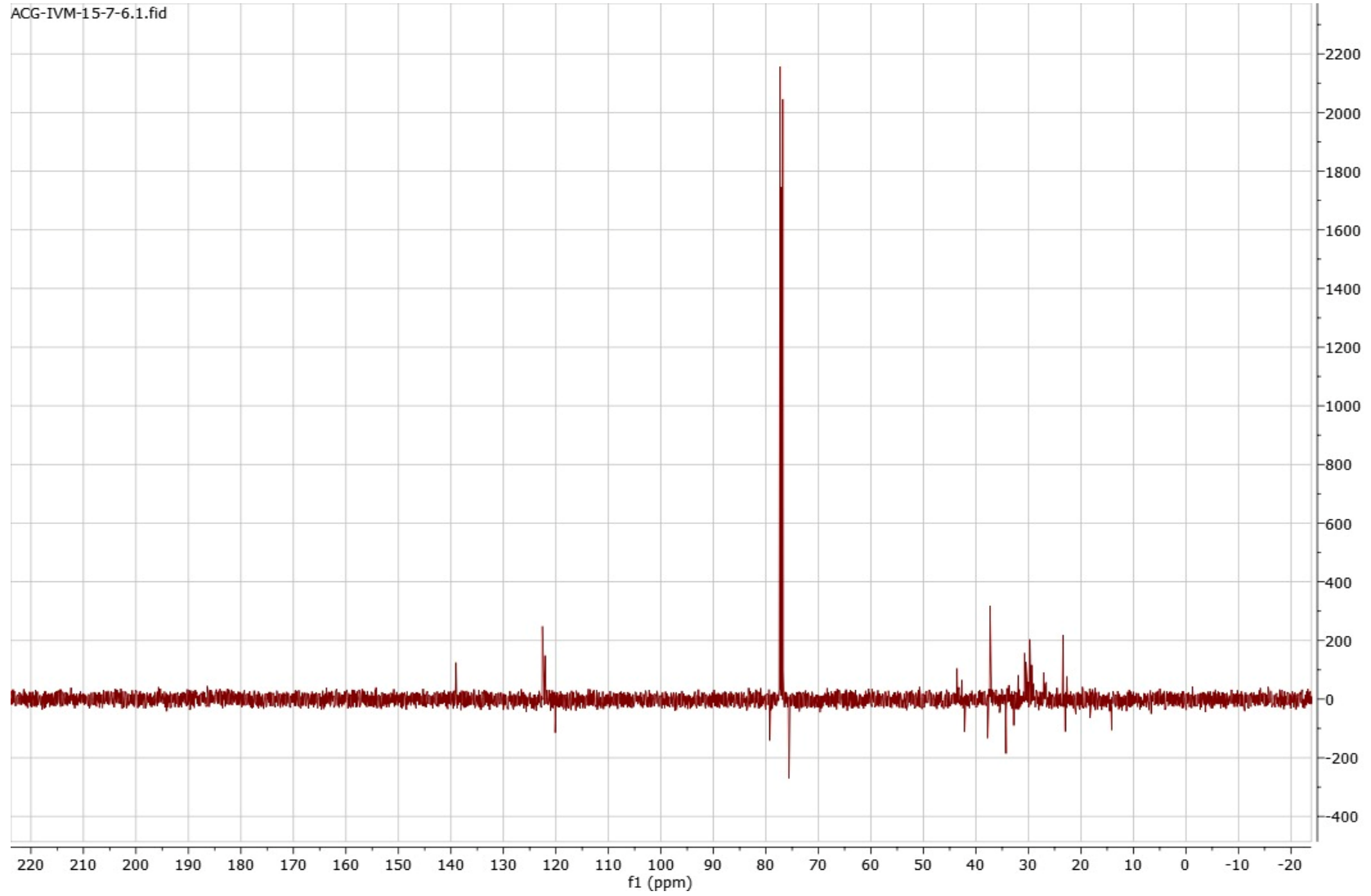
Karbon ve proton no	^1H NMR	^{13}C APT NMR
1	-	139.77
2	2.47 m 2.33 m	35.34
3	2.47 m 2.55 m	42.88
4	-	208.46
5	5.53 dd (J=13.9, 2.6 Hz)	120.35
6a 6b	2.22 m 2.00 m	27.33
7	2.55 m	42.38
8	4.77 ddd (J=11.4, 8.8, 6.1 Hz)	79.49
9a 9b	1.90 d 2.22 m	37.13
10	2.22 m	34.5
11	-	169.85
12	-	146.84
13a 13b	6.24 dd (J=9.9 Hz, 3.0 Hz) 5.44 dd (J=9.2 Hz, 5.3 Hz)	122.28
14	1.13 d (J=7 Hz)	22.93
15	2.15 s	30.68



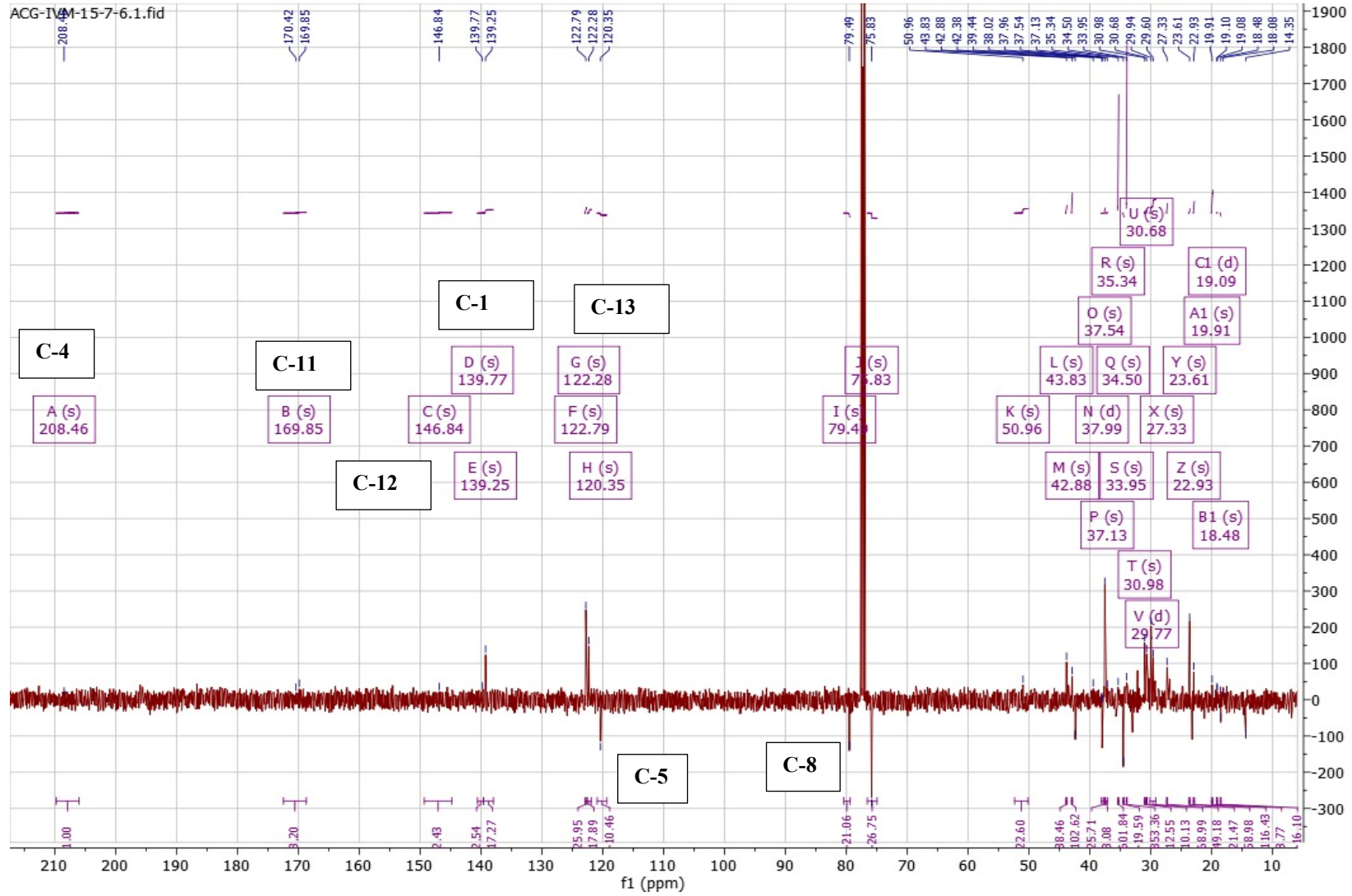
Şekil 3.17: Tomentosin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu 1



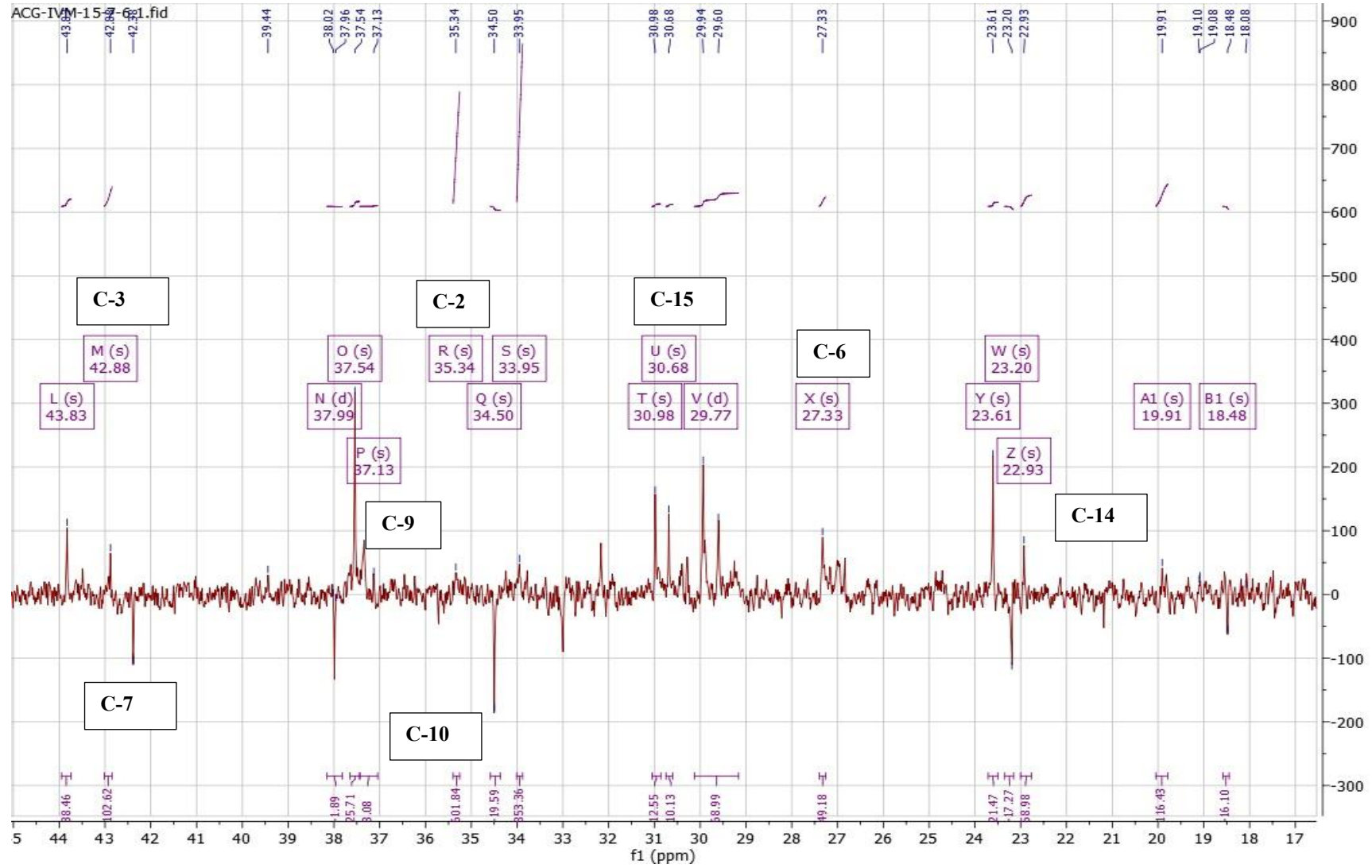
Şekil 3.18: Tomentosin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu 2



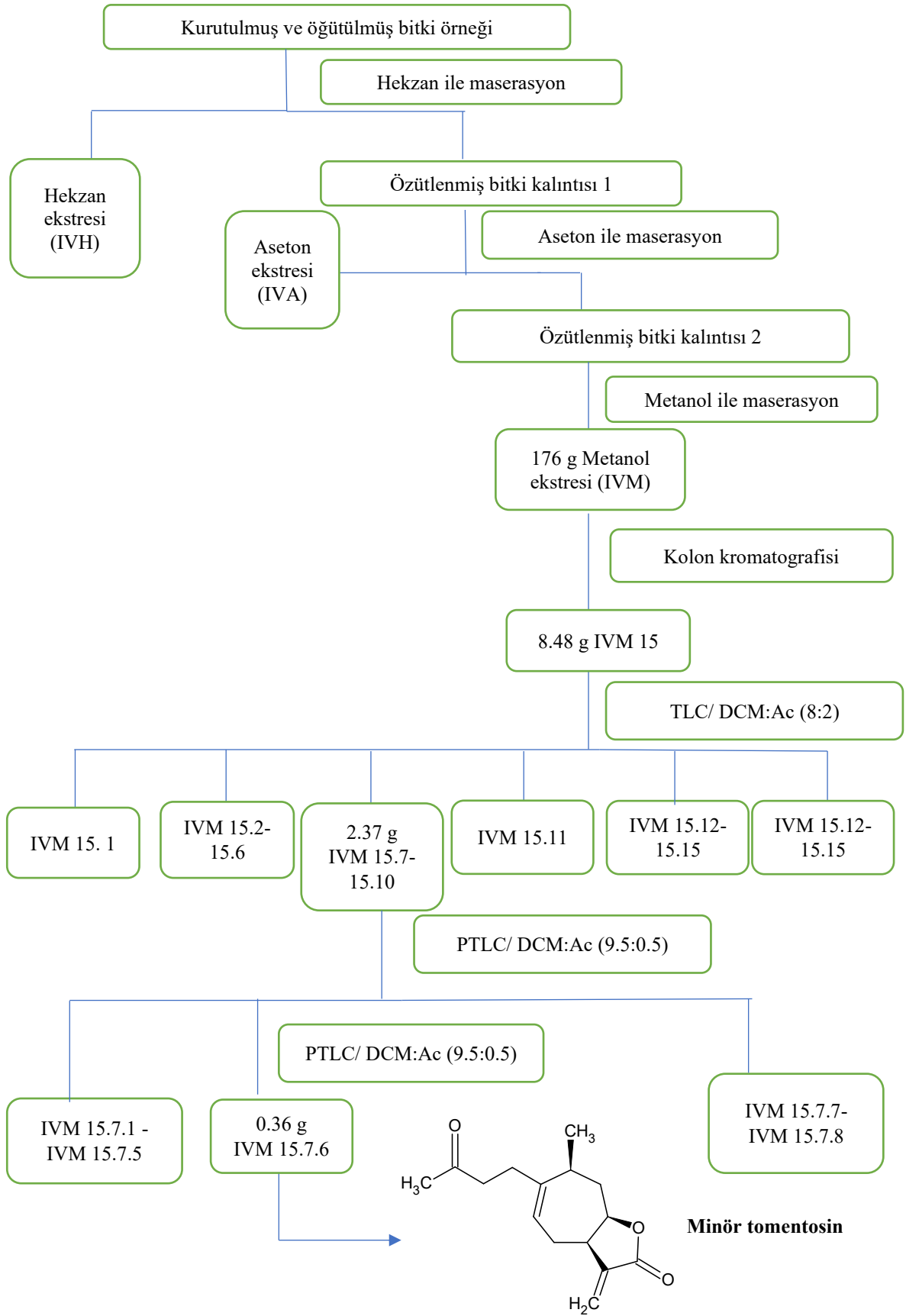
Şekil 3.19: Tomentosin bileşiğinin ^{13}C -APT NMR spektrumu 1



Şekil 3.20: Tomentosin bileşiğinin ^{13}C -APT NMR spektrumu 2

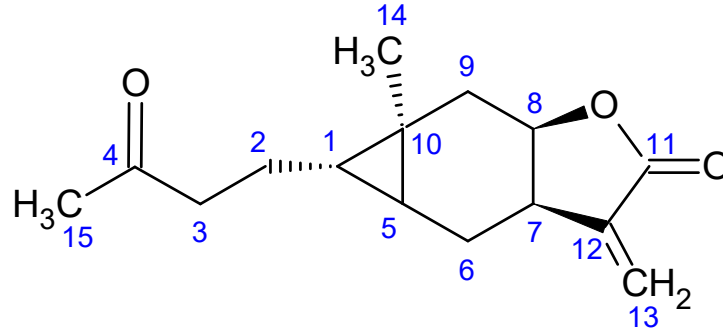


Şekil 3.21: Tomentosin bileşiğinin ^{13}C -APT NMR spektrumu 3



Şekil 3.22: Tomentosin bileşiğinin ekstraksiyon ve izolasyon basamakları

3.3.3 Karabron [(3aR,4aS,5S,5aR,6aR)-5a-metil-3-metiliden-5-(3-oksobütil)-3a,4,4a,5,6,6a-heksahidrosiklopropa[f][1] benzofuran-2-on]



H NMR spektrumu incelendiğinde; en düşük alanda, δ 6.24 ppm'deki sinyal (dd, $J=9.9, 3.0$ Hz) ekzometilen grubunun H-13a protonuna; 5.53 ppm'deki sinyal ise (dd, $J=13.9, 2.6$ Hz) H-13b protonuna atfedilmiştir. Molekülün lakton halkasının kapanma noktasını gösteren 4.64 ppm'deki sinyal (ddd, $J=11.1, 8.6, 2.7$ Hz), oksijene komşu karbon üzerindeki H-8 protonuna karşılık gelmektedir. Karabron yapısını Tomentosin'den ayıran en çarpıcı kanıtlar yüksek alan bölgesinde gözlenmektedir. Yapıdaki siklopropan halkasına ait protonlar, manyetik perdelenme nedeniyle 0.45 ppm (td, $J=7.2, 4.1$ Hz, H-1) ve 0.37 ppm (m, H-5) değerlerinde karakteristik sinyaller vermiştir. Alifatik bölgede, 3.14 ppm'deki multipler sinyal H-7 protonuna; 2.15 ppm'deki keskin singlet C-15 metil protonlarına; 1.08 ppm'deki singlet ise C-14 metil protonlarına atfedilmiştir. İskelet üzerindeki diğer metilen ve metin protonları (H-2, H-3, H-6, H-9, H-10) ise 0.90- 2.47 ppm aralığındaki karmaşık multiplerler şeklinde gözlenmektedir.

^{13}C APT NMR spektrumu incelendiğinde; majör bileşen olarak tanımlanan Karabron molekülün karbon iskeletini karakterize eden 15 temel sinyal üzerinden aydınlatılmıştır. Spektrumda, yapıdaki iki farklı karbonil grubu δ 208.46 ppm (C-4, keton) ve 169.85 ppm (C-12, lakton karbonili) değerlerinde gözlenen kuaterner sinyallerle doğrulanmıştır. Yapının ekzometilen çift bağ karakteri 139.25 ppm (C-11, kuaterner) ve 122.79 ppm (C-13, CH_2) sinyalleri ile temsil edilmektedir. Molekülün stereokimyasal açıdan en kritik noktalarından biri olan lakton halkasının kapanma karbonu (C-8), oksijenin elektronegatif etkisiyle alt alana kayarak 75.83 ppm değerinde sinyal vermiştir. Karabron'un Tomentosin'den ayrılmasını sağlayan en belirgin özellik olan siklopropan halkasına ait karbonlar; 33.95 ppm (C-1), 23.20 ppm (C-5) ve kuaterner karakterdeki 18.48 ppm (C-10) değerlerinde saptanmıştır. Alifatik bölgede, C-4 keton grubuna komşu olan metil karbonu

(C-15) 29.77 ppm'de, halka üzerindeki sekonder metil karbonu (C-14) ise 19.91 ppm'de gözlenmiştir. Diğer iskelet karbonları ise 43.83 ppm (C-3), 37.99 ppm (C-7), 37.54 ppm (C-9), 30.98 ppm (C-6) ve 23.61 ppm (C-2) olarak atanmıştır.

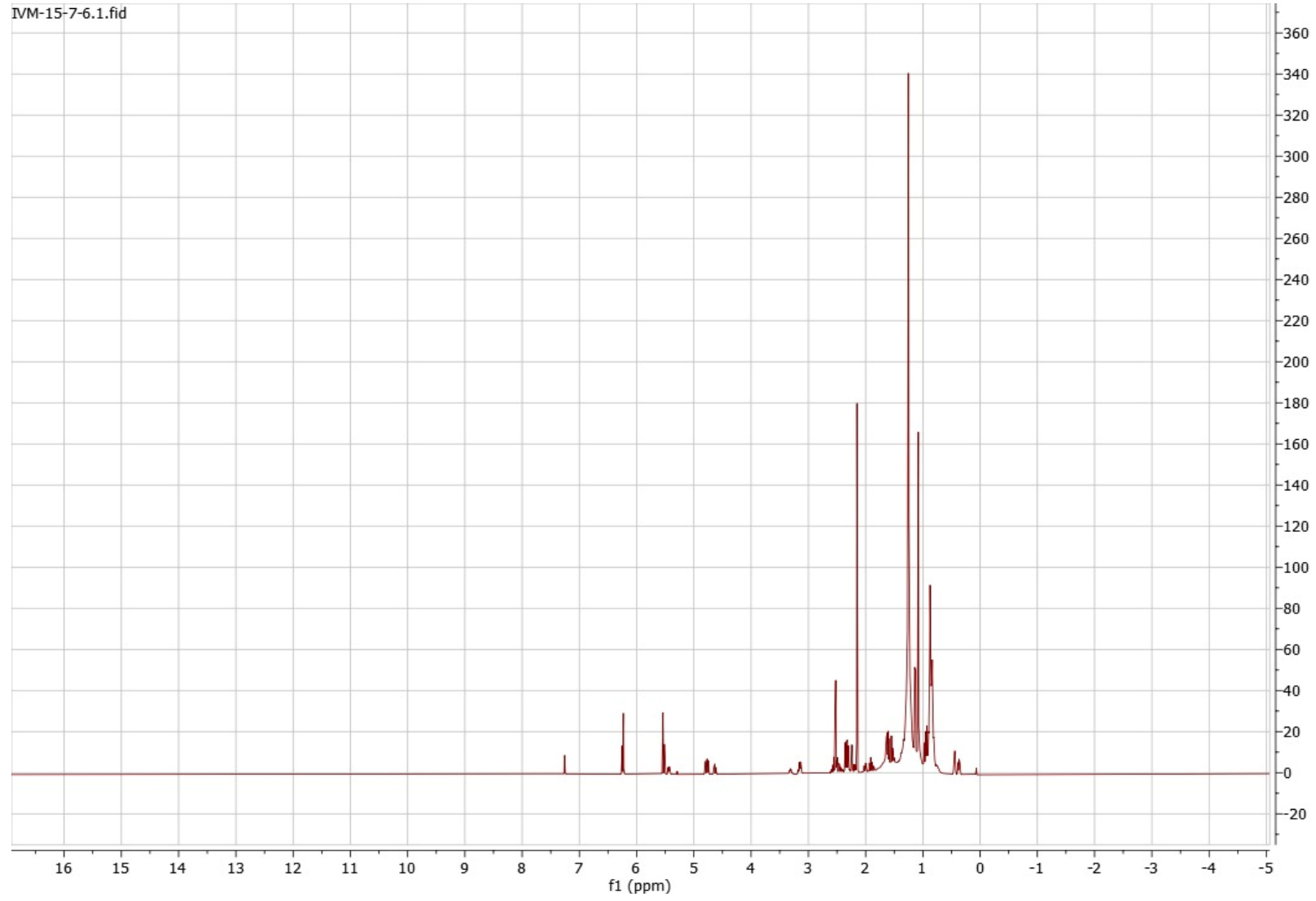
Karabron: Renksiz toz formunda; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 6.24 (1H, dd, $J=9.9, 3.0$ Hz, H-13a), 5.53 (1H, dd, $J=13.9, 2.6$ Hz, H-13b), 4.64 (1H, ddd, $J=11.1, 8.6, 2.7$ Hz, H-8), 3.14 (1H, m, H-7), 2.47 (2H, m, H-3a, b), 2.22 (2H, m, H-6a/H-9a), 2.15 (3H, s, H-15), 1.56 (2H, m, H-2a,b), 1.08 (3H, s, H-14), 0.90 (2H, m, H-6b/H-9b), 0.45 (1H, td, $J=7.2, 4.1$ Hz, H-1), 0.37 (1H, m, H-5).

^{13}C APT NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 208.46 (C-4), 169.85 (C-12), 139.25 (C-11), 122.79 (C-13), 75.83 (C-8), 43.83 (C-3), 37.99 (C-7), 37.54 (C-9), 33.95 (C-1), 30.98 (C-6), 29.77 (C-15), 23.61 (C-2), 23.20 (C-5), 19.91 (C-14), 18.48 (C-10).

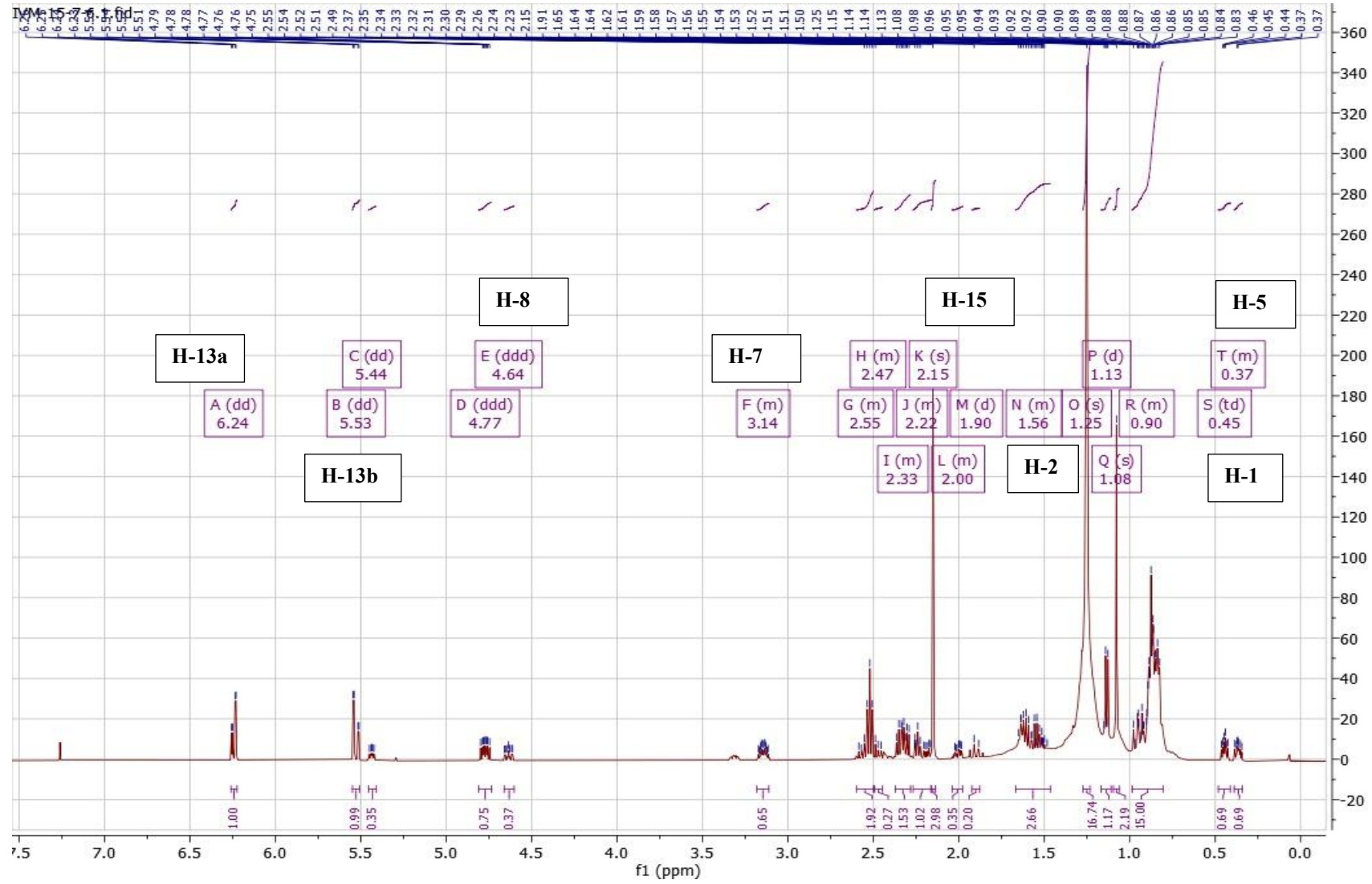
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olması yapının karabron olduğu görüşünü desteklemiştir (Díaz, 1968; Fontana vd.,2007; Mossa vd., 1997).

Tablo 3.7: Karabron bileşğinin ^1H -NMR ve ^{13}C -APT NMR verileri

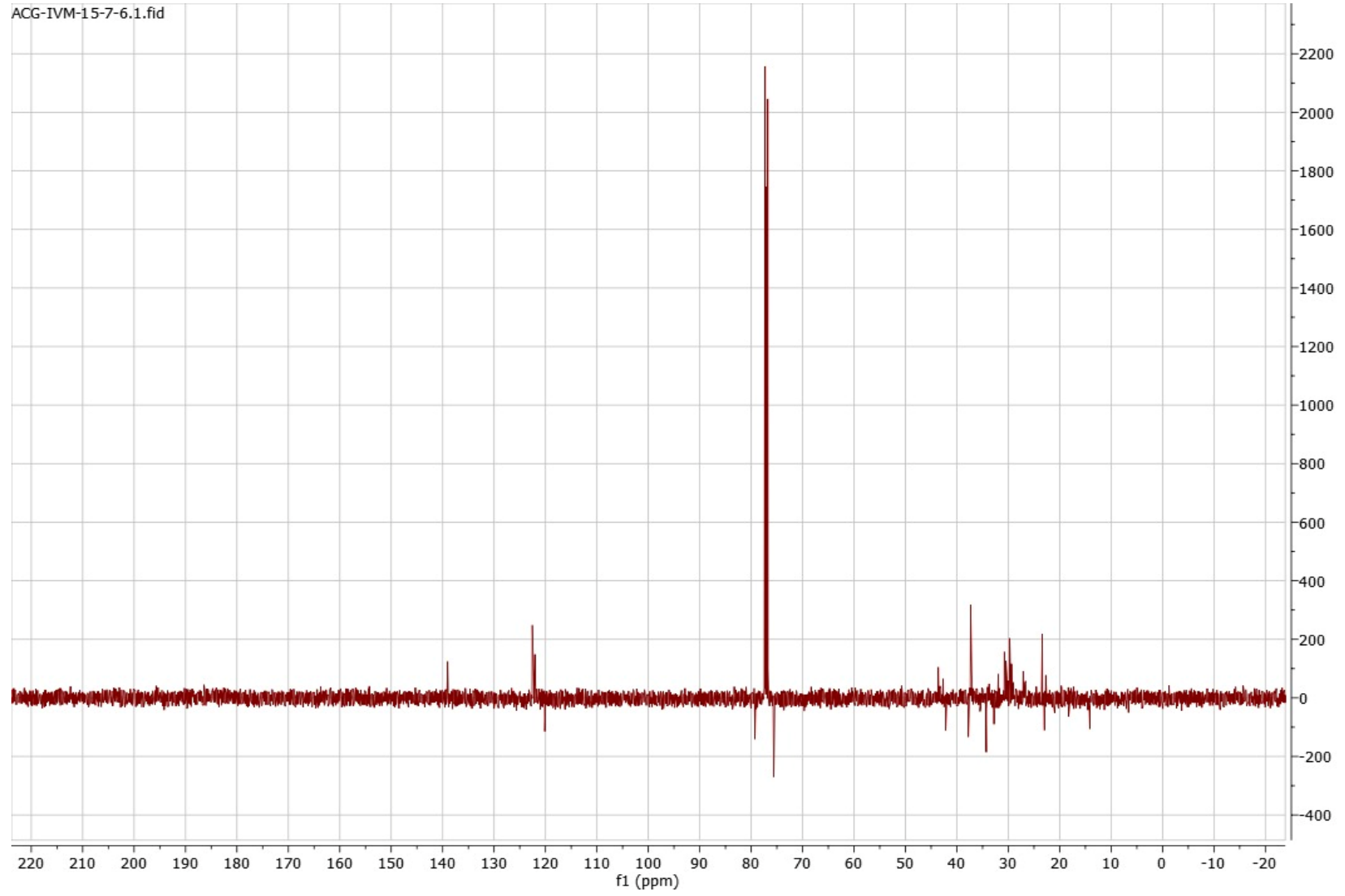
Karbon ve proton no	^1H NMR	^{13}C APT NMR
1	0.45 td ($J=7.2, 4.1$ Hz)	33.95
2a	1.56 m	23.61
2b	1.56 m	
3a	2.47 m	43.83
3b	2.47 m	
4	-	208.46
5	0.37 m ($J=8.8, 6.9, 4.1$ Hz)	23.20
6a	2.22 m	30.98
6b	0.90 m	
7	3.14 m	37.99
8	4.64 ddd ($J=11., 8.6, 2.7$ Hz)	75.83
9a	2.22 m	37.54
9b	0.90 m	
10	-	18.48
11	-	139.25
12	-	169.85
13a	6.24 dd ($J=9.9$ Hz, 3.0 Hz)	122.79
13b	5.53 dd ($J=13.9, J=2.6$ Hz)	
14	1.08 s	19.91
15	2.15 s	29.77



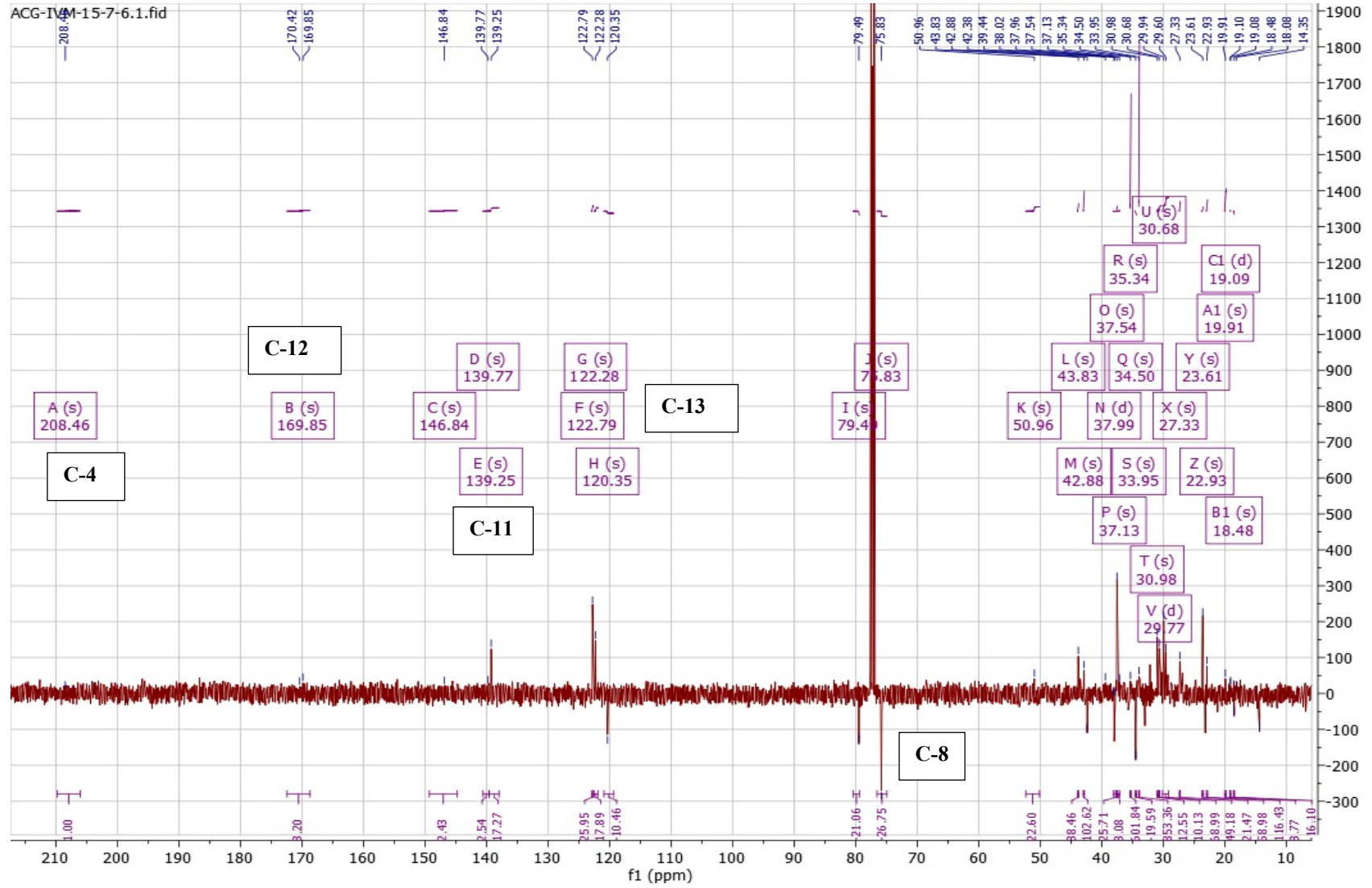
Şekil 3.23: Karabron bileşiğinin ^1H NMR spektrumu 1



Şekil 3.24: Karabron bileşiğinin ^1H NMR spektrumu 2

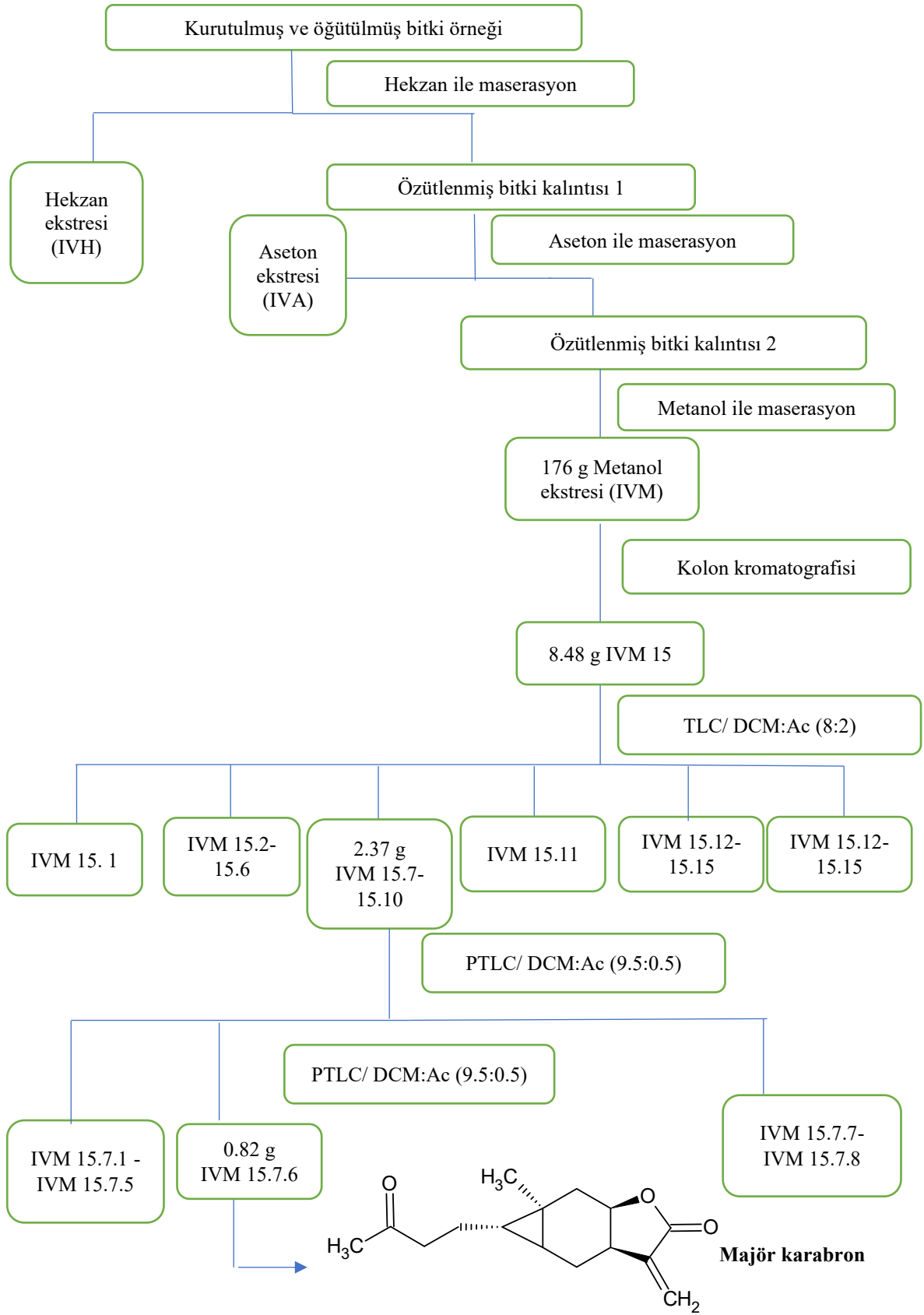


Şekil 3.25: Karabron bileşiğinin ^{13}C -APT NMR spektrumu 1



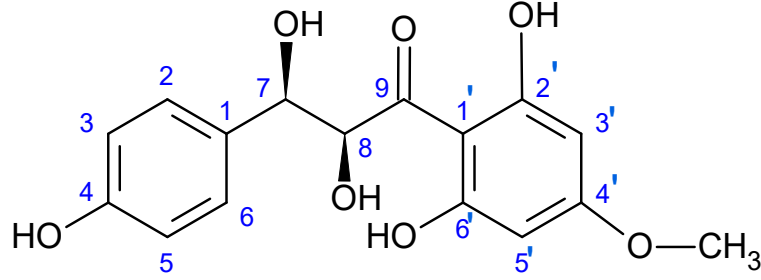
Şekil 3.26: Karabron bileşiğinin ^{13}C -APT NMR spektrumu 2

Şekil 3.27: Karabron bileşiğinin ^{13}C -APT NMR spektrumu 3



Şekil 3.28: Karabron bileşiğinin ekstraksiyon ve izolasyon basamakları

3.3.4 Pulişalkonoit C [(2S,3R)-1-(2-Metoksi-4,6-dihidroksifenil)-2,3-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil)-1-propanon]



^1H NMR spektrumunda δ 7.41 ppm ve 6.88 ppm'de gözlenen dubletler ($J=8.6$ Hz), simetrik ^{13}C sinyalleriyle (128.83 ve 115.44 ppm) birlikte para-disüstitüe fenil yapısını kanıtlamaktadır. Yan zincirdeki H-7 (4.56 ppm) ve H-8 (5.01 ppm) protonları arasındaki 11.95 Hz'lik büyük etkileşim sabiti, stereomerkezlerin birbirine göre anti konumda olduğunu göstermektedir. H-3' (6.04 ppm) ve H-5' (6.11 ppm) sinyalleri arasındaki 2.2 Hz'lik meta-etkileşim, 1,3-dizilimini doğrulamaktadır. Literatürden (CD_3OD çözücüsü) farklı olarak, CDCl_3 içerisinde alınan spektrumda 11.20 ppm'de gözlenen singlet, C-2' hidroksili ile C-9 karbonili arasındaki molekül içi hidrojen bağına işaret etmekte ve bu konumda metoksi yerine serbest -OH varlığını desteklemektedir. Öte yandan, 3.81 ppm (OCH_3) ve 168.57 ppm (C-4') sinyalleri, metoksi grubunun para-pozisyonuna yerleştiğini gösteren karakteristik verilerdir. Son olarak, 2.92 ppm (8-OH) ve 2.24 ppm (7-OH) sinyalleri, kimyasal çevrelerine uygun olarak yan zincirdeki alifatik hidroksil protonlarına atfedilmiştir. Kimyasal çevre ve karbonil grubuna olan yakınlıkları göz önüne alındığında, daha aşağı alanda rezonans olan 2.92 ppm sinyalinin 8-OH grubuna, 2.24 ppm sinyalinin ise 7-OH grubuna ait olduğu değerlendirilmektedir.

^{13}C -APT NMR spektrumunda 1 metil, 6 metin, 8 kuaterner olmak üzere toplam 15 adet karbon piki gözlemlendi. Spektrumda gözlenen karbon piki sayısı ile moleküldeki toplam karbon atomu sayısı (17) arasındaki fark, para-hidroksifenil yapısının simetrik doğasından kaynaklanmakta; bu durum C-2,6 (128.83 ppm) ve C-3,5 (115.44 ppm) sinyallerinin ikişer karbonu temsil etmesiyle açıklanmaktadır. 195.73 ppm'de gözlenen karbonil sinyali (C-9), yapının propan-9-on iskeletini desteklemektedir. Aromatik bölgede 168.57, 163.32, 162.70 ve 156.58 ppm'de gözlenen dört adet kuaterner karbon sinyali, halkaların oksijenli süstitüentlerle (hidroksil ve metoksi) yoğun bir şekilde yer değiştirdiğine işaret etmektedir. Özellikle 82.88 (C-8) ve 72.11 (C-7) ppm'deki sinyaller, yan zincirdeki diol

yapısını doğrulamaktadır. 128.83 ve 115.44 ppm'deki simetrik karbonlar halkadaki para-yerleşimini kanıtlarken; 94.39 ve 95.27 ppm sinyalleri arasındaki küçük fark, halkadaki asimetrik sübstitüsyon deseniyle tutarlılık göstermektedir.

Bileşiğin COSY spektrumu incelendiğinde; δ 4.95/4.98 (H-8) ve 4.50/4.54 (H-7) ppm'de görülen dörtlü çapraz pik grubu, H-7 ve H-8 protonlarının komşu olduğunu gösterir. 3.74-3.78 ppm'deki sinyal metoksi grubuna aittir. Ancak H-7/H-8 bölgesiyle çapraz pik oluşturmaz. Bu durum metoksi grubunun yan zincire değil, halkaya bağlı olduğu bilgisini verir. δ 7.34/6.85 ppm'de güçlü etkileşim pikleri bulunur, bu para-disüstitüe benzen halkasındaki komşu protonların birbirini etkilediğini gösterir. 6.05/6.09 ppm ve 5.98/6.01 ppm arasındaki kesişime aktığımızda küçük, nokta şeklinde bir etkileşim piki görünür. Bu iki hidrojen arasında bir karbon boşluk vardır (meta konumundadırlar). Aradaki mesafe uzak olduğu için etkileşim zayıftır.

HSQC spektrumu incelendiğinde δ 3.80 ppm'deki proton ile 54.77 ppm'deki karbon eşleşiyor. Bu değer, oksijene bağlı bir metil karbonu ile örtüşmektedir. δ 4.99/82.16 (H-8/C-8) ve simetrik fenil halkasına ait δ 7.39/127.91 (C-2,6) ile δ 6.88/114.70 (C-3,5) korelasyonları yapının iskeletini kesinleştirmiştir. 6.04 ve 6.10 protonları sırasıyla 93.44 ve 94.44 (C-3', C-5') karbonlarıyla eşleşmektedir.

HMBC spektrumu incelendiğinde en kritik veri; H-8'den C-9'a: δ 4.98 (H-8) protonu ile 195.95 (C-9) karbonu arasındaki korelasyon, yan zincirin karbonil grubuna doğrudan bağlı olduğunu kanıtlar. Ayrıca 4.52 (H-7) protonunun hem karbonil (C-9) hem de kuaterner C-1 karbonu ile etkileşim içerisinde olması, propan-9-on iskeletinin sürekliliğini ve halkanın yan zincire C-7 üzerinden bağlandığını doğrulamaktadır. 3.67 ppm'deki metoksi protonlarının C-4' karbonunu (168.63) ile verdiği çapraz pik, metoksi grubunun para-pozisyonuna (karbonile göre) yani 4' nolu karbona bağlı olduğunu ispatlar.

Pulışalkonoit C: Sarı toz formunda; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 11.19 (1H, s, 2'-OH), 7.41 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2,6), 6.88 (2H, d, $J=8.65$ Hz, H-3,5), 6.11 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-5'), 6.04 (1H, d, $J=2.25$ Hz, H-3'), 5.01 (1H, d, $J=11.95$ Hz, H-8), 4.56 (1H, d, $J=11.95$ Hz, H-7), 3.81 (3H, s, $-\text{OCH}_3$).

^{13}C APT NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 195.73 (C-9), 168.57 (C-4'), 163.32 (C-2'), 162.70 (C-6'), 156.58 (C-4), 128.83 (C-2,6), 127.64 (C-1), 115.44 (C-3,5), 100.58 (C-1'), 95.27 (C-5'), 94.39 (C-3'), 82.88 (C-8), 72.11 (C-7), 55.58 (-OCH₃).

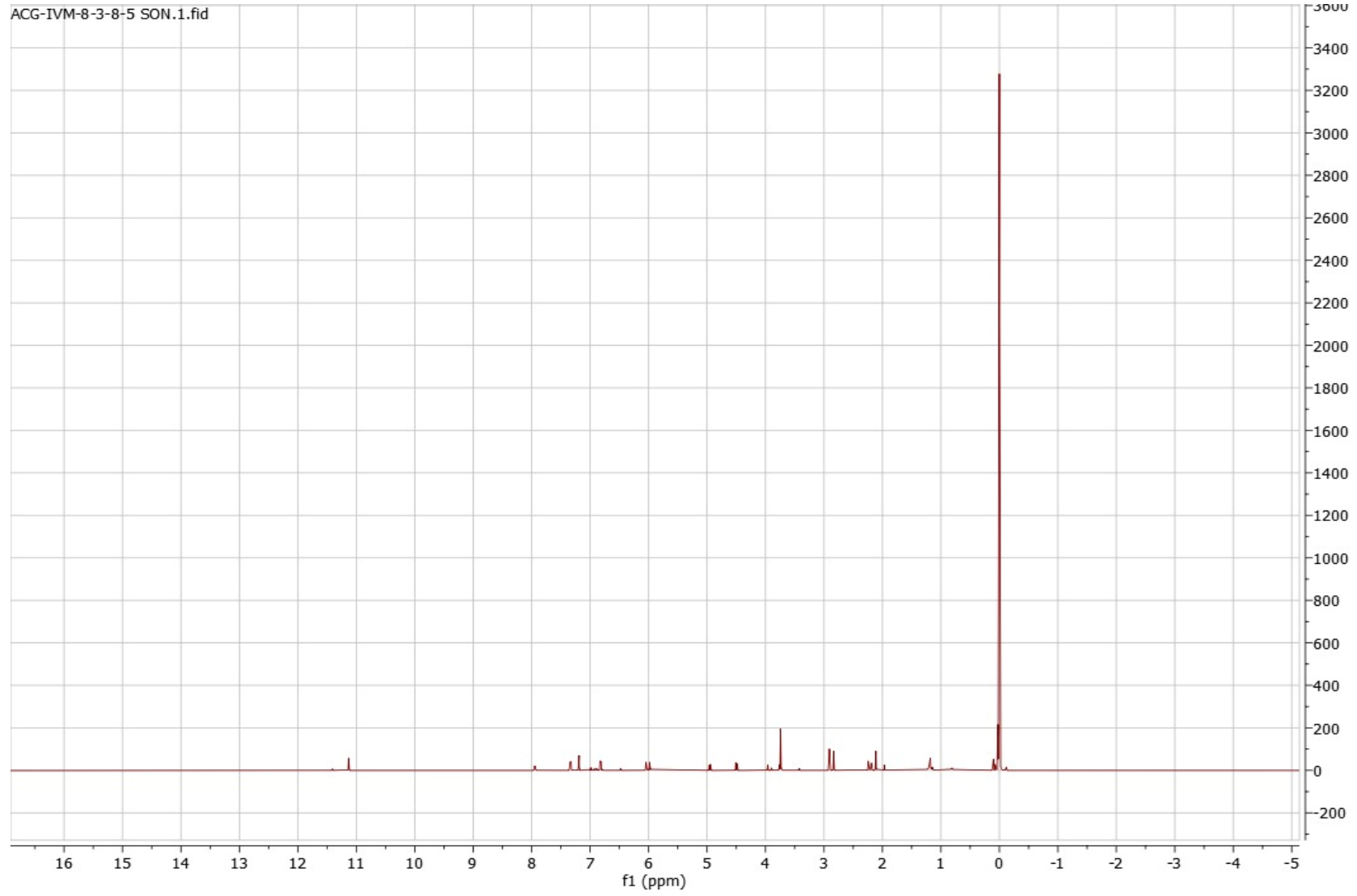
HSQC (CDCl_3): δ 7.39/127.91 (H-2,6/C-2,6), 6.88/114.70 (H-3,5/C-3,5), 6.10/94.40 (H-5'/C-5'), 6.04/93.44 (H-3'/C-3'), 4.99/82.16 (H-8/C-8), 3.80/54.77 (-OCH₃/C-OMe),

HMBC (CDCl_3): δ 7.26→156.49 (C-4), 82.79 (C-8); 6.75→127.45 (C-1); 5.97→100.56 (C-1'); 4.88→195.95 (C-9), 128.75 (C-1); 4.43→195.51 (C-9), 82.79 (C-8); 3.67→168.63 (C-4').

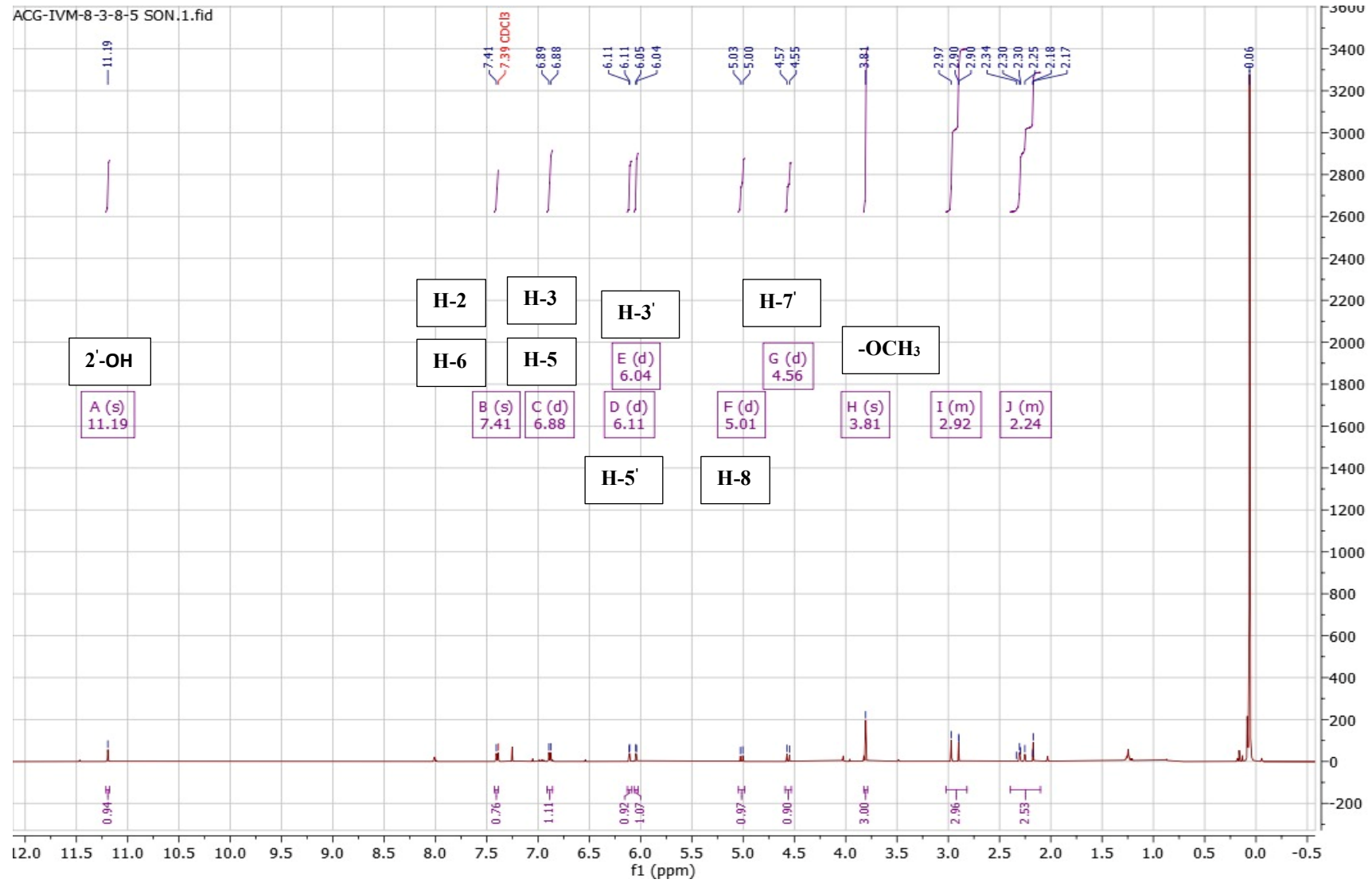
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olması yapının pulişalkonoit C olduğu görüşünü desteklemiştir (Elmann vd., 2013).

Tablo 3.8: Pulışalkonoit C bileşiğinin ^1H -NMR ve ^{13}C -APT NMR verileri

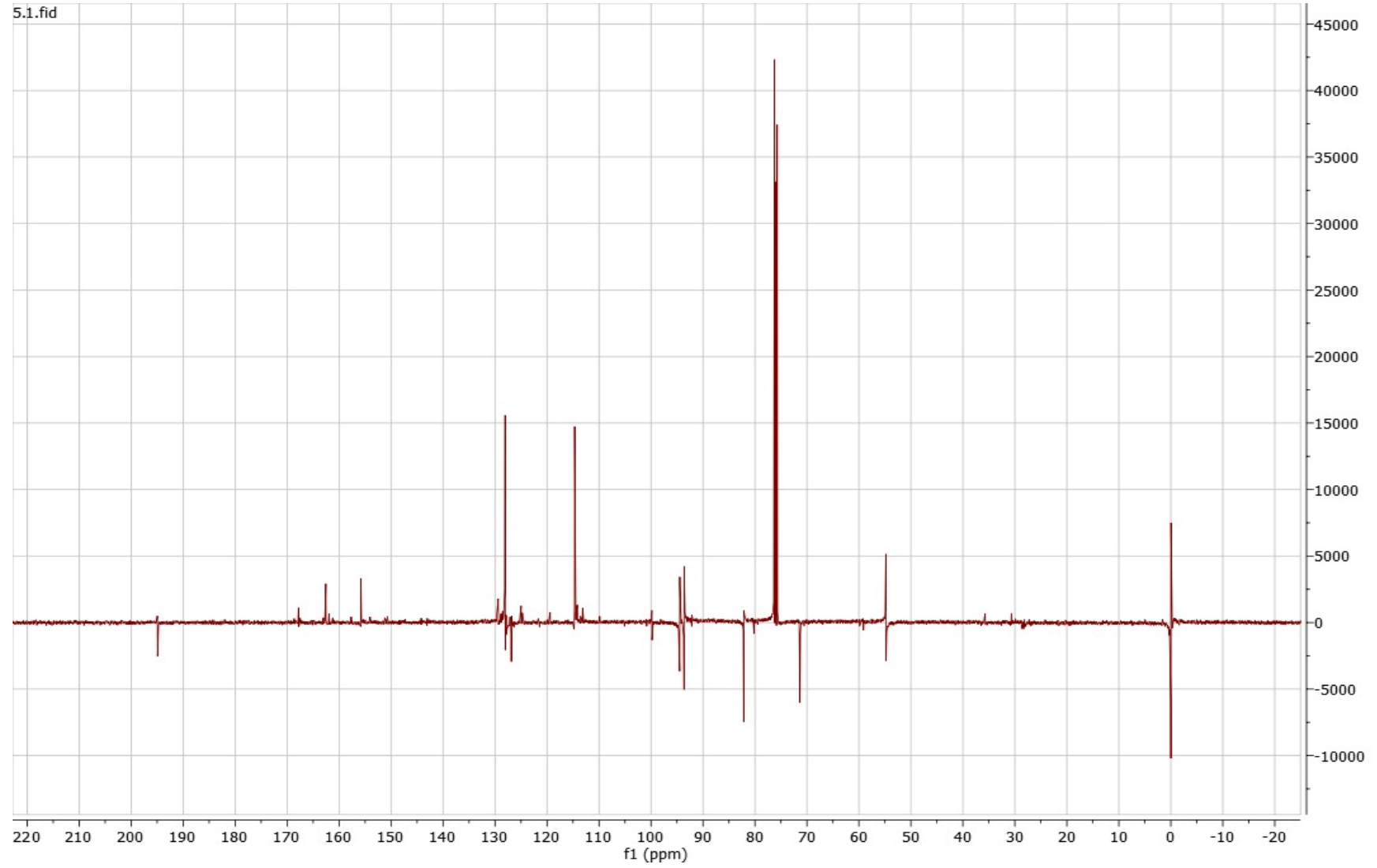
Karbon ve proton no	^1H NMR	^{13}C APT NMR
1	-	127.64
2	7.41 d (J=8.6 Hz)	128.83
3	6.88 d (J=8.65 Hz)	115.44
4	-	156.58
5	6.88 d (J=8.65 Hz)	115.44
6	7.41 d (J=8.6 Hz)	128.83
7	4.56 d (J=11.95 Hz)	72.11
8	5.01 d (J=11.95 Hz)	82.88
9	-	195.73
1'	-	100.58
2'	11.19 s (-OH)	163.32
3'	6.04 d (J=2.25 Hz)	94.39
4'	-	168.57
5'	6.11 d (J=2.2 Hz)	95.27
6'	-	162.70
OMe	3.81 s	55.58



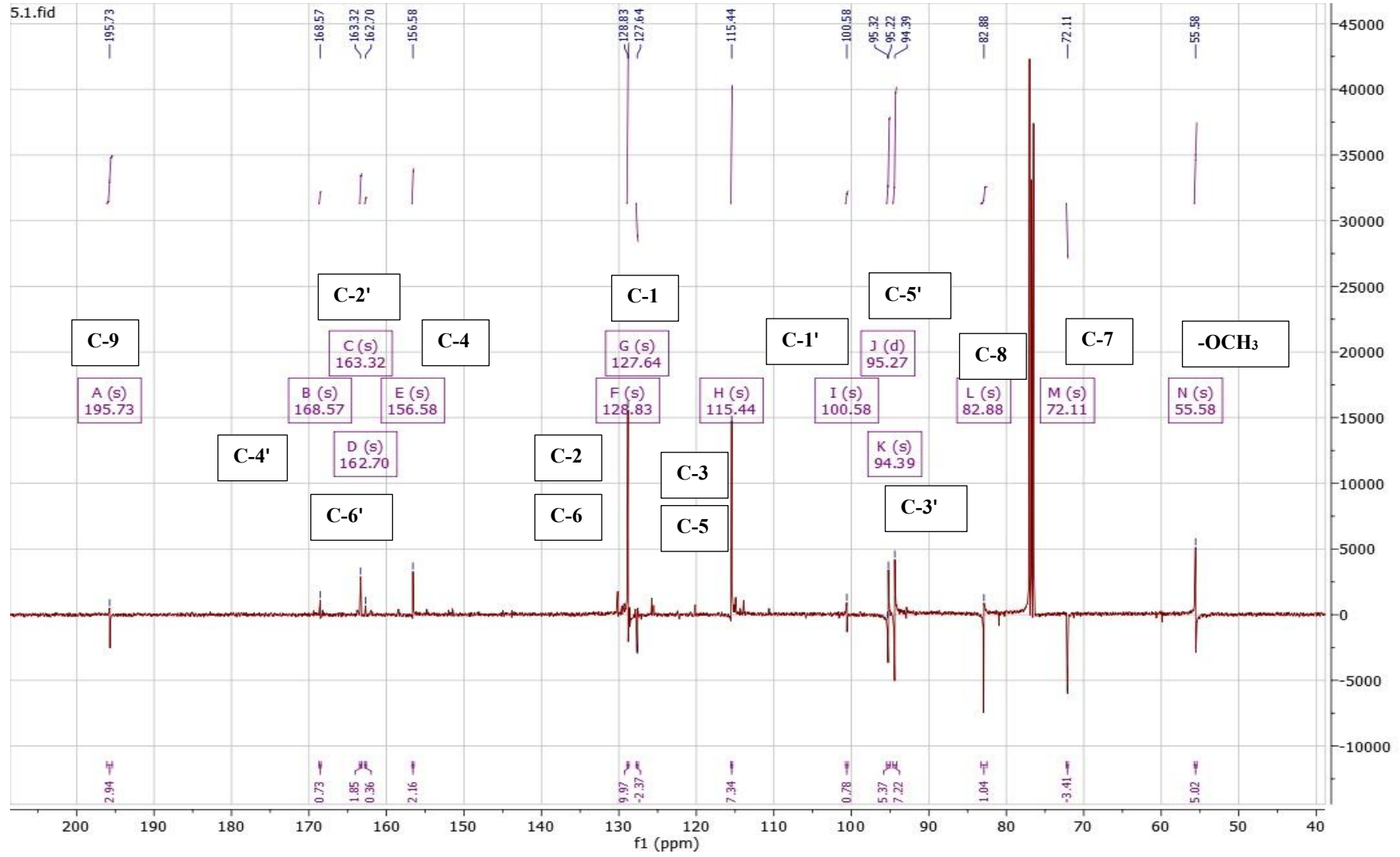
Şekil 3.29: Pulişalkonoit C bileşiğinin ^1H -NMR Spektrumu 1



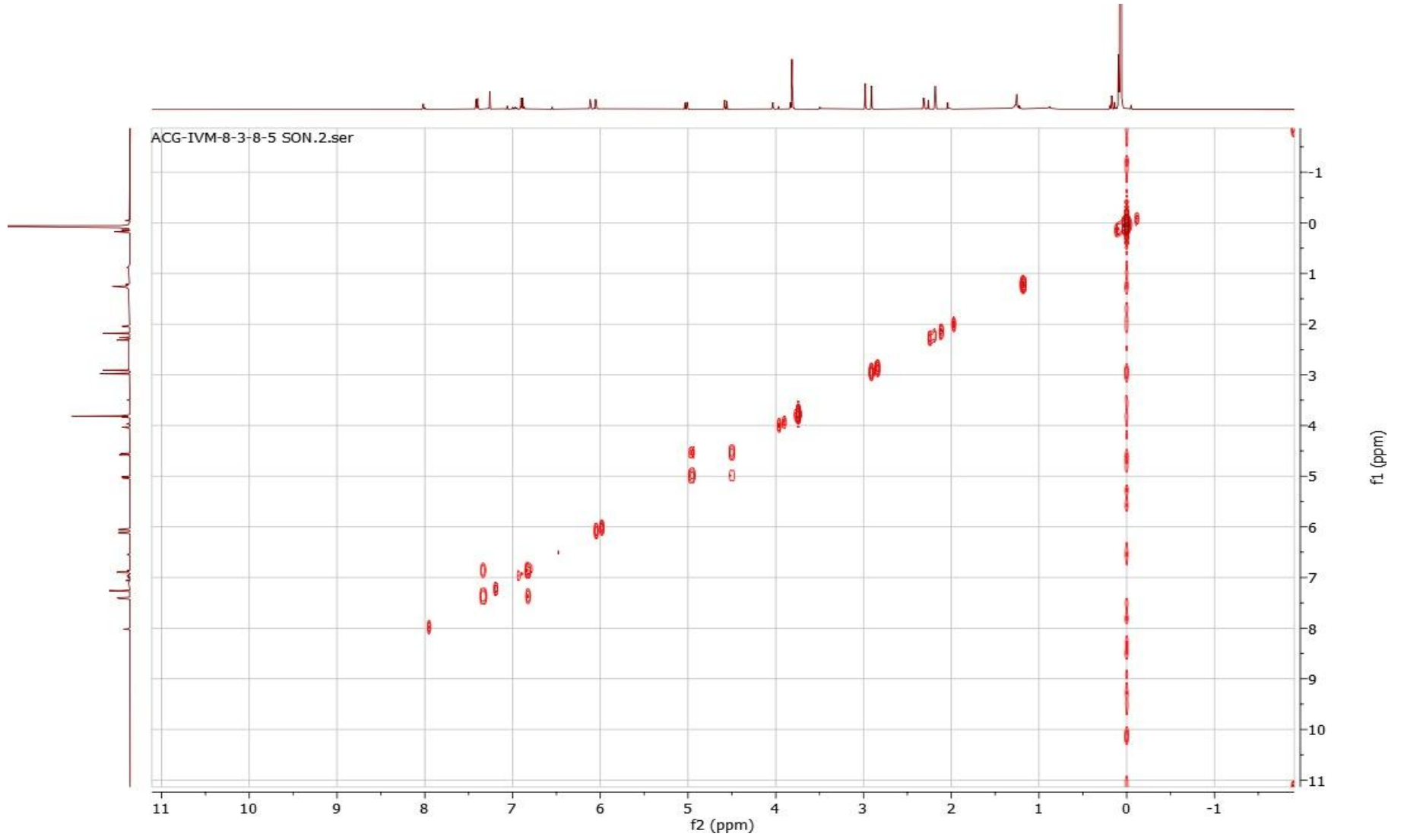
Şekil 3.30: Pulisalkonoit C bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu 2



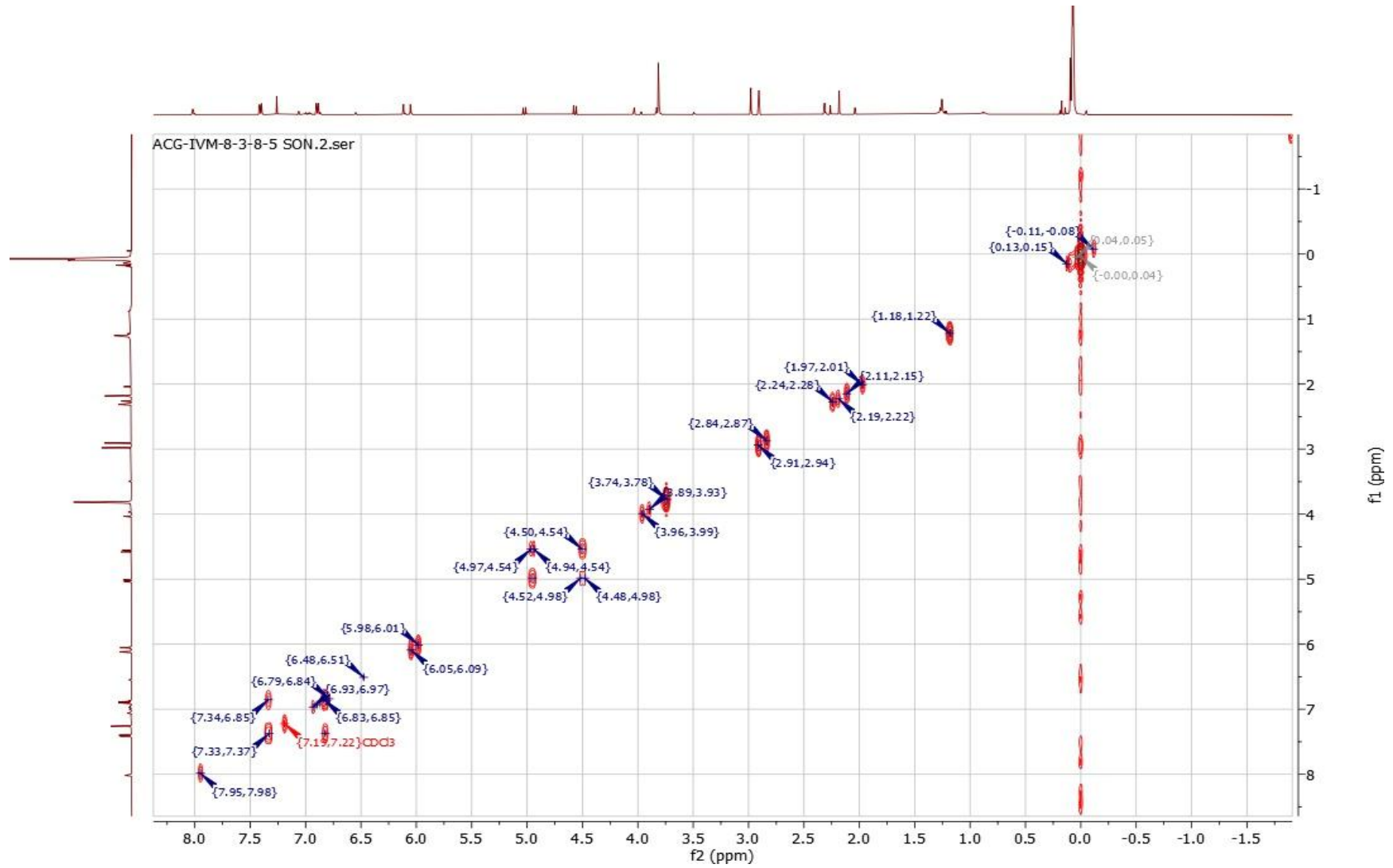
Şekil 3.31: Pulışalkonoit C bileşiğinin ^{13}C APT-NMR Spektrumu 1



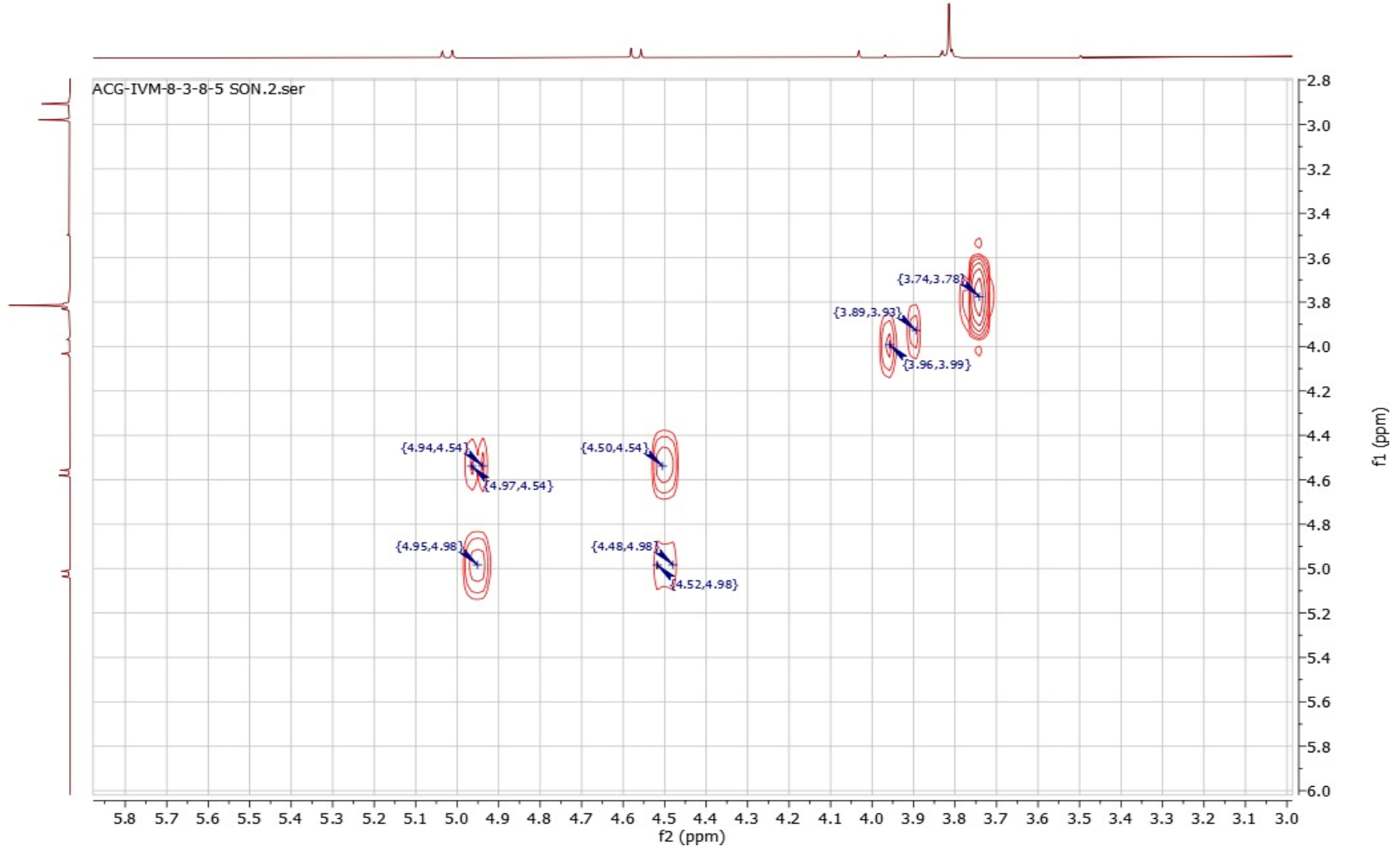
Şekil 3.32: Pulişalkonoit C bileşiğinin ^{13}C APT-NMR Spektrumu 2



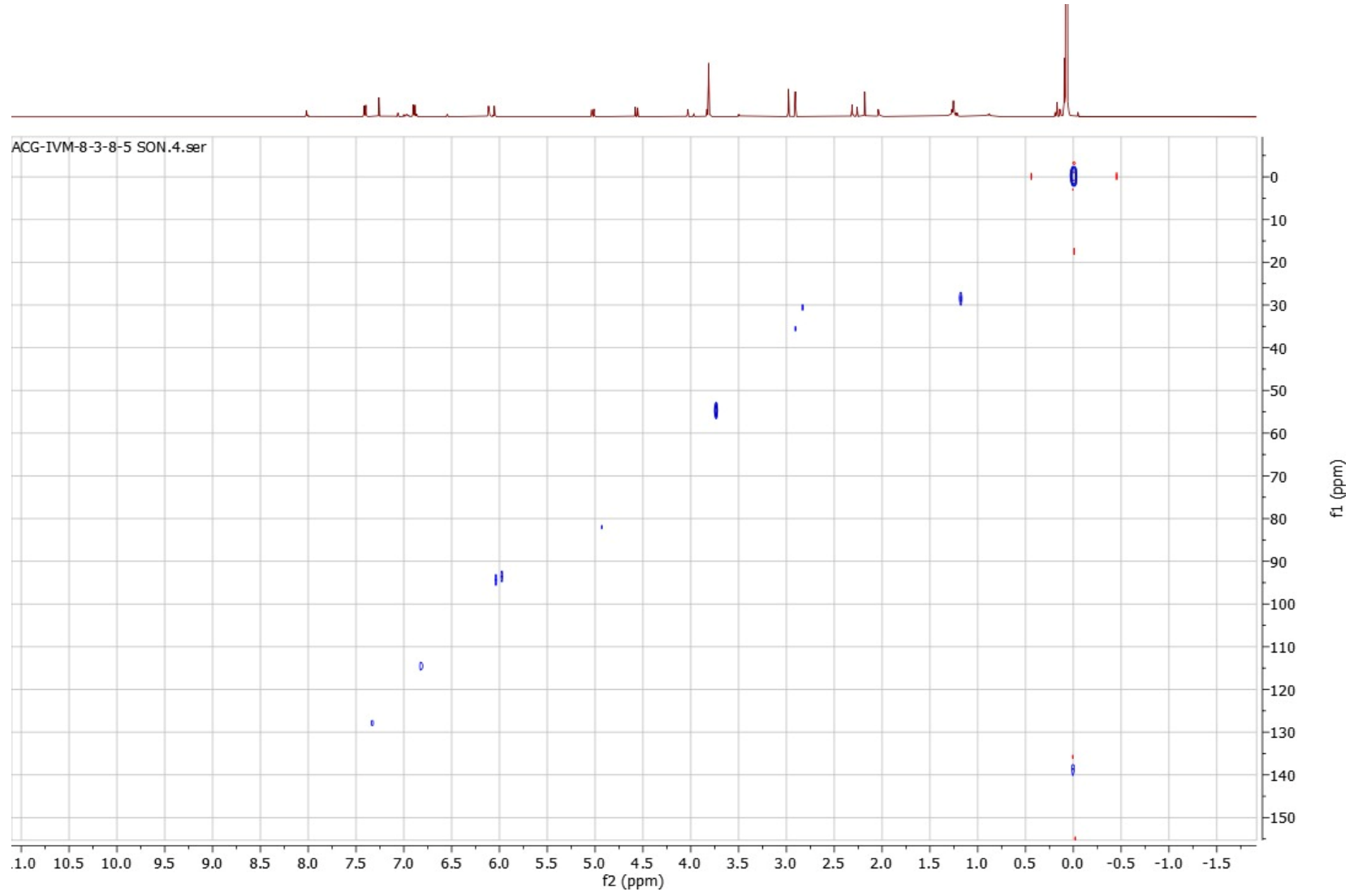
Şekil 3.33: Pulisalkonoit C bileşiğinin COSY Spektrumu 1



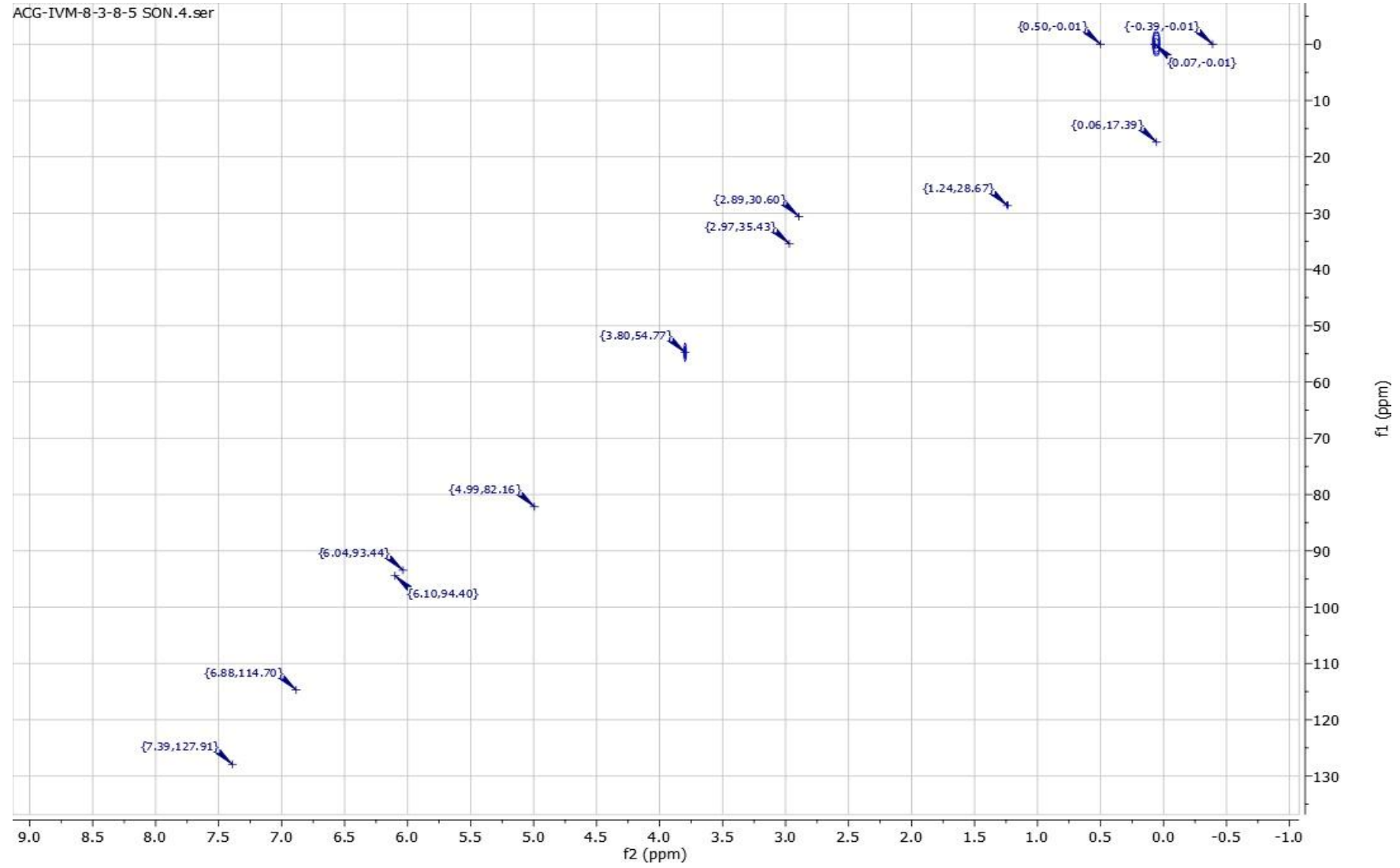
Şekil 3.34: Pulışalkonoit C bileşiğinin COSY Spektrumu 2



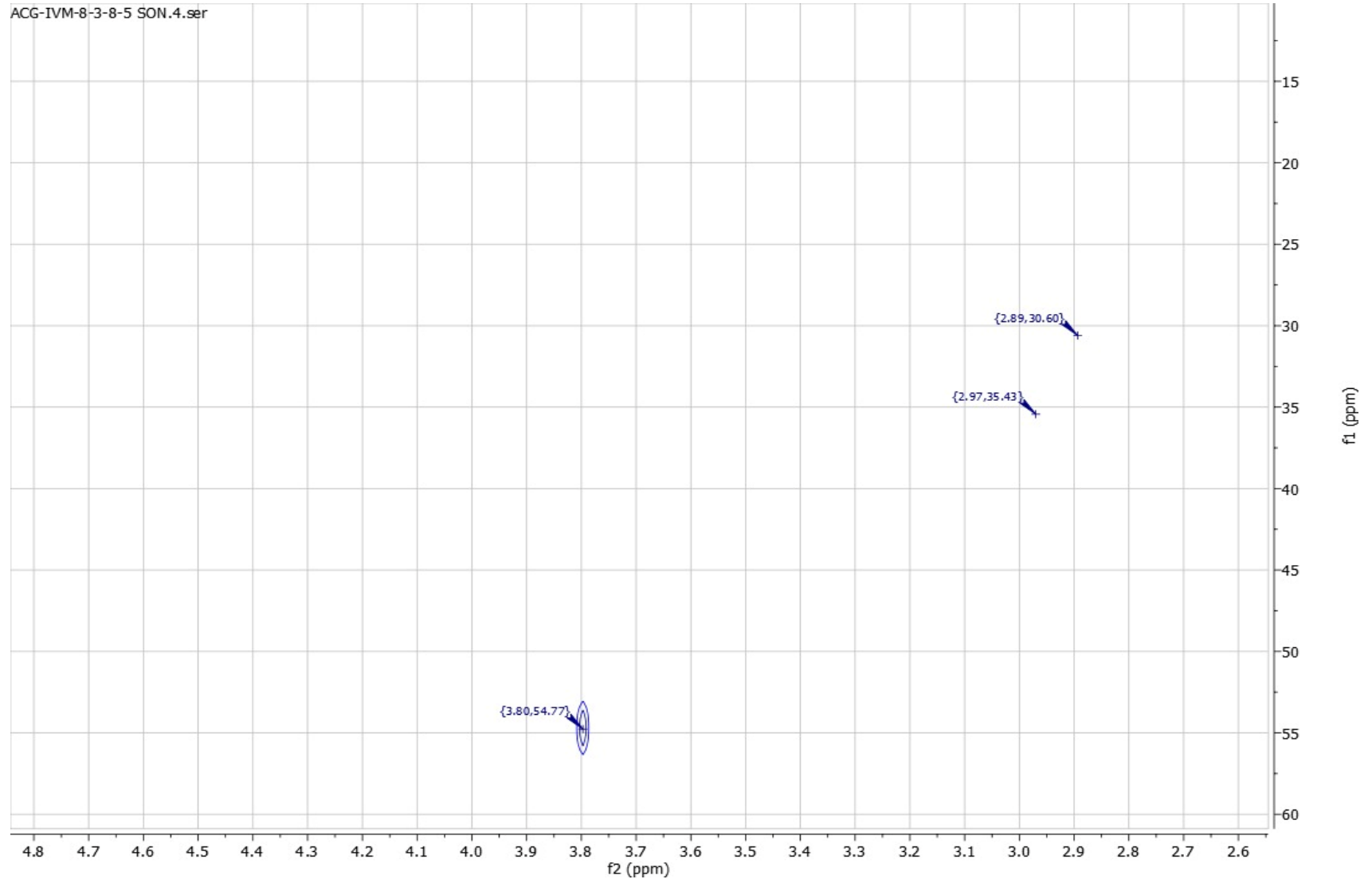
Şekil 3.35: Pulişalkonoit C bileşiğinin COSY Spektrumu 3



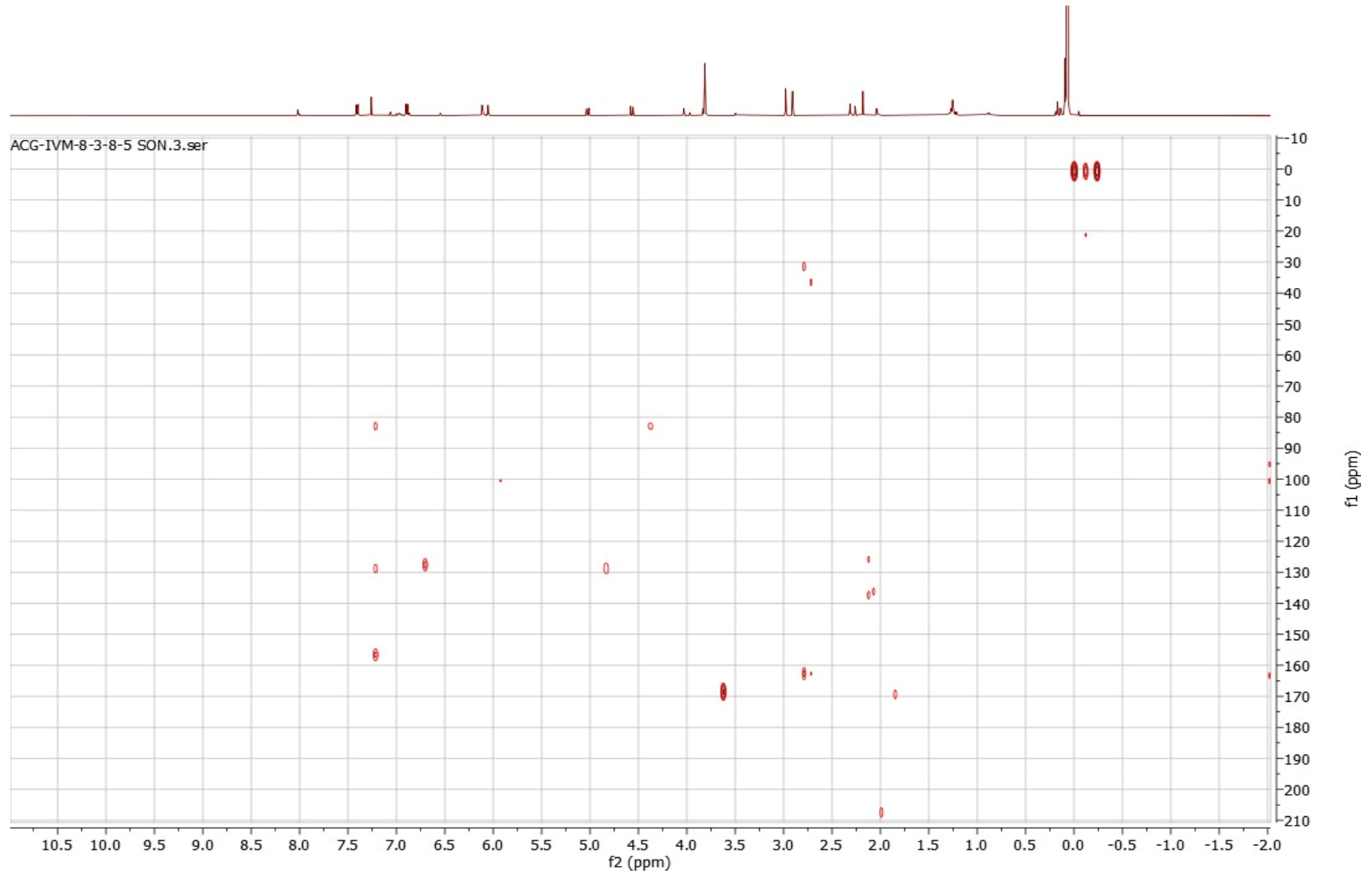
Şekil 3.36: Pulışalkonoit C bileşiğinin HSQC Spektrumu 1



Şekil 3.37: Pulisalkonoit C bileşiğinin HSQC Spektrumu 2



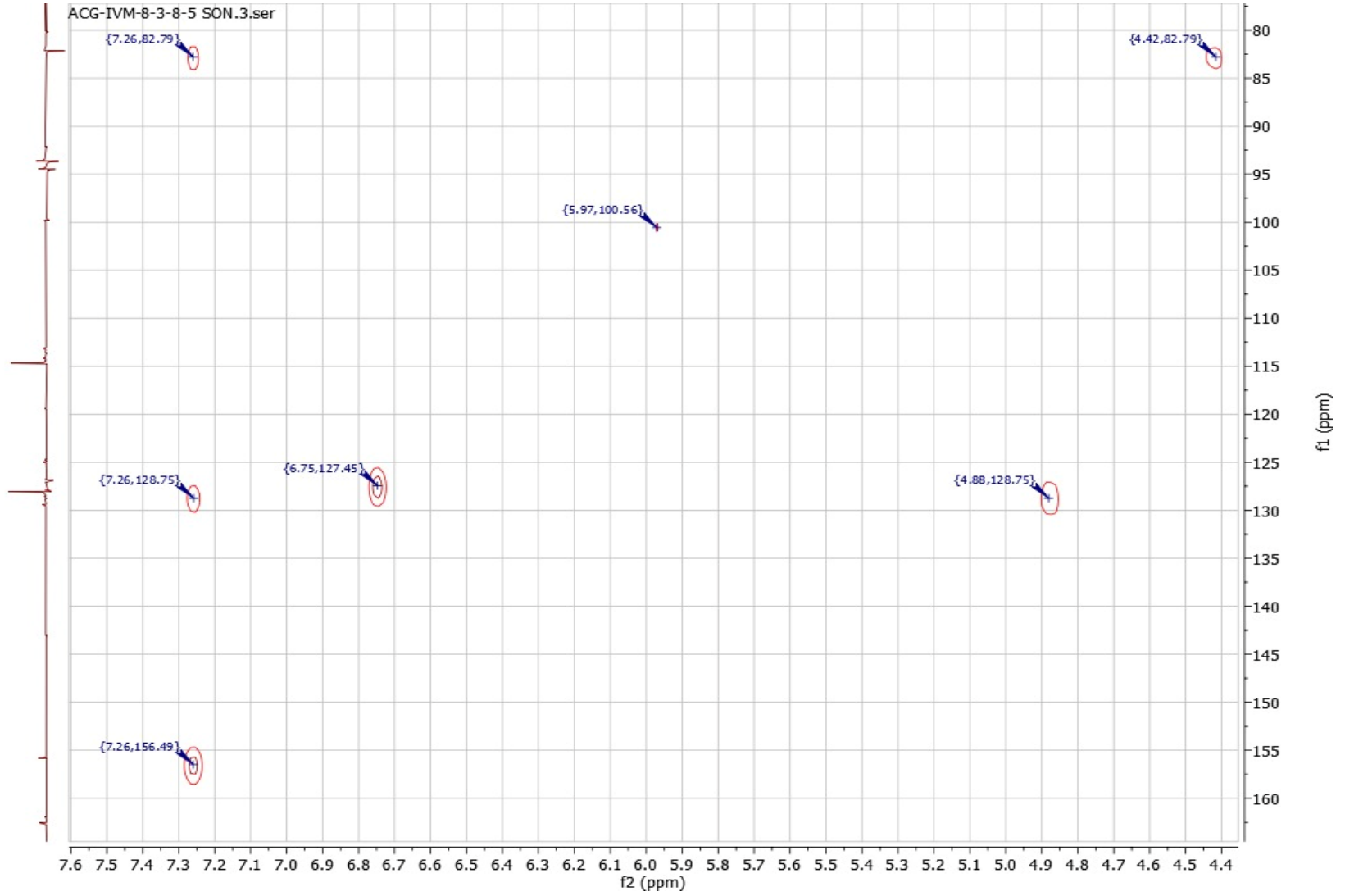
Şekil 3.38: Pulışalkonoit C bileşiğinin HSQC Spektrumu 3



Şekil 3.39: Pulışalkonoit C bileşiğinin HMBC Spektrumu 1



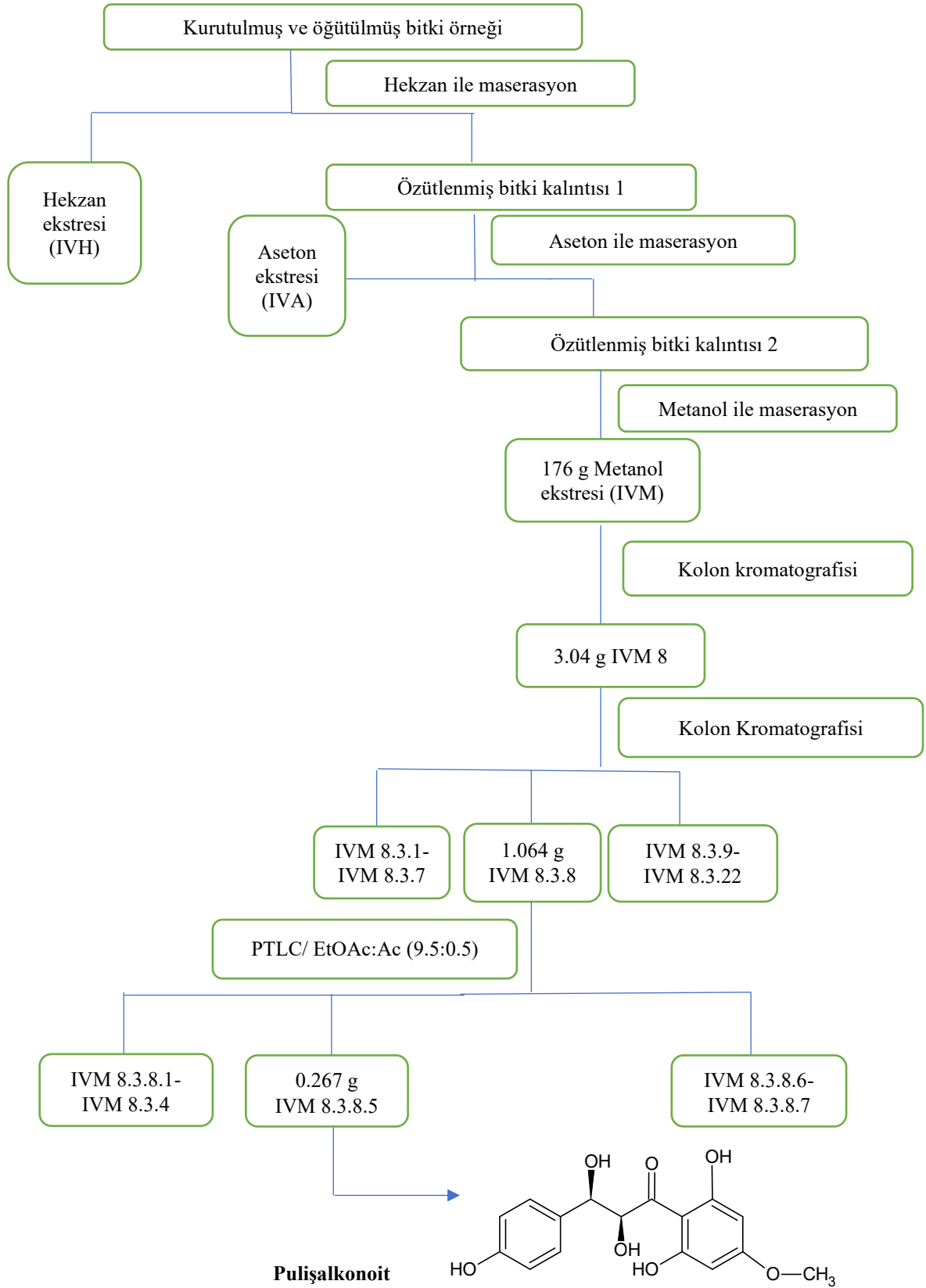
Şekil 3.40: Pulisalkonoit C bileşiğinin HMBC Spektrumu 2



Şekil 3.41: Pulisalkonoit C bileşiğinin HMBC Spektrumu 3



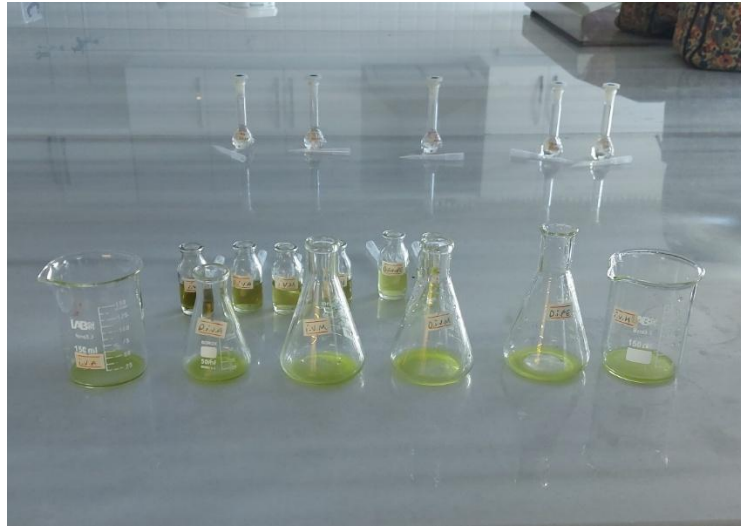
Şekil 3.42: Pulisalkonoit C bileşiğinin HMBC Spektrumu 4



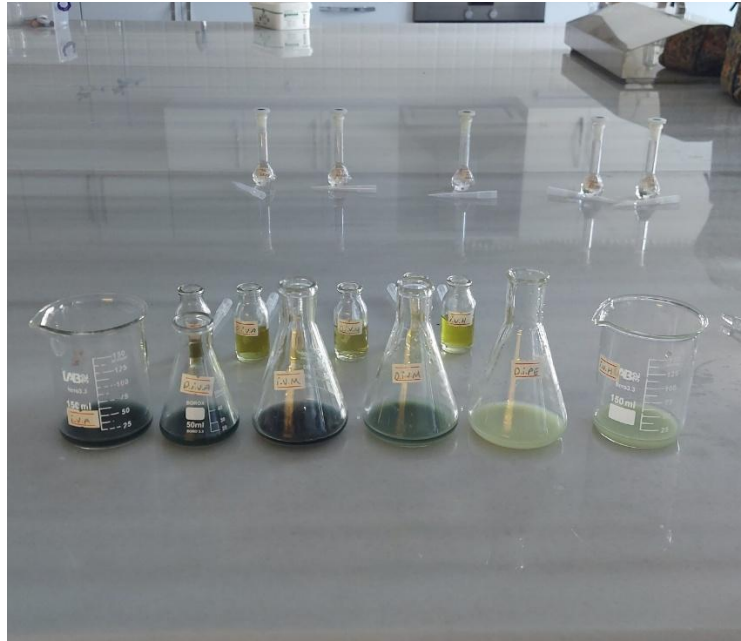
Şekil 3.43: Pulişalkonoit C bileşiğinin ekstraksiyon ve izolasyon basamakları

3.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı (TPC) Sonuçları

Toplam fenolik madde miktarının tayini, Folin-Ciocalteu ayırıcının bazik ortamda fenolik bileşikler tarafından indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan karakteristik mavi-yeşil renk kompleksi Şekil 3.44'te sunulmuştur. Gözlemlenen sarıdan koyu mavi/yeşil tona doğru gerçekleşen renk yoğunluğundaki artış, gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden ifade edilen fenolik bileşik konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



(a)



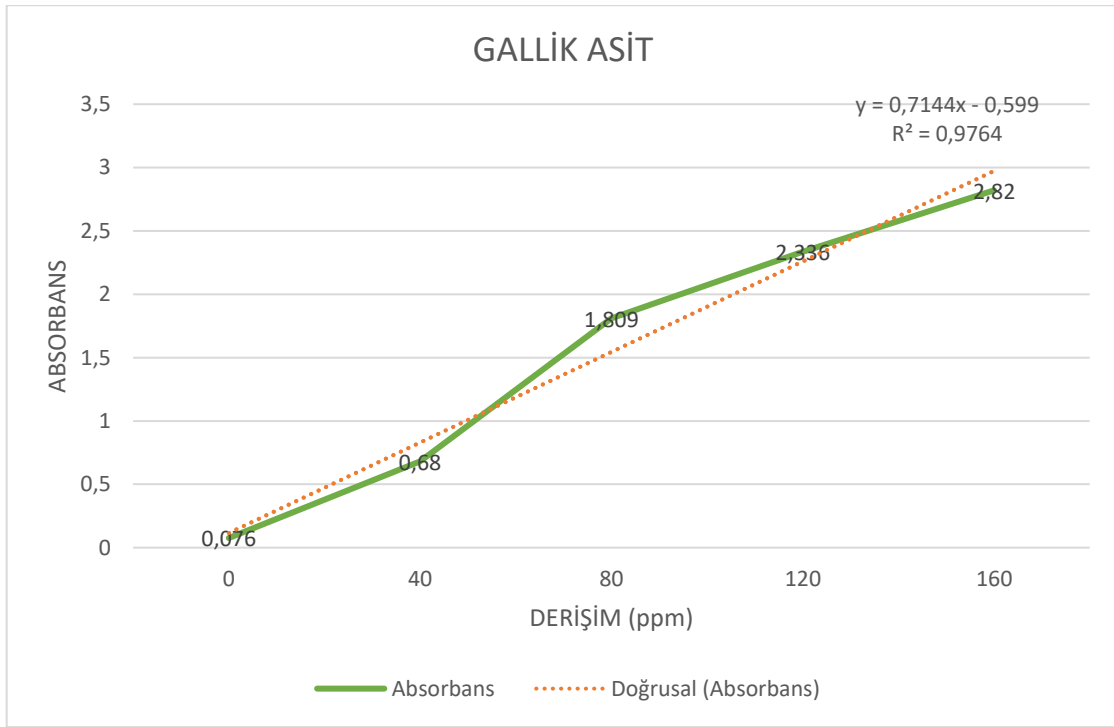
(b)

Şekil 3.44: (a) Reaksiyon başlangıcı, (b) İnkübasyon sonrası

Toplam fenolik madde analizi için hazırlanan farklı derişimlerdeki Gallik asit standart çözeltilerine ait absorbans değeri Tablo 3.9’da sunulmuştur. Bu veriler doğrultusunda elde edilen ve numunelerin konsantrasyon hesaplamalarında temel alınan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 3.45’te verilmiştir.

Tablo 3.9: Gallik asit standart çözeltilerinin derişim ve absorbans değeri

Derişim (ppm)	A ₁	A ₂	A ₃	A (ortalama absorbans)
0	0.075	0.076	0.076	0.076
40	0.680	0.680	0.681	0.680
80	1.809	1.809	1.809	1.809
120	2.336	2.336	2.337	2.336
160	2.820	2.819	2.820	2.820
200	2.134	2.134	2.135	2.134



Şekil 3.45: Toplam fenolik madde analizi için gallik asit kalibrasyon grafiği

Tablo 3.9 ve Şekil 3.45’ten elde edilen regresyon denklemi ($y = 0.7144x - 0.599$) kullanılarak, analiz edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 3.10’da özetlenmiştir.

Ekstrelerin toplam fenolik madde içerikleri, gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 0.7144x - 0.599$ regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar yapılırken; spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen absorbans değerleri, ekstraksiyon hacmi (100 ml) ve numune ağırlığı (1 g) dikkate alınarak sonuçlar 'mg GAE/g örnek' birimine dönüştürülmüştür. Analiz edilen her bir numuneye ait üç tekrarlı ölçüm sonuçları, bu değerlerin ortalaması ve fenolik madde miktarları Tablo 3.10'da sunulmuştur.

Tablo 3.10: *I. viscosa* ekstrelerinin toplam fenolik madde içerikleri

Ekstre	A ₁	A ₂	A ₃	A (ortalama)	mg GAE/g
IVH	0.281	0.286	0.286	0.284333	9.28 ± 0.16
IVA	2.402	2.402	2.403	2.402333	127.99 ± 0.03
IVM	3.378	3.377	3.377	3.377333	182.64 ± 0.03
DIVPE	0.174	0.174	0.174	0.174	3.28 ± 0.00
DIVA	2.088	2.088	2.088	2.088	110.45 ± 0.00
DIVM	1.266	1.267	1.267	1.266667	64.46 ± 0.03

3.5 Toplam Antosiyanin Miktarı (TAC) Sonuçları

Tablo 3.11: *I. viscosa* ekstrelerinin pH diferansiyel yöntemi ile ölçülen spektrofotometrik absorbans değerlerinin ortalamaları

Ekstre	520 nm		700 nm	
	pH 1	pH 4.5	pH 1	pH 4.5
IVH	1.349	1.378	1.25	1.327
IVA	3.768	1.04	0.955	1.011
IVM	3.765	3.511	0.098	0.243
DIVPE	1.64	1.15	0.446	1.138
DIVA	3.718	3.709	0.368	1.01
DIVM	3.755	3.755	0.083	0.525

Numunelerin net absorbans değerleri (A), yöntem kısmında açıklanan formül 2.2 kullanarak hesaplanmıştır. Toplam antosiyanin pigment konsantrasyonu, formül 2.3 kullanılarak siyanidin-3-glukozit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır.

Hesaplanan konsantrasyon (mg/L) değerleri; ekstraksiyon sırasında kullanılan toplam çözücü hacmi (100 mL), başlangıç numune miktarı (1 g) ve uygulanan seyreltme faktörleri dikkate alınarak 100g kuru örnekteki miligram miktarına (mg/100g) dönüştürülmüştür.

Tablo 3.12: *I. viscosa* (L.) Aiton ekstrelerinin toplam antosiyanin içerikleri

Ekstre	Net absorbans	mg siyanidin-3-glukozit eşdeğeri/100 g
IVH	0.048	0.008± 0.001
IVA	2.784	0.465± 0.001
IVM	0.399	0.067± 0.001
DIVPE	1.182	0.197± 0.001
DIVA	0.651	0.109± 0.001
DIVM	0.442	0.074± 0.001

3.6 Antioksidan Aktivite Sonuçları

3.6.1 DPPH Yöntemi Sonuçları

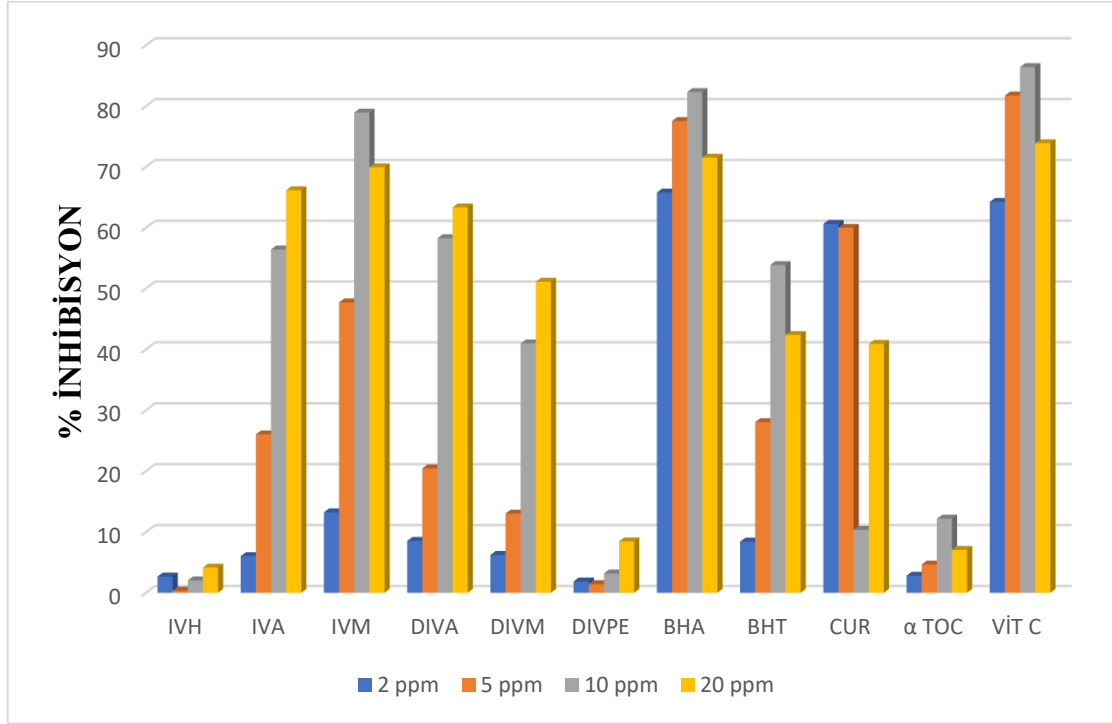
I. viscosa bitkisinden elde edilen altı ekstrakt için DPPH serbest radikal giderim aktivitesi dört farklı derişimde (10, 25, 50 ve 100 µg/mL) tayin edildi. Referans antioksidan olarak BHT (Bütillhidroksitoluen), BHA (Bütillhidroksianisol), α -tokoferol (Vitamin E), vitamin C ve kurkumin kullanıldı.

Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi formül 2.4 kullanılarak hesaplanmış ve % inhibisyon olarak Tablo 3.13'te verilmiştir.

Tablo 3.13: Farklı konsantrasyonlardaki *I. viscosa* ekstrelerinin ve standart antioksidanların DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri

AKTİVİTE (% inhibisyon)	10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm
IVH	2.66±1.34	0.35±0.27	2.03±0.70	4.13±18.13
IVA	6.03±2.18	26.02±3.17	56.4±1.31	66.14±18.05
IVM	13.22±4.36	47.7±23.54	78.91±3.06	69.92±19.43
DIVA	8.52±0.67	20.44±3.51	58.25±2.37	63.32±27.2
DIVM	6.21±1.47	13.01±2.92	40.95±2.79	51.1±7.0
DIVPE	1.86±0.41	1.42±1.22	3.18±3.04	8.44±16.13
BHA	65.76±5.84	77.52±0.69	82.28±0.40	71.50±15.55
BHT	8.4±18.55	28.03±4.25	53.84±3.03	42.34±22.2
CUR	60.61±0.87	59.96±1.55	10.34±12.93	40.87±23.83
α TOC	2.8±0.56	4.64±1.35	12.17±0.72	7.04±22.21
VİT C	64.23±28.87	81.71±1.42	86.39±1.16	73.87±15.68

I. viscosa ekstrelerinin ve standart antioksidanların konsantrasyona bağlı DPPH radikal inhibisyon (%) değişimleri ise Şekil 3.46 'da grafiksel olarak özetlenmiştir.



Şekil 3.46: *I. viscosa* ekstrelerinin ve standart antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikal inhibisyon (%) değişimleri.

3.6.2 CUPRAC Yöntemi Sonuçları

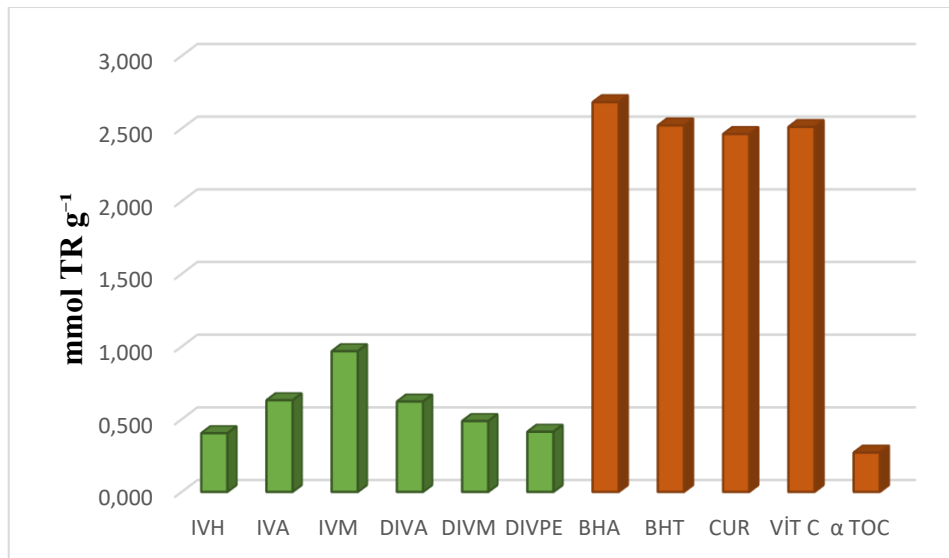
I. viscosa bitkisinden elde edilen altı ekstrenin ve standart antioksidanların indirgeme kapasiteleri üç bağımsız tekrar şeklinde yapılmıştır. Elde edilen veriler, troloks standart eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar gram numune başına milimol troloks eşdeğeri (mmol TR g⁻¹) cinsinden ifade edilmiştir.

CUPRAC aktivite sonuçları Tablo 3.14'te sunulmuştur.

Tablo 3.14: *I. viscosa* ekstreleri ve standartların troloks eşdeğeri cinsinden bakır (II) indirgeme kapasiteleri

Ekstre	TEAC _{CUPRAC} (mmol TR g ⁻¹)
IVH	0.40±0.11
IVA	0.63±0.03
IVM	0.97±0.05
DIVA	0.62±0.04
DIVM	0.49±0.06
DIVPE	0.41±0.03
BHA	2.68±0.02
BHT	2.52±0.05
CUR	2.46±0.14
α TOC	2.51±0.09
VİT C	0.27±0.04

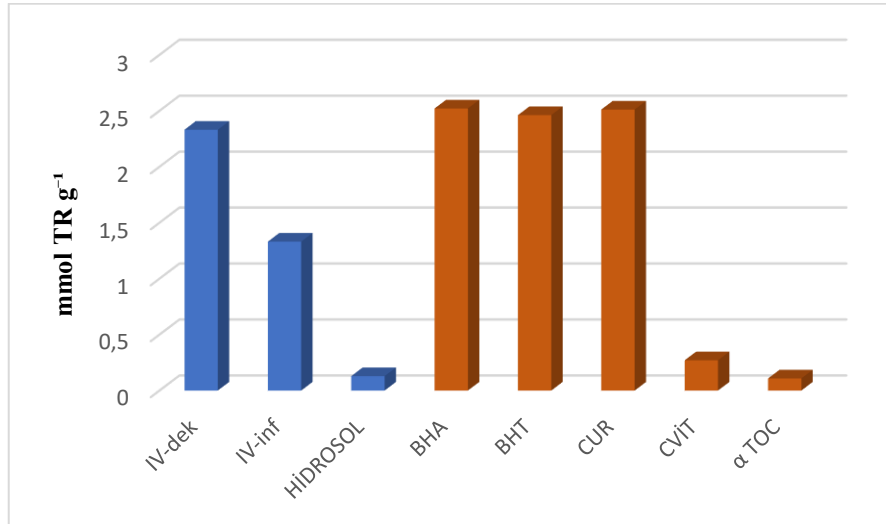
Ekstrelerin konsantrasyona bağlı olarak sergiledikleri absorbands değişimleri ve standart antioksidanlarla karşılaştırmalı sonuçları Şekil 3.47’de grafiksel olarak özetlenmiştir. Grafikte görüldüğü üzere, ekstrelerin indirgeme kapasiteleri ile standartların aktiviteleri arasındaki ilişki troloks eşdeğeri bazında net bir şekilde ortaya konulmuştur.



Şekil 3.47: *I. viscosa* ekstrelerinin ve standart antioksidanların troloks eşdeğeri cinsinden bakır (II) indirgeme kapasitelerinin (CUPRAC) karşılaştırılması

Tablo 3.15: *I. viscosa* çay örneklerinin, hidrosolün ve standartların troloks eşdeğeri cinsinden bakır (II) indirgeme kapasiteleri

Örnek	TEAC _{CUPRAC} (mmol TR g ⁻¹)
IV-dek	2.331±0.089
IV-inf	1.331±0.080
HİDROSOL	0.129±0.022
BHA	2.521±0.022
BHT	2.462±0.046
CUR	2.511±0.139
CVİT	0.27±0.094
α TOC	0.108±0.040



Şekil 3.48: *I. viscosa* çay örneklerinin (infüzyon ve dekoksasyon), hidrosolün ve standart antioksidanların CUPRAC yöntemi ile belirlenen indirgeme kapasitelerinin karşılaştırılması

3.6.3 FRAP Yöntemi Sonuçları

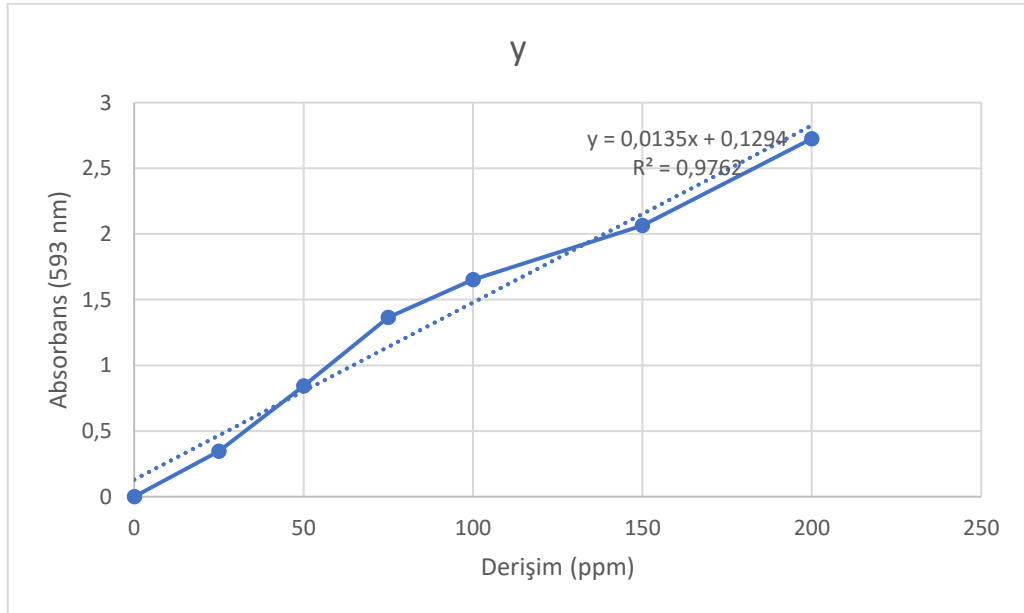
Standart madde olarak troloks kullanılmış olup kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve sonuçlar mmol ekstre başına mmol troloks eşdeğeri olarak verilmiştir.

FRAP aktivite sonuçları Tablo 3.16’da sunulmuştur.

Tablo 3.16: *I. viscosa* ekstreleri, çay örnekleri ve hidrosolünün troloks eşdeğeri cinsinden demir indirgeyici antioksidan gücü (FRAP)

Ekstre	TEAC _{FRAP} (mmol TR g ⁻¹)
IVH	49.551±1.593
IVA	155.575±4.802
IVM	138.785±3.356
DIVA	166,958±6.606
DIVM	176,119±0.910
DIVPE	76.711±3.783
IV-hidrosol	4.711±2.449
IV-dek	209.921±1.377
IV-inf	187.674±3.015

Bu veriler doğrultusunda elde edilen ve numunelerin konsantrasyon hesaplamalarında temel alınan kalibrasyon eğrisi ise Şekil 3.49’da verilmiştir.



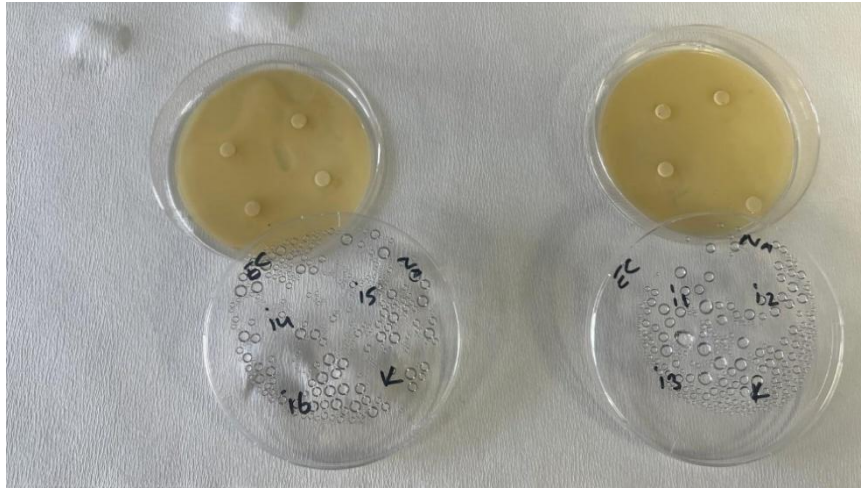
Şekil 3.49: FRAP analizi miktar tayininde esas alınan troloks kalibrasyon eğrisi.

3.7 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

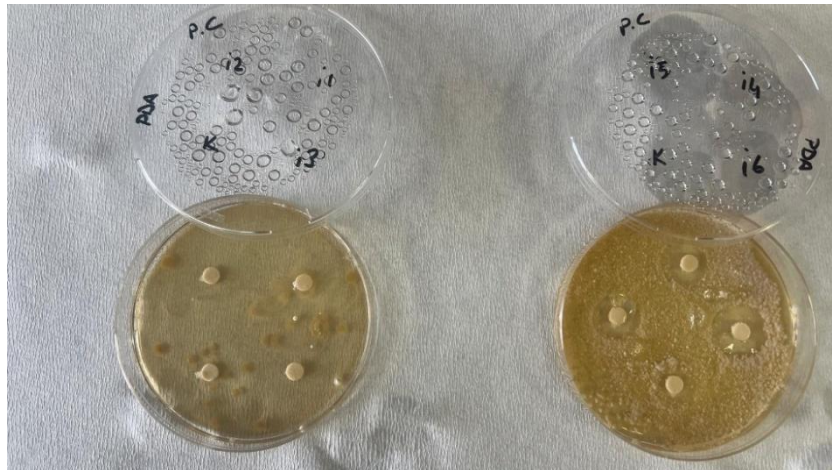
Ekstrelerin antimikrobiyal potansiyellerini değerlendirmek amacıyla disk difüzyon metodu kullanılmıştır. *I.viscosa* bitkisinde elde edilen ekstrele ait antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 3.17’de verilmiştir. Kontrol olarak etanol (C_2H_5OH) kullanılmıştır.

Tablo 3.17: Elde edilen ekstrele ait antimikrobiyal aktivite sonuçları

Ekstre	İnhibisyon alanı (mm)			
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.parasiticus</i>	<i>P.chysogenum</i>
IVH	-	25	16	-
IVA	-	12	21	14
IVM	-	-	15	-
DIVPE	-	14	-	14
DIVA	-	-	17	16
DIVM	-	32	16	18
KONTROL	-	-	-	-

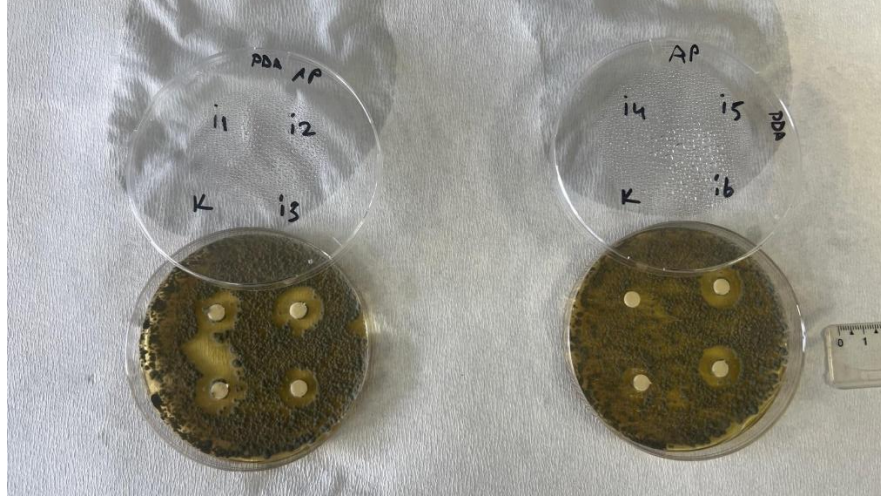


Escherichia coli

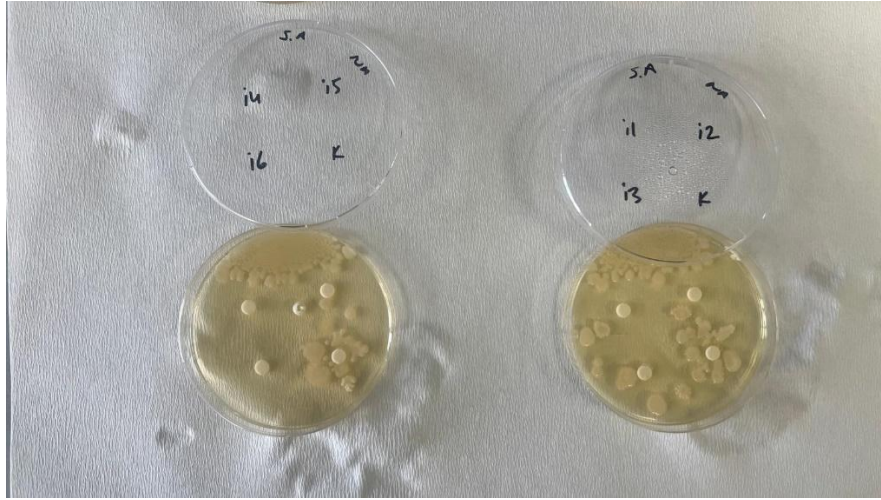


Penicillium chysogenum

Şekil 3.50 (devam)



Aspergillus parasiticus



Staphylococcus aureus

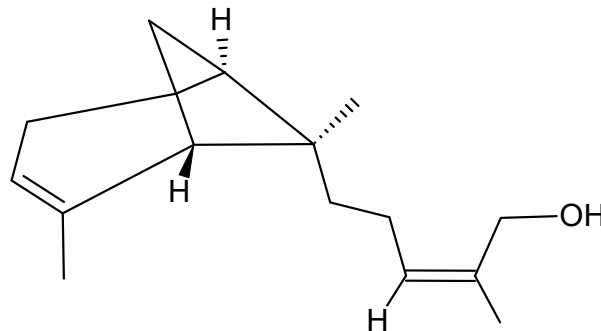
Şekil 3.50: *I. viscosa* ekstralarının inhibisyon zon çapları

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

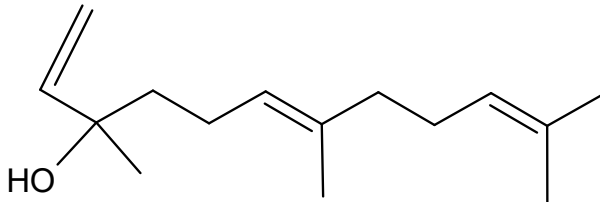
4.1 GS-MS Analiz Sonuçları

Inula viscosa bitkisinden elde edilen numunenin GC-MS analizi sonucunda toplam 74 bileşen tespit edilmiş ve kromatogramda saptanan piklerin toplam alana oranları üzerinden bağıntılı (%) miktarları belirlenmiştir. Analiz edilen uçucu bileşenlerin toplam alan içerisindeki payı %100,0 olup, bu bileşenlerin %22,20'sini oluşturan 22 adet pik tanımlanamayan bileşik olarak kaydedilmiştir. Tanımlanan bileşikler kimyasal yapılarına göre beş ana grupta sınıflandırılmıştır.

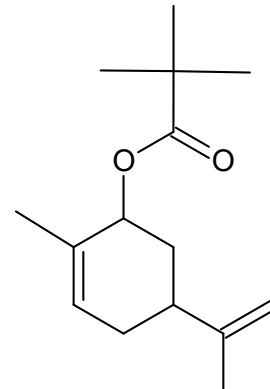
Inula viscosa numunesinin en baskın ana bileşeni, %10,60 bağıl alan oranı ile bir oksijenli seskiterpen olan (Z)- α -trans-bergamotol olarak belirlenmiştir. Bu ana bileşeni sırasıyla diğer önemli oksijenli seskiterpen türevleri olan nerolidol (%6,04), limonen-6-ol pivalat (%5,93), (-)-karyofillen oksit (%5,65) ve β -ödesmol (%5,38) takip etmektedir. İncelenen numunenin seskiterpen türevleri bakımından zengin bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.



(Z)- α -trans-bergamotol

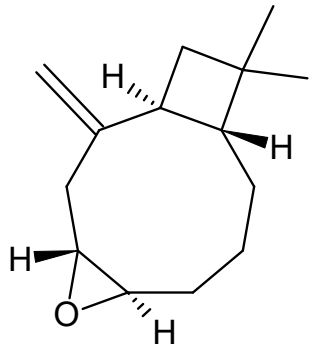


Nerolidol

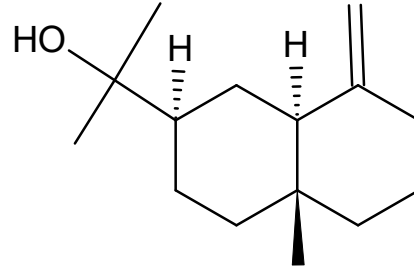


Limonen-6-ol pivalat

Şekil 4.1: (devam)



(-)-karyofillen oksit



β -ödesmol

Şekil 4.1: Belirlenen bileşiklerin kimyasal yapısı

4.2 Fenolik Bileşen Analiz Sonuçları

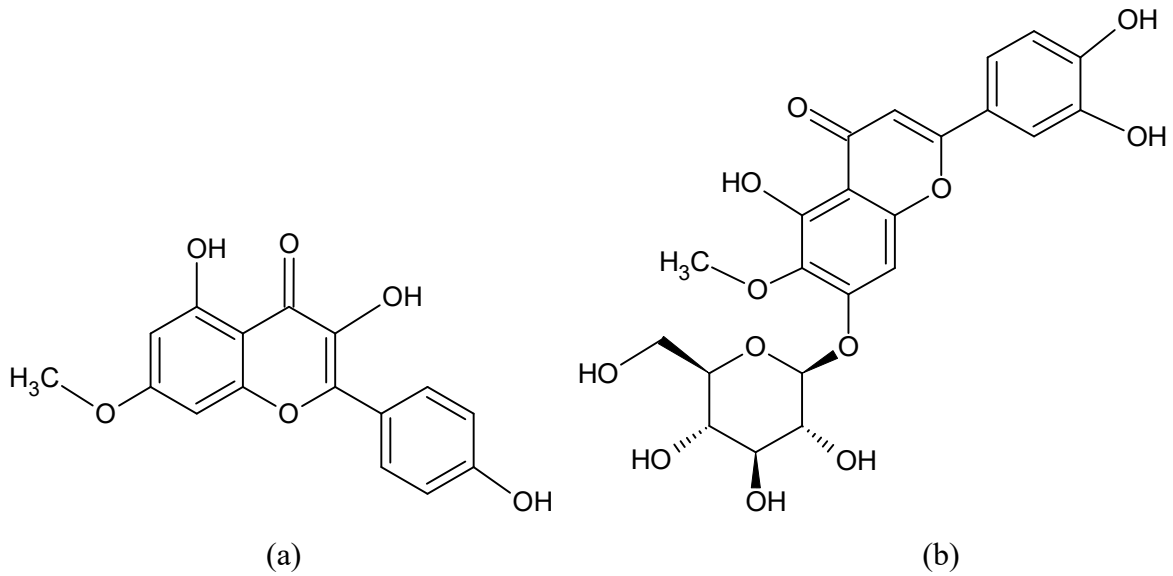
I. viscosa bitkisinden elde edilen altı farklı ekstrenin fenolik bileşenleri ve bu bileşenlerin miktarları LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda; 22 tane flavonoid, 7 fenolik asit, 1 antosiyanin, 1 antrakınon, 1 amino asit, 2 fenolik glikozit ve diğer polifenoller olmak üzere toplam 33 adet sekonder bileşik tanımlanmış olup, bu bileşiklerin detaylı listesi ve miktarları Tablo 3.2 ve 3.3'te sunulmuştur. Tayin edilen tüm bileşikler kimyasal yapılarına göre beş ana kategoride incelenmiştir: (I) Flavonoidler ve türevleri, (II) Fenolik asitler, (III) Antosiyaninler, (IV) Fenolik glikozitler ve diğer polifenoller, (V) Diğer bileşikler (Antrakınonlar ve Aminoasitler).

Fenolik içerik zenginliği bakımından ekstrelerin büyükten küçüğe sıralaması şu şekildedir: IVA> DIVA>IVM >DIVM>IVH >DIVPE.

Elde edilen veriler, orta polaritedeki bir çözücü olan asetonun, *I. viscosa* bünyesindeki flavonoid türevlerini ekstrakte etmede en yüksek kapasiteye sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Özellikle kademeli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen IVA ekstresinin, direkt yöntemle elde edilen DIVA ekstresine oranla daha fazla fenolik madde içermesi, ön temizleme (hekzan ile yağ giderme) basamağının fenolik bileşenlerin konsantre edilmesindeki etkinliğini göstermektedir.

Hekzan ve petrol eteri gibi apolar çözücülerin kullanıldığı ekstrelerde toplam madde miktarının çok daha düşük kalması, *I. viscosa* bünyesindeki sekonder metabolitlerin büyük bir kısmının orta ve yüksek polaritedeki çözücülerde daha iyi çözüldüğünü kanıtlamaktadır.

Fenolik profilin baskın olarak flavonoidler ve bunların glikozit türevlerinden oluştuğu saptanmıştır. Tüm ekstrelerde ramnositrin, miktar açısından en baskın majör bileşen olarak tanımlanmıştır. Ramnositrin miktarları incelendiğinde, kademeli ekstraksiyonun aseton fazında (IVA: 2273,07 mg/kg) ve direkt aseton ekstresinde (DIVA: 1942,06 mg/kg) en yüksek seviyelere ulaştığı görülmektedir. Bunu sırasıyla metanol ekstreleri (IVM: 1828,77 mg/kg ve DIVM: 1640,75 mg/kg) takip etmektedir. Ramnositrin'in düşük polariteli hekzan (IVH: 488,18 mg/kg) ve petrol eterinde (DIVPE: 156,18 mg/kg) dahi ana bileşen olarak bulunması, bu bileşiğin bitki bünyesindeki yüksek biyosentez kapasitesini ve geniş bir çözünürlük yelpazesine sahip olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.2: Ramnositrin (a) ve nepetin-7-glikozit'in (b) kimyasal yapısı

Ramnositrinin toplam fenolik içerik içerisindeki yüzdesi incelendiğinde; apolar karakterli hekzan (IVH: %86.94) ve petrol eteri (DIVPE: %84.71) ekstralarında, fenolik yükün neredeyse tamamını tek başına oluşturduğu görülmektedir. Bu durum, ramnositrin yapısındaki metil grubunun sağladığı hidrofobik karakter sayesinde, bileşiğin düşük polariteli çözücülerde yüksek saflıkta ekstrakte edilebildiğini göstermektedir.

Buna karşın, toplam fenolik madde miktarının en yüksek olduğu aseton (IVA: %59.22) ve metanol (IVM: %64.38) ekstralarında ramnositrin oranının bir miktar azalması; bu çözücülerin nepetin-7-glikozit, rutin ve verbaskozit gibi daha polar bileşikler de yüksek verimle çözebilmesinden kaynaklanmaktadır.

Ekstrelerin karakteristik profilini belirleyen bir diğer önemli grup ise nepetin ve nepetin-7-glikozit'tir. IVA ve DIVA ekstralarında nepetin'in aglikon formu daha baskınken, metanol gibi polaritesi daha yüksek çözücülerde glikozit türevi olan nepetin-7-glikozit'in (IVM için 410,06 mg/kg) miktarının arttığı gözlenmiştir. Bu durum, metanolün glikozit yapısındaki polar bileşikler ekstrete etmedeki etkinliğini göstermektedir.

İki flavon akasetin ve kuersetin, özellikle aseton ve metanol ekstralarında mg/kg üzerindeki değerleri ile öne çıkan ana bileşenlerdir. Verbaskozit sadece metanol ekstralarında (IVM ve DIVM) ilk 5 bileşen arasına girmesi, bu feniletanoid glikozidinin yüksek polaritedeki çözücülerde çözündüğünün göstergesidir. Rosmarinik asidin apolar ekstralarda (IVH ve DIVPE) ilk sıralarda yer alması, düşük konsantrasyonlarda olsa da bu ekstraların antioksidan kapasitesine katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Çay örnekleri incelendiğinde, uygulanan dekoksasyon ve infüzyon yöntemlerinin bileşiklerin suya geçiş verimi üzerinde belirleyici olduğu görülmektedir. Genel olarak dekoksasyon (IVM-dek) yöntemi; yüksek sıcaklık ve konvektif hareketlerin hücre duvarını daha efektif parçalaması sayesinde, polar bileşenlerin çoğunda infüzyon (IVM-inf) yöntemine kıyasla daha yüksek bir ekstraksiyon verimi sağlamıştır.

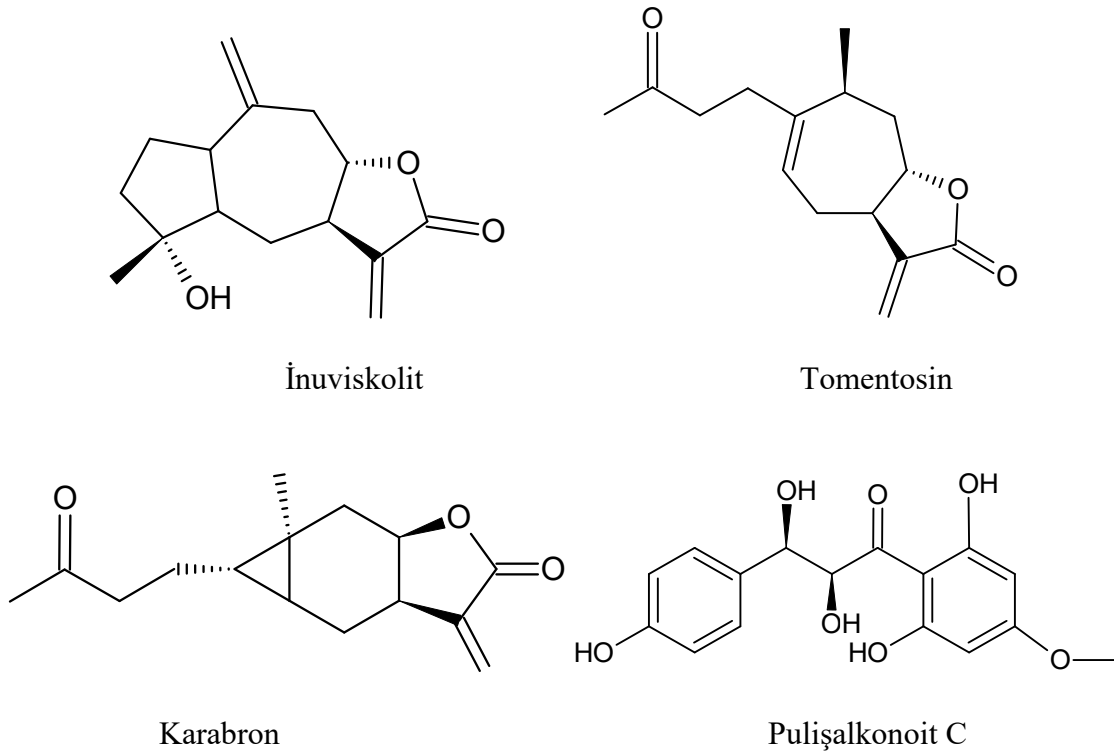
Her iki çay formunda da en baskın ana bileşen olarak nepetin-7-glukozit saptanmıştır (IVM-dek için 0.654 mg/kg, IVM-inf için 0.530 mg/kg). Yapısındaki şeker halkasının sağladığı yüksek hidrofilik karakter ve hidrojen bağı kurma kapasitesi, bu bileşiğin sulu fazda yüksek oranda çözünmesini kolaylaştırmıştır. Benzer şekilde, bir diğer flavonoid glikozidi olan hiperozit miktarı da dekoksasyon ekstresinde (0.154 mg/kg) daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak; *I. viscosa*'nın fenolik zenginliğini büyük oranda ramnositrin, nepetin türevleri, akasetin, kuersetin ve hidrofilik glikozitler oluşturmaktadır. Kademeli ekstraksiyonun (IVA), direkt ekstraksiyona (DIVA) göre daha yüksek değerler sunması,

asetondan daha az polar olan çözücülerin ortamdaki apolar bileşenleri uzaklaştırarak, polar bileşenlerin aseton ve metanol gibi çözücülere daha konsantre bir şekilde geçmesini kolaylaştırdığını göstermektedir. Su bazlı çay formlarında ise yüksek sıcaklık ve hücre duvarı tahribatı sağlayan dekoksiyon yönteminin, nepetin-7-glukozit ve hiperozit gibi polar glikozitlerin sulu faza geçişinde en yüksek verimi sunduğu tespit edilmiştir.

4.3 *Inula viscosa* Bitkisinden İzole Edilen Bileşikler

I. viscosa bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan hekzan, aseton ve metanol ekstrelerinden 3 seskiterpen lakton, 1 şalkon bileşiği izole edildi. Elde edilen bileşiklerin yapıları Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3: *I.viscosa* bitkisinden izole edilen bileşikler

4.4 Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları

Ekstrelerin toplam fenolik madde içerikleri, Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak gallik asit eşdeğeri (GAE) cinsinden belirlenmiştir. Bu yöntemin temel prensibi; bazık ortamda fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu ayracı ile tepkimeye girerek mavi-yeşil renkli bir kompleks oluşturmaya dayanmaktadır. Şekil 3.44'te sunulan ve deney sürecinde gözlemlenen sarıdan koyu mavi/yeşil tona doğru gerçekleşen renk değişimi; ekstrelerin

indirgeme kapasitesinin ve buna bağı olarak toplam fenolik madde içeriğinin doğrudan bir göstergesidir.

Tablo 3.10 verilerine göre, ekstrelerin fenolik madde içerikleri 3.28 ile 182.64 mg GAE/g arasında geniş bir yelpazede değişim göstermektedir. Ekstrelerin toplam fenolik madde içeriği bakımından zenginlik sıralaması büyükten küçüğe şu şekildedir:

IVM> IVA>DIVA >DIVM>IVH >DIVPE.

Analiz sonuçları; metanol ekstresinin (IVM: 182.64 mg GAE/g) aseton ve hekzan ekstrelerinden daha yüksek toplam fenolik içeriğe sahip olduğunu, metanol gibi polar çözücülerin fenolik bileşen ekstraksiyonunda önemli olduğunu bir kez daha göstermiştir.

Metanolün yüksek dielektrik sabiti hem ramnositrin gibi serbest flavonoidleri hem de nepetin-7-glikozit ve verbaskozit gibi daha polar ve şeker bağı formları aynı anda çözebilmesini sağlamıştır. Buna karşın asetonun (IVA ve DIVA), daha çok lipofilik karakterdeki bileşikler üzerinde seçici olduğu ve bu durumun toplam fenolik madde miktarı ile LC-MS/MS analizinde bulunan ana bileşenlerle tam bir uyum içinde olduğu görülmektedir. Özellikle IVM ve IVA ekstrelerinde saptanan yüksek ramnositrin içeriği ile toplam fenolik değerler arasındaki doğru orantı, bu majör flavonun Folin-Ciocalteu ayırıcı ile etkileşime giren temel indirgen bileşen olduğunu doğrulamaktadır.

Ayrıca, kademeli ekstraksiyon yönteminin (IVM ve IVA), direkt ekstraksiyona (DIVM ve DIVA) kıyasla fenolik bileşikler konsantre etmede daha etkili olduğu saptanmıştır. Apolar karakterli hekzan (IVH) ve petrol eteri (DIVPE) ekstrelerinde fenolik içeriğin oldukça düşük saptanması ise *I. viscosa*'nın aktif bileşenlerinin büyük oranda orta ve yüksek polariteye sahip moleküllerden oluştuğunu kesinleştirmektedir.

4.5 Toplam Antosiyanin Miktarı Sonuçları

Test edilen örnekler arasında hem net absorbans değeri hem de toplam antosiyanin miktarı en yüksek olan ekstre IVA olmuştur. Bu durum, IVA ekstresinin elde edilmesinde kullanılan çözücü polaritesinin antosiyanin pigmentlerini çözmede diğerlerine göre belirgin şekilde daha etkili olduğunu gösterir.

IVH ekstresi, net absorbans ve toplam antosiyanin miktarı ile en zayıf sonucu vermiştir. Muhtemelen bu ekstrenin hazırlanmasında hekzan gibi apolar bir çözücü kullanılması, polar yapıda olan antosiyaninleri yapısına alamamıştır. Asetonun metanol,hekzan ve petrol eteri çözücülerine kıyasla antosiyanin ekstraksiyonunda bariz bir üstünlük sağladığı görülmektedir.

Sonuçlar genel olarak incelendiğinde, *I. viscosa* ekstrelerinin toplam antosiyanin içeriklerinin nispeten düşük düzeyde olduğu söylenebilir. Bu durum, antosiyaninlerin genellikle kırmızı/mor meyvelerde yoğun olarak bulunmasından ve *I. viscosa* bitkisinin ana fitokimyasal bileşenlerinin antosiyaninlerden ziyade fenolik asitler, flavonoidler ve terpenoitler olmasından kaynaklanmaktadır.

4.6 Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.6.1 DPPH Yöntemi Sonuçları

Çalışma kapsamında hazırlanan *I. viscosa* ekstrelerinin antioksidan potansiyelleri, DPPH serbest radikal giderme yöntemi ile 10, 25, 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarda incelenmiş ve sonuçlar Tablo 3.13'te sunulmuştur. Elde edilen bulgular, ekstrelerin radikal giderme kapasitelerinin genel olarak konsantrasyon artışına paralel olarak yükseldiğini göstermektedir.

Tüm konsantrasyonlarda en yüksek inhibisyon değerini IVM ekstresi sergilemiştir. Özellikle 50 ppm konsantrasyonda 78.91 ± 3.06 inhibisyon değeri ile IVM ekstresi, aynı konsantrasyondaki standart antioksidanlardan BHT (%53.84) ve kurkumin'den (%10.34) çok daha yüksek bir aktivite göstermiştir. Bu durum, metanol ekstresinin radikal süpürücü özelliği yüksek olan fenolik bileşenler bakımından zengin olduğunu kanıtlamaktadır.

Diğer taraftan, petrol eteri ve hekzan gibi apolar ekstrelerin radikal giderme kapasitelerinin oldukça düşük olduğu (20 ppm'de sırasıyla %8,44 ve %4,13) saptanmıştır.

Bu veriler, *I. viscosa*'daki antioksidan etkili bileşenlerin daha çok orta ve yüksek polaritedeki çözücülerle ekstrakte edildiğini ortaya koymaktadır.

4.6.2 CUPRAC Yöntemi Sonuçları

CUPRAC yöntemi, antioksidanların bakır kompleksini indirgeme yeteneğine dayanır ve sonuçlar genellikle troloks eşdeğeri (TEAC) üzerinden ifade edilir. Tablo 3.14’te görüldüğü üzere, *I. viscosa* ekstrelerinin indirgeme kapasiteleri anlamlı farklılıklar göstermektedir.

Yapılan analizler sonucunda, test edilen tüm numuneler arasında en yüksek indirgeme kapasitesinin 0.97 ± 0.05 mmol TR g⁻¹ değeri ile IVM ekstresinde olduğu saptanmıştır. IVM ekstresini sırasıyla IVA (0.63 ± 0.03) ve DIVA (0.62 ± 0.04) ekstreleri takip etmiştir. Bu veriler, *I. viscosa* bitkisindeki indirgeyici ajanların orta ve yüksek polariteli çözücülerde daha etkin bir şekilde toplandığını göstermektedir. En düşük aktivite değerleri ise apolar karakterli olan IVH (0.40 ± 0.11) ve DIVPE (0.41 ± 0.03) ekstrelerinde ölçülmüştür.

Sonuç olarak, *I. viscosa* ekstrelerinin bakır indirgeme kapasitelerinin bitkinin fenolik içeriğiyle uyumlu olduğu ve özellikle metanol ekstresinin metal iyonlarını indirgeme konusunda kayda değer bir biyolojik potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Hazırlanan *I. viscosa* dekoksasyon ve infüzyon ekstraktlarına ait sonuçlar ise troloks eşdeğeri (mmol TE g⁻¹) cinsinden Tablo 3.15’te sunulmuştur. Tablo verileri incelendiğinde, *I. viscosa* sulu ekstraktlarının son derece güçlü bir antioksidan aktivite sergilediği görülmektedir. En yüksek antioksidan kapasite 2.555 ± 0.147 mmol TE g⁻¹ değeri ile IV-dek örneğinde tespit edilmiştir. Bu aktivite değeri, güçlü sentetik antioksidanlar olan BHA ve BHT ile doğal bir antioksidan olan Kurkumin standartlarından daha yüksek veya onlarla çok yakın bir etkinlik düzeyini göstermektedir.

Ekstraksiyon yöntemleri kendi arasında kıyaslandığında, kaynatma esasına dayanan dekoksasyon örneklerinin (IV-dek), demleme yöntemiyle hazırlanan infüzyon örneklerine (IV-inf) kıyasla daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, yüksek sıcaklıkta uzun süre kaynatmanın bitkideki polifenolik bileşikler ve flavonoid yapıları çözücü ortama daha fazla geçirmesinden kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, *Inula viscosa* çay örneklerinin, yüksek antioksidan aktivite göstermesi; bu bitkinin potansiyel bir doğal antioksidan kaynağı olarak fonksiyonel gıda ve farmasötik ürünlerde kullanılabilirliğini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

4.6.3 FRAP Yöntemi sonuçları

Tablo verileri genel olarak incelendiğinde, *Inula viscosa* örneklerinin demir indirgeme kapasitelerinin son derece yüksek olduğu ve antioksidan aktivitenin kullanılan çözücünün polaritesine ve uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir.

Analiz edilen tüm numuneler arasında en yüksek demir indirgeme gücü değeri ile IV-dek örneğinde saptanmış, bunu sırasıyla IV-inf takip etmiştir. Bu bulgu; su gibi yüksek polariteye sahip bir çözücü kullanılmasının ve özellikle kaynatma işleminin, bitki yapısındaki demir indirgeyici polifenol ile flavonoid glikozitlerini yüksek düzeyde açığa çıkardığını göstermektedir. Ham ekstreler kendi içerisinde kıyaslandığında ise DIVA ve DIVM, IVM'ye kıyasla belirgin şekilde daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın, apolar bir çözücü olan petrol eteri fraksiyonu DIVPE, IVH ve hidrosol ise en düşük FRAP değerlerini sergilemiştir. Hidrosol örneğinin polaritesi yüksek olmasına rağmen aktivitesinin bu denli düşük kalması, yapısında demir indirgeme yeteneği yüksek olan polifenolik bileşikler barındırmaması ve sadece suda çözünürlüğü bulunan bazı uçucu organik bileşikler içermesiyle açıklanabilir.

4.6.4 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

I. viscosa bitkisinden elde edilen farklı ekstrelerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri; Gram-negatif bir bakteri (*E. coli*), Gram-pozitif bir bakteri (*S. aureus*) ve iki fungal tür (*A. parasiticus*, *P. chrysogenum*) üzerinde disk difüzyon yöntemiyle test edilmiştir. Elde edilen inhibisyon zonu (mm) değerleri Tablo 3.17'de sunulmuştur.

Yapılan analizler sonucunda, tüm ekstrelerin Gram-negatif bir bakteri olan *E. coli* üzerinde herhangi bir inhibisyon alanı oluşturmadığı ve bu türe karşı dirençli kaldığı saptanmıştır. Buna karşın, ekstrelerin Gram-pozitif bir bakteri olan *S. aureus* üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür. Özellikle direkt metanol (DIVM) ekstresi 32 mm ve hekzan (IVH) ekstresi 25 mm inhibisyon zonu oluşturarak yüksek antibakteriyel potansiyel sergilemiştir.

Antifungal aktiviteler incelendiğinde, *A. parasiticus* türüne karşı tüm ekstrelerin değişen oranlarda duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu türe karşı en geniş inhibisyon alanı 21 mm ile aseton (IVA) ekstresinde ölçülürken; DIVA (17 mm), IVH (16 mm) ve DIVM (16

mm) ekstreleri de kayda değer aktivite göstermiştir. *P. chrysogenum* türü üzerinde ise en yüksek etkinlik 18 mm ile DIVM ve 16 mm ile DIVA ekstreleri tarafından sergilenmiştir.

Genel bir değerlendirme yapıldığında, direkt ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen orta ve yüksek polariteli ekstrelerin (DIVM ve DIVA) mikroorganizma gelişimini engellemede daha geniş spektrumlu bir başarı gösterdiği saptanmıştır. Şekil 3.50’de sunulan Petri kutusu görüntüleri, özellikle *S. aureus* ve *A. parasiticus* plaklarındaki şeffaf zonlar aracılığıyla bu sayısal verileri görsel olarak desteklemektedir. Sonuç olarak, *I. viscosa* ekstrelerinin mikroorganizma türüne spesifik antimikrobiyal potansiyele sahip olduğu değerlendirilmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Abeda, F. M., Saker, L. A., & Youssef, A. I.** (2024). Determination of essential oil compositions as well as phenolic and flavonoid contents of *Inula viscosa* (L.) and *Inula graveolens* L. from the coastal region of Latakia - Syria. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 62(4). <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS6260>
- Aboujanah, A. A. A.** (2019). Kanser otu (*Inula viscosa*) ekstraktlarının antimikrobiyal ve DNA koruma özelliklerinin belirlenmesi (Yüksek lisans tezi, Kastamonu Üniversitesi). Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Veri Tabanı, (44)
- AbuZarga, M. H., Sabri, S. S., Hamed, E. M., Khanfar, M. A., Zeller, K. P., & Atta-Ur-Rahman.** (2003). A new eudesmane type sesquiterpene from *Inula viscosa*. *Natural Product Research*, 17(2), 99-102.
- Acıbuca, V. & Budak, D. B.** (2018). Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(1), 37-44.
- Aissa, I., Znati, M., Zardi-Bergaoui, A., Flamini, G., Ascrizzi, R., & Jannet, H. B.** (2019). GC and GC-MS integrated analyses and in vitro antibacterial, anticholinesterase, anti-tyrosinase, and anti-5-lipoxygenase potential of *Inula viscosa* root fractionated essential oil. *South African Journal of Botany*, 125, 386-392.
- Alalan, L., Al-Shammaa, I., & Al-Nouri, A. S.** (2016). Isolation and identification of six terpenes extracted from leaves of *Inula viscosa* (L.) grown in Syria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(1), 101-106.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M.** (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Albayrak, F.** (2022). *Cirsium mill. (Asteraceae, sect. epitachys DC.) cinsinin üç farklı türünün hibritleşmesinin filogenetik analizi* (Master's thesis, Balıkesir University (Turkey)).
- Albayrak, S., Sağdıç, O., & Aksoy, A.** (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(4), 401-409.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Alpaslan, P.** (2013). *Xanthium strumarium* L. bitkisinden biyolojik aktif bileşiklerin izolasyonu, yapılarının aydınlatılması ve asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin incelenmesi [Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi]. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Amrouche, S., Faroudja M., & Ratiba D.** (2020). "Extraction of phenolic compounds from algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton leaves: kinetic study and modeling." *Separation Science and Technology* 55.17 3161-3174.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Çelik, S. E.** (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchimica Acta*, 160(4), 413-419.
- Araújo, H. C., Lacerda, M. E. G., Lopes, D., Bizzo, H. R., & Kaplan, M. A. C.** (2007). Studies on the aroma of maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) using headspace solid-phase microextraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 18(6), 469-474.
- Aydin, T., Saglamtas, R., Dogan, B., Kostekci, E., Durmus, R., & Cakir, A.** (2022). A new specific method for isolation of tomentosin with a high yield from *Inula viscosa* (L.) and determination of its bioactivities. *Phytochemical Analysis*, 33(4), 612-618.
- Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah M., Ganash M. Mohammad A. K., & Ashraf, G. M.** (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*, 19(13), 1100-1110
- Azzam, M. O. J. & Obaid, L. M. A.** (2025). Extraction of essential oils from *Artemisia jordanica* by vacuum distillation, steam distillation and hydro-distillation using solar energy. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 1-16.).
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M.** (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.).
- Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., & Catalan, J. V.** (2008). *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: Phytochemistry and biological activity. *Natural Product Communications*, 3(11), 1934578X0800301110.
- Bektaş, D.** (2014). Limon otu (*Lippia citriodora*) ekstraktı ve sitralin *escherichia coli* üzerine antimikrobiyel etkisinin araştırılması (Master's thesis, Bursa Uludag University (Turkey)).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Benkeblia, N.** (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-food Science and Technology*, 37(2), 263-268.
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F.** (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- Biemer, J. J.** (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 3(2), 135-140.
- Boyanay, K. Ö.** (2013). Turunçgil yapraklarından çeşitli ayırma yöntemleri ile uçucu yağ eldesi ve bileşiminin incelenmesi (Yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi, İstanbul).
- Bülbül, L. E.** (2016). Erzurum’da yetişen bazı bitki türlerinin uçucu yağlarının bileşenleri, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri (Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi. (Tez No. 434824)
- Büyüktuncel, E.** (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(2), 93-103.
- Camel, V.** (2001). Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193
- Cellat, K.** (2011). Bazı endemik bitkilerin uçucu yağ bileşenlerinin ekstrakte edilmesi ve içeriklerinin araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, (73).
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H.** (2006). Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, Blackwell-Publishers, (372).
- Çarıkçı, S.** (2010). Bazı *Sideritis* (*Sideritis niveotomentosa*, *Sideritis hololeuca*, *Sideritis brevidens*) türlerinin diterpenik bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini. Doktora tezi, Balıkesir Üniversitesi, Türkiye.
- Çelik, E. E.** (2017). Determination of the Interactions Between Bound and Free Antioxidants Naturally Occurring in Foods, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Hacettepe Üniversitesi Kütüphanesi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çöl, Ç. (2007). *Sideritis tmolea* PH Davis bitkisinin diterpen bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini, Yüksek Lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, Türkiye.
- D'Andrea, G. (2015). RETRACTED: Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 106, 256-271.
- De Laurentis, N., V. Losacco, M.A. Milillo, & O. Lai (2002). Chemical investigations of volatile constituents of *Inula viscosa* (L.) Aiton (Asteraceae) from different areas of Apulia, Southern Italy. *Delpinoa* 44: 115-119.
- Dereli, S. (2016). *Sideritis bilgerana* P. H. Davis bitkisinin fitokimyasal analizleri (Yüksek Lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Devecioglu, D. (2018). Investigation of the antifungal activity of different essential oils and their nanofibers [Yayımlanmamış yüksek lisans tezi]. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri, Mühendislik ve Teknoloji Enstitüsü.
- Díaz, E. (1968). Conformación de la carabrona. Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, 20, 83–90.
- Donoso-Bustamante, V., Osorio, E., Arias-Santé, M. F., De Camargo, A. C., Rincón-Cervera, M. Á., Amalraj, J., Carrasco B., Palomo I., & Araya-Maturana, R. (2025). Antioxidant activity of sinapic acid anilides: DPPH, ABTS, FRAP, electrochemical and theoretical analysis. *LWT*, 222, 117656.
- Elmann, A., Telerman, A., Erlank, H., Mordechay, S., Rindner, M., Ofir, R., & Kashman, Y. (2013). Protective and antioxidant effects of a chalconoid from *Pulicaria incisa* on brain astrocytes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013(1), 694398.
- Erdal, B., Yılmaz, B., & Baylan, B. (2022). Investigation of The Antibacterial and Anticarcinogenic Effects of *Inula viscosa* Methanol and Hexane Extracts. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 79(1), 133-144.
- Ertürk, R., Çelik, C., Kaygusuz, R., & Aydın, H. (2010). Ticari olarak satılan kekik ve nane uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. *Cumhuriyet Medical Journal*, 32(4), 281-286.
- Faydaoğlu, E. & Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 11(1), 52-67.
- Fontana, G., La Rocca, S., Passannanti, S., & Pia Paternostro, M. (2007). Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa*. *Natural Product Research*, 21(9), 824-827.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fotakis, C., Tsigirmani, D., Tsiaka, T., Lantzouraki, D. Z., Strati, I. F., Makris, C., Tagkouli, D., Proestos, C., Sinanoglou V.J., & Zoumpoulakis, P.** (2016). Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chemistry*, 211, 963-971.
- Giamperi, L., Bucchini, A., Fraternale, D., Genovese, S., Curini, M., & Ricci, D.** (2010). Composition and antioxidant activity of *Inula crithmoides* essential oil grown in central Italy (Marche region). *Natural Product Communications*, 5(2), 1934578X1000500230.
- Grande, M., Torres, P., Piera, F., & Bellido, I. S.** (1992). Triterpenoids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry*, 31(5), 1826-1828.
- Go, M. L., Wu, X., & Liu, X. L.** (2005). Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Current medicinal chemistry*, 12(4), 483-499.
- Gökbulut, A.** (2011). Türkiye'de Yetişen Bazı *Inula* L. Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar (Doctoral dissertation, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Gören, A., C.** (2002), Bazı *Sideritis* (*Sideritis Argyrea*, *Sideritis Dichotoma*, *Sideritis Trojana*) Türlerinin Diterpenik Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Gupta, A., Naraniwal, M., & Kothari, V.** (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 1(1), 8–26.
- Güneş, Y.** (2021). Koyunlarda monepantelin sütle atılımında BCRP (ABCG2)'nin rolü ve bazı izoflavonoid bileşikleriyle olası etkileşiminin incelenmesi (Yayınlanmamış doktora tezi). İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Gürsul, H.** (2015). Yabani pancar (*Beta maritima* L. var. *pilosa* Del.) bitkisinin sekonder metabolitlerinin yapı tayini ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi (Yayınlanmamış doktora tezi). İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Harborne, A. J.** (1998). Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A.** (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and purification technology*, 54(1), 44-50.
- Irkin, R., Bozkurt, B., & Tumen, G.** (2021). Determination of the prevalence of *Salmonella* spp. and *S. aureus* in meat products by real-time PCR and testing their antibiotic susceptibility.
- Kale, S.** (2022). Design, synthesis and evaluation of some chalcone derivatives as antiproliferative agents. (Tez no: 732807). [Yüksek lisans tezi, Yeditepe Üniversitesi]. Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi.
- Kaufmann, B. & Christen, P.** (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(2), 105-113
- Karakaplan, N.** (2017). Nane (*Mentha spicata*) bitkisinden uçucu yağ eldesi için optimum koşulların araştırılması. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Malatya.).
- Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., & Adıgüzel, A.** (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85(2-3), 231-235.
- Karamenderes, C. & Zeybek, U.** (2000). Composition of the essential oils of *Inula viscosa*, *I. graveolens* and *I. helenium subsp. turcoracemosa*. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*, 33, 1-6.
- Kaya, A. A.** (2010). Bazı terpen ve 1,2,4,5-konumlarında S, O ve N atomları bulunduran sikloheksan türevlerinin sentezleri (Doktora tezi) Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Kaya, M.** (2021). Fıstık çamı (*Pinus Pinea L.*) ibre yapraklarında terpen konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kheyar-Kraouche, N., Bento da Silva, A., Serra, A. T., Bedjou, F., & Bronze, M. R.** (2018). Characterization by liquid chromatography–mass spectrometry and antioxidant activity of an ethanolic extract of *Inula viscosa* leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 156, 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.047>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M.** (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, 61(1), 1361779.
- Kılıç, A.** (2008). Uçucu yağ elde etme yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13), 37-45.
- Kırbağ, S. & Zengin, F.** (2006). Elazığ yöresindeki bazı tıbbi bitkilerin antimikrobiyal aktiviteleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 16(2), 77-80.
- Koes, R. E., Quattrocchio, F., & Mol, J. N.** (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16(2), 123-132.
- Kutlular, Ö.** (2007). Bazı adaçayı ve kekik türlerinin uçucu yağlarının süper ısıtılmış su ile ekstraksiyonları ve GC-MS ile karakterizasyonları (Master's thesis, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E.** (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.
- Lee, M. Y.** (2018). Essential oils as repellents against arthropods. *BioMed research international*, 2018(1), 6860271.)
- Li, C. & Schluesener, H.** (2017). Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 613-631. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.906382>.
- Madencioğlu Dirican, D.** (2023). Türkiye'nin uçucu yağ bitkileri veritabanı (Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İzmir). Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi
- Mossa, J. S., El-Feraly, F. S., Muhammad, I., Zaw, K., Mbwapbo, Z. H., Pezzuto, J. M., & Fong, H. H.** (1997). Sesquiterpene lactones and thymol esters from *Vicoa pentanema*. *Journal of Natural Products*, 60(6), 550-555.
- Mueller-Riebau, F., Berger, B., & Yegen, O.** (1995). Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2262-2266.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nasser, M., Housheh, S., Kourini, A., & Maala, N.** (2014). Chemical composition of essential oil from leaves and flowers of *Inula viscosa* (L.) in Al-Qadmous Region, Syria. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*, Vol.5, No. 12, 5177-5182 ref. 26.
- Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E.** (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, 101(1), 372-378.
- Ozkan, E., Karakas, F. P., Yildirim, A. B., Tas, I., Eker, I., Yavuz, M. Z., & Turker, A. U.** (2019). Promising medicinal plant *Inula viscosa* (L.): Antiproliferative, antioxidant, antibacterial and phenolic profiles. *Prog. Nutr*, 21, 652-661. <https://doi.org/10.23751/pn.v21i3.7186>.
- Öksüz, E.** (2019). *Scorzonera pisdica* ve *S. sandrasica* bitkilerinin fitokimyasal analizleri ve biyolojik aktiviteleri (Yüksek lisans tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye
- Öncü, M.** (2018). *Origanum L.* cinsi *Amaracus* ve *Anatolicon* seksiyonu türlerinin fitokimyasal analizleri ve biyolojik aktivite çalışmaları (Yayınlanmamış yüksek lisans tezi). Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, Türkiye.
- Özcan, D.** (2008). Üzüm çekirdeği ekstresinden flavan-3-ol bileşiklerinin adsorpsiyon prosesi ile saflaştırılması ve proses optimizasyonu. [Yayımlanmamış yüksek lisans tezi]. Anadolu Üniversitesi.
- Özer, Z.** (2019). Antioxidant Activity of decoction and infusion of *Teucrium chamaedrys subsp. chamaedrys* grown in Turkey. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 9(2), 289-296.
- Özer Sağır, Z.** (2016). Türkiye’de yetişen endemik *Sideritis L.* türlerinin (*Sideritis pisdica* Boiss. et Heldr. Apud Benth, *S. phrygia* Bornm., *S. brevibracteata* P.H. Davis) fitokimyasal analizleri [Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi]. Balıkesir Üniversitesi Kütüphanesi.
- Özer, Z.** (2010). *Sideritis L.* (Lamiaceae) türlerinden izole edilen siderol bileşiği üzerine deneysel ve hesapsal çalışmalar (Master's thesis, Balıkesir University (Turkey)
- Parolin, P., Scotta, M. I., & Bresch, C.** (2014). Biology of *Dittrichia viscosa*, a Mediterranean ruderal plant: a review. *Phyton*, 83(1), 251-262.
- Patel, K., Panchal, N., & Ingle, P.** (2019). Review of extraction techniques. *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci*, 6(3), 6-21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pensuk, W., Padumanonda, T., & Pichaensoonthon, C.** (2007). Comparison of the chemical constituents in *Michelia alba* flower oil extracted by steam distillation, hexane extraction and enfleurage method. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine*, 5(1), 30-39.
- Pérez-Alonso, M. J., Velasco-Negueruela, A., Duru, M. E., Harmandar, M., & García Vallejo, M. C.** (1996). Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Flavour and Fragrance Journal*, 11(6), 349-351.
- Pérez, M., Dominguez-López, I., & Lamuela-Raventós, R. M.** (2023). The chemistry behind the folin–ciocalteu method for the estimation of (poly) phenol content in food: Total phenolic intake in a mediterranean dietary pattern. *Journal of agricultural and food chemistry*, 71(46), 17543-17553.
- Pyrzyska, K. & Pękal, A.** (2013). Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), 4288-4295.
- Rammohan, A., Reddy, J. S., Sravya, G., Rao, C. N., & Zyryanov, G. V.** (2020). Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 433-458.
- Schinella, G. R., Tournier, H. A., Prieto, J. M., De Buschiazzo, P. M., & Rios, J. L.** (2002). Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life sciences*, 70(9), 1023-1033.
- Seglab, F., Abou Assali, M., AlYafei, T., Hassan, H., Pinto, D. C., Baydoun, S., Al Thani A.A., & Shaito, A. A.** (2024). A Terpenoid-Rich Fraction of *Inula viscosa*: Its Chemical Composition, Antioxidant Capacity, and Anticancerous Effects Against Human Lung Cancer Cells, *Preprints*. <https://doi.org/10.20944/preprints202407.0755.v1>.
- Selamoğlu, Z. & Arıcı, E. C. A.** (2025). Beslenme ve Sağlık Ekseninde Doğal Ürünler- “Arı Ürünleri”. *Wah Academia Journal of Health and Nutrition*, 1(2), 15-18.
- Selen, Z. T.** (2014). Bazı şalkon türevlerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi (Tez no: 382654) [Yüksek lisans tezi, Gaziantep Üniversitesi]. Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi.
- Sevindik E.,** (2014), Türkiye’de yetişen *Inula* L. (Asteraceae) türlerinin moleküler sistematik analizi ve ekolojisi. Doktora tezi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalı.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sevindik, E., Aydin, S., Paksoy, M. Y., & Sokmen, B. B.** (2020). Anti-urease, total phenolic content and antioxidant activities of some *Inula* l.(Asteraceae) taxa in Turkey. *Genetika*, 52(3), 825-834.
- Singh, J.** (2008). Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, 67, 32-35.
- Söylemezoğlu, G.** (2003). Üzümde fenolik bileşikler. *Gıda*, 28(3), 277-285.
- Sulsen, V. P. & Martino, V. S.** (2018). Sesquiterpene lactones. Advances in their Chemistry and Biological Aspects). *Cham: Springer. (p.120*
- Sutharut, J. & Sudarat, J.** (2012). Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. *International Food Research Journal*, 19(1).
- Şimşek, S.** (2025). Comprehensive Analysis of Trace Elements, Amino Acids, and Antioxidant Potential of *Verbascum orientale*. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 18(2), 391-413.
- Tambun, R., Alexander, V., & Ginting, Y.** (2021, March). Performance comparison of maceration method, soxhletation method, and microwave-assisted extraction in extracting active compounds from soursop leaves (*Annona muricata*): A review. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 1122, No. 1, p. 012095). IOP Publishing
- Tongnuanchan, P. & Benjakul, S.** (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of food science*, 79(7), R1231-R1249
- Uylaşer, V. & Başoğlu, F.** (2016). Temel Gıda Analizleri. Bursa: Dora Yayıncılık.
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R.** (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1(1), 60-69.
- Waterhouse, A. L.** (2002). Determination of total phenolics. Current protocols in food. *Analytical Chemistry*, 6(1), 11-1.
- Yegen, O., Berger, B., & Heitefuss, R.** (1992). Investigations on the fungitoxicity of extracts of 6 selected plants from Turkey against phytopathogenic fungi. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-journal of Plant Diseases and Protection*, 99(4), 349-359.
- Yetüt, İ.** (1998). The isolation and identification of sesquiterpene lactone constituents of the plants *Centaurea cheirolopha* Wagenitz and *Centaurea cuneifolia* Sm. [Yayımlanmamış yüksek lisans tezi]. Boğaziçi Üniversitesi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yılmaz, H.** (2018). *Origanum L. cinsi brevifilamentum seksiyonu türlerinin fitokimyasal analizleri ve biyolojik aktivite çalışmaları* (Master's thesis, Balıkesir University (Turkey)).
- Yılmaz, S.** (2012). *Echinops orientalis* trautv bitkisindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, yapı tayini, antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tokat.
- Vas, G. & Vekey, K.** (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of mass spectrometry*, 39(3), 233-254.
- Zhang, T., & Elomaa, P.** (2024). Development and evolution of the Asteraceae capitulum. *New Phytologist*, 242(1), 33-48.