

**KKTC
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KKTC'DE YETİŞEN *Lathyrus ochrus* (L.) DC. UÇUCU YAĞ İÇERİĞİNİN,
UÇUCU SEKONDER METABOLİTLERİNİN VE BAZI AKTİVİTE
ÖZELLİKLERİNİN TAYİN EDİLMESİ**

Yük.Kim. Seniha ARSAL KOR

**Analitik Kimya Programı
DOKTORA TEZİ**

**LEFKOŞA
2016**

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yöneten, tüm analizlerin yapılmasına olanak sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren Sayın Hocam Yrd.Doç.Dr. Kaan Polatoğlu'na,

Çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle çok değerli katkılarda bulunan Sayın Hocam Yrd.Doç.Dr. Banu Keşanlı'ya,

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında ve sonrasında her türlü desteği esirgemeyen, sabır gösteren değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Fabaceae (Leguminosea) Familyası.....	3
1.2. <i>Lathyrus</i> Cinsi.....	4
1.2.1. <i>Lathyrus ochrus</i> (L.) DC.	4
1.3. Uçucu Yağlar ve Özellikleri.....	5
1.3.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimi.....	8
1.3.2. Terpenler.....	9
1.3.2.1. Hemiterpenler.....	11
1.3.2.2. Monoterpenler.....	12
1.3.2.3. Seskiterpenler.....	13
1.3.2.4. Diterpenler.....	17
1.3.2.5. Triterpenler.....	18
A) Saponinler.....	19
B) Streoller.....	20
1.3.2.6. Tetraterpenler.....	21
1.4. Uçucu Yağ ve Uçucu Sekonder Metabolitleri Elde Etmede	
Kullanılan Yöntemler	22
1.4.1. Hidrodilasyon.....	22

1.4.2. Buhar Distilasyonu.....	23
1.4.3. Mikrodistilasyon.....	23
1.4.4. Katı-faz mikroekstraksiyon (SPME).....	24
1.5. Kromatografi.....	25
1.5.1. Kromatografi Türleri.....	27
1.5.1.1. Adsorpsiyon Kromatografisi.....	27
1.5.1.2. Dağılma (partisyon) Kromatografisi.....	27
A- Ters Faz Sıvı Kromatografisi.....	27
B- Normal Faz Sıvı Kromatografisi.....	28
1.5.1.3. İyon Çifti Kromatografisi.....	28
1.5.1.4. İyon Değiştirme Kromatografisi.....	28
1.5.1.5. Moleküler Eleme Kromatografisi.....	28
1.5.1.6. Afinite Kromatografisi.....	29
1.6. Gaz Kromatografisi (GC).....	29
1.6.1. Gaz Kromatografisinin Ayırma Etkinliği.....	30
1.6.1.1. Dağılma Sabitleri.....	30
1.6.1.2. Alıkonma Zamanı.....	31
1.6.1.3. Kolon Ayırma Gücü.....	32
1.6.2. Gaz Kromatografi Enstrümantasyonu.....	33
1.6.2.1. Taşıyıcı Gaz Kaynağı.....	33
1.6.2.2. Numune Enjeksiyon Sistemi.....	33
1.6.2.3. Kromatografik Fırın.....	34
1.6.2.4. Kromatografik Kolonlar.....	34
1.6.2.5. Dedektörler.....	35
A- Alev İyonizasyon Dedektörü (FID).....	35
B- Termal İletkenlik Dedektörü (TCD).....	36
C- Elektron Yakalama Dedektörü (ECD).....	37
1.7. Gaz Kromatografi / Kütle Spektrometri (GC-MS).....	38
1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC).....	41
1.8.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Enstrümantasyonu.....	42
1.8.1.1. Mobil faz.....	42

A- İzokratik Sistem.....	42
B- Gradient Sistem.....	42
1.8.1.2. Pompa.....	42
1.8.1.3. Enjektör.....	42
1.8.1.4. Kolon.....	43
A- Normal Faz Sıvı Kromatografisi.....	43
B- Ters Faz Sıvı Kromatografisi.....	43
C- İyon Değişirme Kromatografisi.....	44
D- Boyut Dışlama(Eleme) Kromatografisi.....	44
1.8.1.5. Dedektörler.....	44
1.9. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC).....	45
1.10. <i>Lathyrus</i> Türlerinin Uçucu Yağları ile İlgili Önceki Çalışmalar.....	46
1.11. <i>Lathyrus</i> Türlerinin Uçucu Olmayan Sekonder Metabolitleri Üzerinde Yapılmış Önceki Çalışmalar.....	48
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	50
2.1. Bitkisel Materyal.....	50
2.2. Kimyasal Materyaller ve Cihazlar.....	50
2.3. Ekstraksiyon.....	51
2.4. Hidrodistilasyon.....	52
2.5. Uçucu Yağ Analizleri	52
2.5.1. GC/MS Analizi.....	52
2.5.2. GC Analizi.....	53
2.5.3. Bileşiklerin Tanımlanması.....	53
2.6. SPME- GC/MS Analizi.....	53
2.7. Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	54
2.7.1. DPPH Aktivite Testi.....	55
2.7.2. PRAP Aktivite Testi.....	56
2.7.3. <i>L. minor</i> ile Fitotoksik Aktivite Testi.....	56
2.7.4. Antimikrobiyal Aktivite.....	57
3. BULGULAR.....	59
3.1. Uçucu Yağ İçeriklerinin GC-MS ve SPME/GC-MS ile Tayininden Elde Edilen Sonuçlar.....	59

3.1.1. GC/MS ile Tayin Edilen Bileşikler ve Yapıları.....	59
3.1.2. SPME/GC-MS ile Tayin Edilen Bileşikler ve Yapıları.....	63
3.2. <i>L. ochrus</i> Ekstrelerinin DPPH ve PRAP Aktivite Test Sonuçları.....	68
3.3. <i>L. ochrus</i> Uçucu Yağının DPPH ve PRAP Aktivite Test Sonuçları.....	69
3.4. <i>L. ochrus</i> Ekstrelerinin <i>L. minor</i> Üzerindeki Fitotoksik Aktiviteleri.....	70
3.5. <i>L. ochrus</i> Ekstrelerinin Uygulamasından Sonra Tek Bir 3 yapraklı <i>L. minor</i> Bitkisindeki Klorofil A, Klorofil B ve Toplam Klorofil miktarları (µg) ile İlgili Sonuçlar.....	70
3.6. <i>L. ochrus</i> Ekstrelerinin Farklı Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyal Aktivite (MIC) Sonuçları.....	71
4. TARTIŞMA.....	72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
6. KAYNAKLAR.....	76

ÖZET

KKTC’de Kıbrıs florası kayıtlarına göre *Lathyrus* cinsine ait 9 tür olduğu bilinmektedir. Bu türler *L. ochrus* (L.) DC., *L. aphaca* L., *L. annuus* L., *L. cicera* L., *L. gorgonei* Parl., *L. sativus* L. , *L. blepharicarpos* Boiss, *L. sphaericus* Retz, *L. saxatilis* (Vent.) Vis. olarak sıralanabilir.

Bu çalışmada *Lathyrus ochrus* (luvana) ile çalışılmıştır. Bu bitkinin uçucu yağ ve uçucu sekonder metabolit içeriği ile ilgili olarak KKTC’de veya başka bir ülkede daha önce yapılmış bir araştırma mevcut değildir. Araştırma sonucunda KKTC’de yetişen bu türün uçucu yağ ve uçucu sekonder metabolitlerin yapılarının tayin edilmesi için GC/GC-MS ve SPME/GC-MS yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada bu bitkiye ilk defa farklı biyolojik aktivite testleri olan HPTLC-DPPH, HPTLC-PRAP, MIC ve *Lemna minor* fitotoksik aktivite testleri yapılmıştır. Yapılan bu testlerden HPTLC-PRAP aktivitesi yeni bir metot olarak ortaya konulmuştur.

Yaptığımız çalışmada *Lathyrus ochrus* bitkisinin uçucu yağında toplam 20 adet madde tayin edilmiştir. Bu bitkinin uçucu yağında genel olarak diterpenler (54.9%), monoterpenler (1.0%), seskiterpenler (1.8%), yağ asitleri ile bunların esterleri (33.8%) bulunmaktadır. Yağ içerisinde fitol, isofitol ve neofitadien izomeri gibi diterpenler yüksek miktarda bulunmaktadır. Hekzadekanoik asit, pentakosan, tetradekanoik asit ve metil linolat bileşikler gibi doymuş yağ asitleri ve bunların esterleri ise yağın geri kalan kısmını oluşturmaktadır.

Lathyrus ochrus bitkisinin yapısındaki uçucu maddeler ise 7% hekzanal, 7,2% 2-metil bütanoik asit, 4,4% dodekanoik asit, 3,9% nonanoik asit, 3,6% oktanoik asit ve 3,6% benzaldehit olarak tespit edilmiştir. Bu maddeler dışında teşhis edilen diğer maddelerin relatif yüzde miktarları ise çok düşüktür.

Bitkiden elde edilen uçucu yağ ve yağsı maddeleri içeren ekstratlar (*n*-hekzan ve kloroform) DPPH radikali süpürücü etki testi ve antioksidan aktivite testleri yapılarak genel antioksidan özelliği açısından test edilmiştir. Uçucu yağın çalışılan konsantrasyonunda düşük aktiviteye rastlanmıştır. Ancak dilüsyonların hazırlanmasında kullanılan stok uçucu yağ çözeltisi 1%’lik yağ içerdiği dikkate alındığında elde edilen aktivite değeri pozitif kontrollere göre yüksek DPPH süpürücü ve PRAP aktivitesi gösterdiği görülmektedir. Bitkinin sahip olabileceği genel fitotoksik aktivite için *L. minor* bitkisi ile çalışılmıştır. *Lathyrus ochrus*

bitkisinin kloroform ekstresi kayda değer miktarda (50%) fitotoksik aktivite göstermiştir. Görülen bu aktivite bitki gelişiminin ölçütleri olan büyüme hızında azalma ve klorofil A ve klorofil B miktarlarında azalma olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca *Lathyrus ochrus*'un kloroform ve hekzan ekstraktlarının *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pyogenes*, *S. epidermidis* ve *Candida albicans* bakterilerine karşı aktif olduğu belirlenmiştir.

ABSTRACT

In Cyprus flora, nine *Lathyrus* species have been reported. These species are *L. ochrus* (L.) DC., *L. aphaca* L., *L. annuus* L., *L. cicera* L., *L. gorgonei* Parl., *L. sativus* L., *L. blepharicarpos* Boiss, *L. sphaericus* Retz and *L. saxatilis* (Vent.) Vis. In the present study, *Lathyrus ochrus* (Iuvana) was used. Previously, there are no studies reported related to the volatile secondary metabolites or the essential oil of *Lathyrus ochrus*. Essential oils and volatiles were investigated by simultaneous GC/GC-MS and SPME/GC-MS analyses, respectively. Additionally, HPTLC-DPPH, HPTLC-PRAP, MIC and *Lemna minor* phytotoxic activity tests were done on the extracts and essential oils. HPTLC-PRAP was used to determine the antioxidant activity as a new method.

Twenty components were detected in the *L. ochrus* aerial parts essential oil. The main components of *L. ochrus* were diterpenes (54,9%), monoterpenes (1%), sesquiterpenes (1,8%), fatty acids and their esters (33,8%). Phytol, isophytol and neophytadiene were present as the major compounds in *L. ochrus* essential oil. Volatile composition of *L. ochrus* were 7% hexanal, 7,2% 2-methyl butanoic acid, 4,4% dodecanoic acid, 3,9% nonanoic acid, 3,6% octanoic acid and 3,6% benzaldehyde. The rest of the molecules isolated have very low percentage.

DPPH scavenging activity of the dilutions of essential oil (1% oil:n-hexane) and extracts (n-hexane, chloroform) was determined. The essential oil afforded significantly low DPPH radical scavenging activity than the positive controls when the same concentration of the stock solutions was compared. However, the stock solution which was used to prepare the dilution solutions had 1% oil and showed higher DPPH scavenging activity and PRAP activity than the positive controls.

In order to investigate the phytotoxic activity of *L. ochrus*, *L. minor* was used and chloroform extract afforded high level of phytotoxic activity (50%). This activity is correlated with growth rate. It was observed that the amounts of chlorophyll A and chlorophyll B increased indicating an increase in growth rate. Additionally, chloroform and hexane extracts of *L. ochrus* showed activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pyogenes*, *S. epidermidis* and *Candida albicans*.

SİMGELER VE KISALTMALAR

GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi – Kütle Spektroskopisi
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu)
DPPH	1,1-difenil- 2 - pikril-hidrazil
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
MIC	Minimum İnhibasyon Konsantrasyonu
ODAP	β - N-oksalil-L- α,β -diaminopropiyonik asit
PDMS-DVB	Poli(dimetilsiloksan)-divinilbenzen
PRAP	Fosfomolibdenin İndirgenmesi ile Antioksidan Gücü
SPME	Katı Faz Mikro Ekstraksiyon

TABLÖLAR

Tablo 1.1. İzopren Sayısına Göre Terpenler

Tablo 1.2. Bazı Hemiterpenler ve Yapıları

Tablo 1.3. Bazı Monoterpenler ve Yapıları

Tablo 1.4. Bazı Seskiterpenler ve Yapıları

Tablo 1.5. Bazı Seskiterpen Laktonlar ve Yapıları

Tablo 1.6. Bazı Diterpenler ve Yapıları

Tablo 1.7. Bazı Triterpenler ve Yapıları

Tablo 2.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Tablo 2.2. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

Tablo 2.3. Elde Edilen Ekstrelerin Miktarları ve Verimleri

Tablo 3.1. *L. ochrus* Bitkisinin GC-MS ile Belirlenen Uçucu Yağ İçerikleri

Tablo 3.2. *L. ochrus* Bitkisinin GC-MS ile Tayin Edilen Uçucu Yağ İçeriğindeki Bileşikler ve Yapıları

Tablo 3.3. *L. ochrus* Bitkisinin SPME/GC-MS ile Belirlenen Uçucu Yağ İçerikleri

Tablo 3.4. *L. ochrus* Bitkisinin SPME/GC-MS ile Tayin Edilen Uçucu Yağ İçeriğindeki Bileşikler ve Yapıları

Tablo 3.5. *L. ochrus* Ekstrelerinin % DPPH Süpürücü Aktiviteleri

Tablo 3.6. *L. ochrus* Ekstrelerinin PRAP Aktiviteleri

Tablo 3.7. *L. ochrus* Uçucu Yağının PRAP Aktivite Testi Sonuçları

Tablo 3.8. *L. ochrus* Uçucu Yağının DPPH Aktivite Testi Sonuçları

Tablo 3.9. *L. ochrus* Ekstrelerinin (10 mg/mL) *L. minor* Üzerindeki Fitotoksik Aktivitesi

Tablo 3.10. *L. ochrus* Ekstrelerinin *L. minor* Bitkisindeki Klorofil A, Klorofil B ve Toplam Klorofil miktarları (µg) ile İlgili Sonuçlar

Tablo 3.11. *L. ochrus* Ekstrelerinin (10 mg/mL) Farklı Mikroorganizmalar Üzerindeki Antimikrobiyal Aktiviteleri

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. β - N-oksalil-L- α,β -diaminopropiyonik asit

Şekil 1.2. β -N-oksalamino-L-alanin

Şekil 1.3. (a) *Lathyrus ochrus* (L.) DC

(b) Güzelyurt bölgesinden toplanan bitki örneği

Şekil 1.4. *Lathyrus ochrus* (L.) DC'un çiçek yapısı

Şekil 1.5. Lavanta bitkisine ait yağ kesecikleri

Şekil 1.6. İzopren molekülü

Şekil 1.7. İzopren birimlerinin baş-kuyruk şeklinde kondenzasyonu

Şekil 1.8. Karyofilen ve α -Kadinen yapıları

Şekil 1.9. Bazı saponin iskeletleri

Şekil 1.10. Bazı streoller ve yapıları

Şekil 1.11. Bazı tetraterpenler ve yapıları

Şekil 1.12. Clevenger Apareyi

Şekil 1.13. Mikrodistilasyon düzeneği

Şekil 1.14. SPME iğnesi ve örneğin adsorplanması

Şekil 1.15. A ve B maddelerinden oluşan bir karışımın kromatografik olarak ayrılması ve çeşitli basamaklarda dedektör sinyali

Şekil 1.16. Gaz kromatografisinin şematik gösterimi

Şekil 1.17. İki bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram

Şekil.1.18. Üç ayrı ayırma gücünde ayrılma ($R_s = 2\Delta Z/(W_A+W_B)$)

Şekil 1.19. Alev iyonizasyon dedektörünün şematik gösterimi

Şekil 1.20. Gaz kromatografi/kütle spektrometrenin şematik gösterimi

Şekil 1.21. Bir jet ayırıcının şeması

Şekil 1.22. GC/MS kullanımına ait örnek

Şekil 1.23. HPLC enstrümantasyonu

Şekil 1.24. *Lathyrus rotundifolius*'un uçucu yağında bulunan maddeler

Şekil 1.25. *Lathyrus odoratus*'un yapısındaki uçucu maddeler

Şekil 1.26. *Lathyrus vernus*'un uçucu yağında bulunan maddeler

Şekil 2.1. *Lathyrus ochrus* (L.) DC.

Şekil 2.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) molekülü

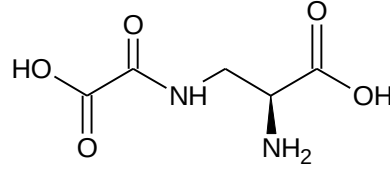
1. GİRİŞ

Lathyrus ochrus (L.) DC. cinsi, baklagiller Fabaceae (Leguminosea) familyasında sınıflandırılmaktadır (Viney, 1994). *Lathyrus* cinsinin sıklıkla rastlandığı bölgeler Akdeniz havzası, Ön Asya, Kuzey Amerika ve Güney Amerika'nın sıcak bölgeleri olarak belirtilmiştir (Jackson ve Yunus, 1984). Avrupa florasında 54 (Tutin, 1981), Türkiye florasında ise 18'i endemik olmak üzere 58 *Lathyrus* türünün varlığı tespit edilmiştir (Davis, 1970). Son yıllarda eklenen kayıtlarla Türkiye florasında 61 *Lathyrus* türü ve bu türlere ait 71 taksonun bulunduğunu bildirilmektedir (Uzun ve Genç, 2001). KKTC'de ise Kıbrıs flora kayıtlarındaki bilgiye dayanarak *Lathyrus* cinsine ait 9 tür bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla, *L. ochrus* (L.) DC. (luvana), *L. aphaca* L. (sarı mürdümük), *L. annuus* L., *L. cicera* L., *L. gorgonei* Parl., *L. sativus* L. (adi mürdümük) , *L. blepharicarpos* Boiss, *L. sphaericus* Retz, *L. saxatilis* (Vent.) Vis. türleridir. (Viney, 1994).

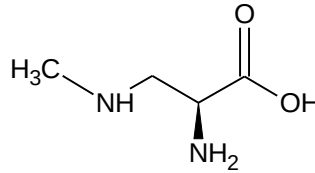
L. sativus (yaygın mürdümük), *L. cicera* (nohut mürdümüğü) ve *L. ochrus* (Kıbrıs mürdümüğü) *Lathyrus* cinsinin tarımda kullanılan en yaygın türleri olarak belirtilmektedir (Jackson ve Yunus, 1984). *L. sativus* türünün yetiştiği bir çok ülkede gıda olarak kullanımı yaygındır ancak KKTC'de gıda olarak kullanılmamaktadır. *L. cicera* ve *L. sativus* ise çoğunlukla hayvan yemi olarak yetiştirilmektedir. Bu amaçla *L. cicera* tane ve kaba yem, *L. sativus* ise genellikle kaba yem olarak kullanılmaktadır. Bu üç tür dışında dünyada *L. tingitanus*'un tane yem, *L. latifolius*, *L. sylvestris*, *L. clymenum*'un ise kaba yem amaçlı yetiştiriciliğinin yapıldığı da bildirilmektedir (Campell, 1997). Ayrıca *Lathyrus* cinsi içinde, *L. odoratus* gibi, süs bitkisi olarak yetiştirilen türler de bulunmaktadır (Campbell,1997). KKTC'de ise *L. ochrus* gıda maddesi olarak bolca tüketilmektedir. Halk arasında "luvana" yaygın adıyla bilinen bu tür taze haliyle salata malzemesi olarak kullanılmaktadır. Tohumu ise kuru baklagil halinde çorba yapımında kullanılmaktadır. *L. sativus* türü ise kış gelince hayvan yemi olarak kullanılmak üzere yetiştirilmektedir (Viney, 1994).

Lathyrus türlerinde diğer bir çok baklagil bitkisinde olduğu gibi sağlık üzerinde olumsuz etkileri olan bazı maddelerin bulunduğu bildirilmiştir (Urga ve ark., 1995). Bu maddelerden en önemlileri ODAP (β - N-oksasil-L- α , β -diaminopropiyonik asit) ve β -N-oksalamino-L-alanin'dir (Wang, ve ark., 2000).

Bu maddelerin yapı formülleri şekil 1.1 ve şekil 1.2’de görülmektedir.



Şekil 1.1. β - N-oksasil-L- α,β -diaminopropiyonik asit



Şekil 1.2. β -N-oksalamino-L-alanin

Lathyrus türlerinin fazla tüketimi sonucunda “*Lathyrism*” adı verilen hastalık ortaya çıkabilmektedir. *Lathyrism*’in “*Osteolathyrism*” ve “*Neurolathyrism*” şeklinde iki türü vardır. İskelet deformasyonlarına sebep olan *Osteolathyrism* *L. odoratus*, *L. hirsutus* ve *L. roseus* gibi türlerin tüketimiyle ortaya çıkmaktadır. *Neurolathyrism* ise çeşitli *Lathyrus* türlerinin tüketimiyle ortaya çıkarak kasların katılaşması ve felce sebep olan bir rahatsızlıktır (Hanbury, C.D. ve ark., 2000).

Kıbrıs adasının florasına bakıldığında Akdeniz, Ortadoğu, Kuzey Afrika, ve Batı Asya kökenli bitkilerin bulunduğu görülmektedir. Tüm bu coğrafi bölgelerin tam ortasında yer alan Kıbrıs adasının iklimi bu bölgelerde yetişen bazı türler için uygundur. Ancak bu bölgelerde ve Kıbrıs adasında bulunan aynı türler coğrafi bir engel olan Akdeniz sebebiyle birbirlerinden izole edilmiştir. Bu nedenle Kıbrıs adasına dışarıdan gelmiş ve burada nötralleşmiş türlerin veya Kıbrıs adasından dışarıdaki bölgelere yayılmış ve o bölgelerde nötralleşmiş olan türlerin bulundukları toprak, iklim ve ekolojik şartlara adapte olmayı başardıkları anlaşılmaktadır. Farklı koşullarda, farklı stres faktörlerine maruz kalan bitki çeşitlerinin sekonder metabolitlerinde farklılıklar görülebilmektedir. Üzerinde araştırma yapılacak

cinslerden olan *Lathyrus* cinsinin türleri Doğu Akdeniz, Akdeniz, Merkezi Avrupa, Güney Avrupa, Batı Asya, Ortadoğu, Kuzey Afrika, Tropik Afrika ve Kıbrıs adasında bulunabilmektedir. (Viney, 1994) Bu nedenle KKTC'de yetişen *Lathyrus* türlerinin içeriklerinin literatürde başka bölgelerde yetişen türlere göre sekonder metabolitlerinde farklılıklara sahip olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada incelenen *Lathyrus ochrus* (luvana) türünün içeriği ile KKTC'de veya başka bir ülkede daha önce yapılmış bir araştırma mevcut değildir. Yapılan çalışma kapsamında *L. ochrus* türünün uçucu sekonder metabolitlerinin belirlenmesi ve bu türün uçucu yağının, ekstrelerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada KKTC'de yetişen bu türün uçucu yağ ve uçucu sekonder metabolitlerin yapılarının tayin edilmesi için GC/GC-MS ve SPME/GC-MS yöntemleri, biyolojik aktivite testleri için HPTLC-DPPH, HPTLC-PRAP, MIC ve *Lemna minor* fitotoksik aktivite testleri yapılmıştır.

1.1. Fabaceae (Leguminosea) Familyası

Baklagiller yani Fabaceae (Leguminosea) familyası, 700'den fazla cins ve yaklaşık 19.000 tür içerir. Bitkiler aleminin üçüncü büyük familyasını oluşturmaktadır (Cronquist, A., 1968; Lewis, G. ve ark., 2005). Fabaceae familyası; *Phaseoleae*, *Vicieae*, *Cicereae*, *Aeschynomenae* ve *Gemistae* olmak üzere beş tribuse ayrılarak incelenmektedir (Summerfield, R.J. ve Roberts, E.H., 1985).

Fabaceae familyasındaki türlerin tohumları protein, lipit ve karbonhidrat bakımından zengin olduklarından önemli bir besin kaynağı olarak kullanılmaktadırlar (Sales, M.P. ve ark., 2000). Artan protein talebine karşılık yeni protein kaynakları aramak ve farklı bölgelerde yetişen yüksek kalitede besin içeriğine sahip bitkiler üretmek oldukça popüler konulardan biri haline gelmiştir. Baklagil tohumları protein değerlerinin yanında vitaminler, karotenoidler ve fenolik bileşikler gibi biyolojik yönden aktif olan diğer birçok madde gruplarını içermektedir (Rosa, M.J.S.ve ark., 2000; Duenas, M.ve ark., 2006). Yüksek besin değerlerinin yanı sıra baklagiller, *Rhizobium* familyasına ait bakterilerle simbiyotik ilişki kurarak biyolojik azotun üretilmesine katkıda bulunurlar. Yani iyi bir azot bağlayıcıdırlar ve tarımsal döngünün vazgeçilmez parçalarıdırlar (Cronquist, A., 1968).

Baklagiller, sahip oldukları kimyasal içerikleri nedeniyle de farklı bir öneme sahiptirler. Örneğin kandaki kolesterol miktarını azaltıcı etkilerinin yanısıra hipoglisemik etkilerinin de olduğu belirtilmektedir (Gepts, P. Ve ark., 2005). Bununla birlikte çeşitli baklagiller, lektin ve tripsin inhibitörleri gibi farklı sekonder metabolitleri üretirler (Gepts, P. Ve ark., 2005). Lektinlerin bağırsak tümörlerinin büyümesini azalttığı bildirilmiştir (Bardocz, S. Ve ark. 1995; Valentiner ve ark., 2003). Ayrıca baklagillerin, doymuş yağ asidi içeriği az olan besinlerle birlikte alınmasıyla lipid homeostazını kontrol ettiği ve kalp damar hastalıkları riskini azalttığı bildirilmiştir (Duranti, M., 2006).

1.2. *Lathyrus L.* Cinsi

1.2.1. *Lathyrus ochrus (L.) DC.* Türü

Lathyrus ochrus (L.), tek yıllık, 25-100 cm boyunda, tüysüz, tırmanıcı, otsu bir bitkidir. Gövde geniş kanatlıdır. Yapraklar dekurvent, tabanı genişçe kanatlı, stipulsuz ve tendrillidir. Üst gövde yapraklarındaki tendriller dallanmış ve yaprakçıklar 1-3 parçalı ve çoğunlukla petiol kanadı ile birleşmiş durumdadır. Pedinküller, bir çiçekli ve yapraklardan daha kısadır. Kaliks, dişlidir ve dişler düzensizdir. Korola, sarı sülfür renktedir. Legumen, tüysüz, dorsal dikiş belirgin kanatlıdır. Legumenlerdeki tohum sayısı 3-6 ve tohum yüzeyi düzdür. Bitkinin çiçeklenme zamanı Mayıs-Haziran aylarıdır. Akdeniz bölgesinde yaygındır (Davis, P.H. 1970, Yamamoto, K. ve ark., 1984).

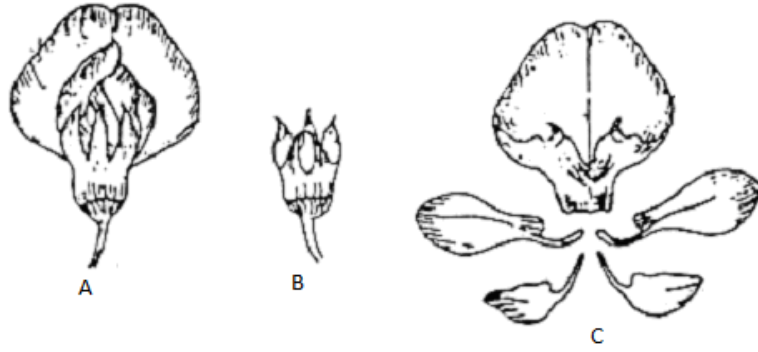


(a)



(b)

**Şekil 1.3. (a) *Lathyrus ochrus* (L.) DC (Viney, D.E.,1994)
(b) Güzelyurt bölgesinden toplanan bitki örneği**



Şekil 1.4. *Lathyrus ochrus* (L.) DC'un çiçek yapısı (A. Çiçek, B. Kaliks, C. Korola)(Davis, P.H., 1970, Yamamoto, K. ve ark., 1984)

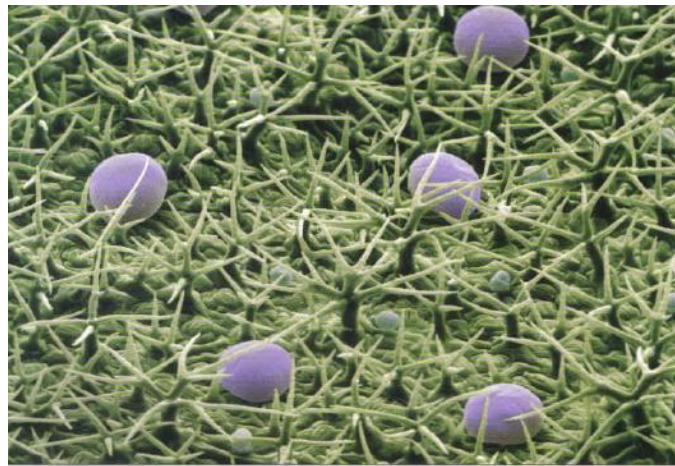
1.3 . Uçucu Yağlar ve Özellikleri

Esansiyel yağlar olarak da bilinen uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen özel kokulu, oda sıcaklığında sıvı, genellikle renksiz uçucu maddeler karışımlarıdır. Uçucu yağların kırılma indisleri yüksek olup çoğunluğu optikçe aktiftir. Uçucu yağların spesifik çevirmeleri üretimlerinde karakterizasyon ve kalite kontrol konusunda kullanılmaktadır. Bir uçucu yağın kırılma indisinde ve

polarize ışığı çevirme derecesinde oluşan değişimler uçucu yağın içeriğinin değiştiğini gösterebilmektedir. Ancak uçucu yağların kalitelerinin belirlenmesinde gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) yöntemi ana karakterizasyon yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Tüm apolar çözücülerde (petrol eteri, kloroform, benzen, eter vs.) iyi çözünürler. Buna karşın suda çözünmezler ya da çok az çözünürler (Demirçakmak, 1994; Tanker ve Tanker, 1985). Uçucu yağlar bileşimlerinde çok değişik madde gruplarını içerebilmektedirler. Monoterpen, seskiterpen, diterpen, aromatik maddeler, siklik hidrokarbonlar, kısa zincirli yağ asitleri ve onların esterleri gibi maddeleri içerebilirler. Uçucu yağın yapısındaki bazı maddeler, uçucu yağ elde edilirken sıcaklık ve su etkisiyle ortamda bozunup elde edilmiş maddelerdir. Uçucu yağların bileşimlerinde bulunan bazı maddeler ışığa ve oksitlenmeye karşı oldukça hassas olabilmektedir. Bu nedenle uçucu yağlar amber renkteki şişelerde soğuk bir ortamda eğer mümkünse inert atmosferde saklanılmalıdır.

Uçucu yağlar bitkilerin çiçek, yaprak, meyve, kabuk, odun ve kök kısımlarından elde edilen kompleks karışımlardır (Grassmann, J. ve Elstner, E.F., 2003). Bu yağlar, bitkilerin familyalarına göre, salgı tüyünde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında veya salgı hücrelerinde bulunmaktadır (Svoboda, P., K., Svoboda, T, G.,2000). Şekil 1.5'te de lavanta bitkisindeki yağ keseciklerine ait mikroskopik görüntü görülmektedir.



Şekil 1.5. Lavanta bitkisine ait yağ kesecikleri (Svoboda, P., K., Svoboda, T., G., 2000).

Su ile karışmadıkları için sabit yağ olarak tanımlansalar da yağlardan farklıdır (Grassmann, J. ve Elstner, E.F., 2003). Uçucu yağlar bitkilerden; miktarlarına, ısıya dayanıklılıklarına ve bileşenlerin özelliklerine bağlı olarak değişik şekillerde elde edilebilirler. Uçucu yağlar, yağı taşıyan bitki kısımlarından, distilasyon yolu ile elde edilirler. Uçucu sekonder metabolitlerin eldesi için uygulanan yöntem, bitkinin ısıya dayanıklılığına, maddelerin uçuculuk özelliklerine, suda çözünüp çözünmemesine ve distilasyon koşullarıyla bağlantılıdır. Uçucu sekonder metabolitlerin eldesinde uygulanan yöntemler başlıca üç ana grupta toplanabilir.

Bunlar; distilasyon, ekstraksiyon ve presleme'dir. Uçucu yağ eldesinde kullanılan yöntemler; su distilasyonu, buhar distilasyonu, su-buhar distilasyonu, kuru distilasyon ve hidrodifüzyondur. Bitkisel droglarda volumetrik olarak uçucu yağ tayini, su distilasyonu ile cleverger adı verilen özel bir aparey ile yapılır. Bu apareyin sudan ağır ve hafif uçucu yağlar için iki tipi vardır. Drog, işlemde geçirilerek (parçalanarak, dövülerek) ve tartım alınarak balona konulur. Drog/su oran: 1:10 olacak şekilde su ilave edilir. Uçucu yağın toplanacağı dereceli bölüme su ilave edilir. Yağın sudan tam olarak ayrılıp ayrılmadığı gözlenemiyor, ya da numune çok az uçucu yağ içeriyorsa deneye başlamadan önce dereceli kısma 1 ml ksilen veya hekzan ilave edilir, bu çözücünün miktarındaki artış, uçucu yağ miktarını verecektir.

Distilasyon süresi genellikle 3 saattir. Distilasyon işlemi bittiği zaman dereceli kısımda toplanan yağ miktarı okunur. Uçucu yağ miktarı 100 g drog için mL olarak hesaplanır. Bitkinin ne kadar su içerdiğinin bilinmesi de kuru drog üzerinden uçucu yağ veriminin hesaplanması için önemlidir. 100 g drogun içerdiği su miktarı bulunduğundan sonra kuru drog miktarı bulunarak elde edilmiş olan yağ miktarına göre kuru drog üzerinden uçucu yağ verimi hesaplanır.

Uçucu yağların yapılarında bulunan bileşiklerin çoğu terpenoitler, çoğunlukla monoterpenler ve seskiterpenlerdir. Bunun yanı sıra diterpenleri, düşük molekül ağırlıklı alifatik hidrokarbonları, asitleri, alkoller, aldehytleri, asiklik esterleri veya laktonları, istisna olarak azot ve sülfür içeren bileşikler, kumarinler ve fenilpropanoidlerin homologlarını da içerirler (Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000, Grassmann, J. ve Elstner, E.F., 2003, Özgüven, M. ve Kırıcı, S., 1999). Uçucu yağların bileşim ve miktarları; bitkinin cinsine, bitkinin hangi kısmından elde

edildiğine, üretim şekline, iklime ve yetiştirildiği bölgenin coğrafik yapısına bağlı olarak değişmektedir (Özgüven, M. ve Kırıcı, S., 1999, Baydar, H., 2005, Çelik, E. ve Çelik, G.Y., 2007). Uçucu yağları çok içeren bitki familyaları *Apiaceae* (Maydonozgiller), *Asteraceae* (Papatyagiller), *Brassicaceae* (Turpgiller), *Chenopodiaceae* (Sirkengiller), *Compositaceae* (Bilesikgiller), *Cupressaceae* (Servigiller), *İridaceae* (Süsengiller), *Lamiaceae* (Ballıbabagiller), *Lauraceae* (Defnegiller), *Myrtaceae* (Mersingiller), *Pineaceae* (Çamgiller), *Poaceae* (Bugdaygiller), *Rosaceae* (Gülgiller), *Rutaceae* (Sedefotugiller), *Zingiberaceae* (Zencefilgiller) olarak sayılabilir (Grassmann, J. ve Elstner, E.F., 2003 , İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürküoğlu, M., Baser, K.H.C., Kıvanç, M., 2002). Uçucu yağların spazm çözücü, antiseptik ve antimikrobiyal özellikleri yanında irrite edici özellik de gösterebilmektedir. Gıdaları bozan, gıda zehirlenmelerine neden olan mikroorganizmalara, bozucu ve mikotoksin üreten küflere, patojenik ve dimorfik mayalara, hayvan ve bitki virüslerine karşı uçucu yağların etkileri konusunda pek çok araştırma bulunmaktadır. Bazı baharatlar ve bitkilerden elde edilen uçucu yağlar, sahip oldukları antimikrobiyal aktiviteden dolayı gıda sanayinde kullanılan doğal olmayan koruyucu maddelere alternatif olabilirler. Bu bileşiklerin gıda katkıları gibi kullanılmalarında, gıda zehirlenmelerine neden olan patojenlerin gelişmesini önlemede ya da gıda bozulmalarını geciktirmede önemli payları vardır (Uçan, F., 2008). Uçucu yağların bazıları antibiyotik ve antiseptik özellik gösterir. En antiseptik yağlar, geyik otu, tarçın, kekik, karanfil, lavanta ve okaliptüs yağlarıdır (Grassmann, J. ve Elstner, E.F., 2003).

1.3.1. Uçucu Yağların Kimyasal Bileşimi

Çoğu uçucu yağlar çok sayıda bileşiğin karışımından oluşurlar. Bu yüzden kimyasal bileşimleri oldukça karmaşıktır. Uçucu yağların yapısında hidrokarbonlar ve hidrokarbonların oksijenli türevleri bulunabildiği gibi, çok ender azot ve sülfür içeren maddeler de olabilir. Uçucu yağlarda terpenler, aromatik ve hidrokarbon yapıda alkoller, aldehitler, esterler ve fenoller bulunabilmektedir. (Linskens ve Jackson, 1997).

Uçucu yağlarda bulunan maddelerin çoğunluğu terpen kökenlidir. Terpenoitler izopren türevleri olup, uçucu yağlarda mono, seski, diterpenler ve

bunların oksijenli türevlerine rastlanır. Daha yüksek moleküllü olanlara reçine, lateks vb. formlarda çeşitli bitkilerde rastlanmaktadır. Uçucu yağlar glikozit halinde veya reçinelerle (oleorezin) ve zamlarla (oleogummirezin) birlikte bulunabilirler (Başer ve ark., 2005; Başer, 2006; Guenther, 1948).

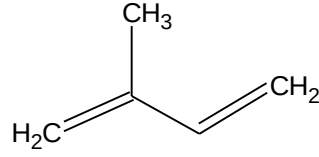
1.3.2. Terpenler

Kimyasal anlamda terpenler, yapısında izopren birimlerine sahip olan bir madde grubu olarak tanımlanır. İçerdikleri izopren birimi sayısına göre; hemiterpen, monoterpen, seskiterpen, diterpen, sesterpen, triterpenler, tetraterpen ve politerpen olarak sekiz grup altında toplanırlar. Tablo 1.1’de izopren sayısına göre terpenler sınıflandırılmıştır.

Tablo 1.1. İzopren sayısına göre terpenler

İzopren sayısı	Sınıfı	Karbon sayısı
1	Hemiterpenler	C ₅
2	Monoterpenler	C ₁₀
3	Seskiterpenler	C ₁₅
4	Diterpenler	C ₂₀
5	Sesterpenler	C ₂₅
6	Triterpenler	C ₃₀
3-6	Steroidler	C ₁₈ - C ₃₀
8	Tetraterpenler (karotenoidler)	C ₄₀
N	Politerpenler	C _n

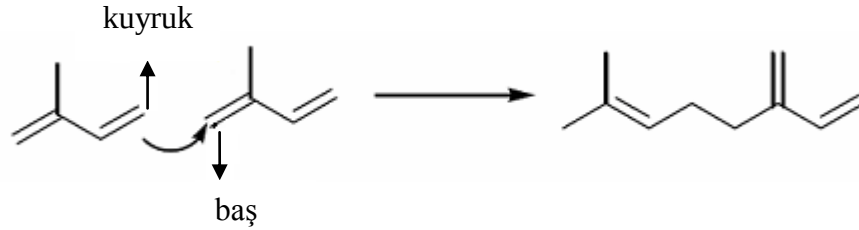
Hemen hemen tüm terpenlerin termal bozunması sonucunda izopren molekülü oluşur. İzopren molekülü şekil 1.6’da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. İzopren molekülü

Bu durum, bütün terpenlerin iskelet yapısının 5 karbonlu izopren (2-metil-1,3-bütadien) biriminden oluştuğu fikrini vermektedir. Bu izopren kuralı veya C5 kuralı olarak bilinir. Bu kural ilk Leopold Ruzicka tarafından öne sürülmüştür. Bu kuralın oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanırsa da, sabit bir kural olarak değil de bir prensip olarak gösterilebilir. Terpenler genellikle izopren gruplarının baş-kuyruk (regular terpenler) bağlanması şeklinde oluşmaktadırlar ancak bazı istisnai durumlarda baş-baş, kuyruk-kuyruk bağlantıları (irregular monoterpenler) gözlemlenebilmektedir. Örneğin; karotenler merkezlerinden kuyruk kuyruğa bağlanır, ayrıca bazı terpenlerin içerdikleri karbon sayısı beşin katı değildir ve karbon sayısı beşin katı olup da izopren moleküllerine bölünemeyen terpenler vardır (Finar, 1975).

2-Metil-1,3-bütadienin izopropil kısmı *baş* kısmı ve kalan etil kısmı ise *kuyruk* kısmı olarak tanımlanır.

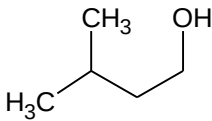
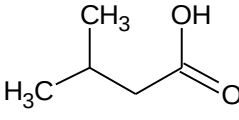
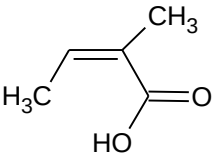
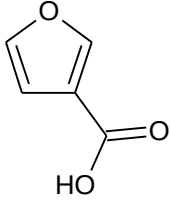


Şekil 1.7. İzopren birimlerinin baş-kuyruk şeklinde kondenzasyonu (Dewick, P.M., 2001)

1.3.2.1. Hemiterpenler (C₅)

Hemiterpenler 5 karbonlu izopentan iskeletine sahip bileşiklerdir. Bunlar izoamil alkol, izovaletaldehit, tiglik asit, senesioik asit, anjelik asit ve β –furoik asit sayılabilir. Bitkilerden ve ağaçlardan elde edilir (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005).

Tablo 1.2. Bazı hemiterpenler ve yapıları

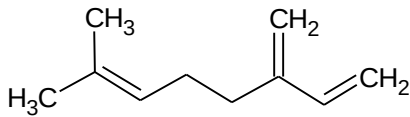
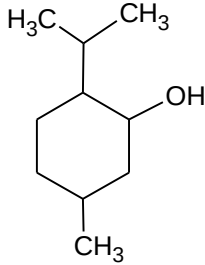
Bazı hemiterpenler ve yapıları	 İzoamilalkol  İzovalerik asit  Anjelik asit  β –furoik asit
---------------------------------------	---

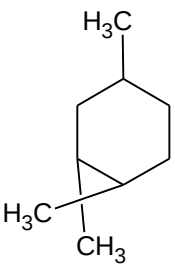
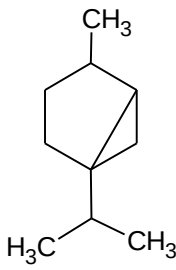
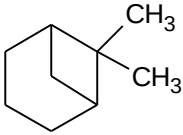
1.3.2.2. Monoterpenler (C₁₀)

Monoterpenler 10 karbon içermektedirler ve iki izopren birimine sahip bileşiklerdir. Bitkilerden genellikle distilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağların karakteristik kokusunu veren bileşiklerdir. Monoterpenler yapılarındaki halka sayısına göre asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik olabilirler. Ayrıca oluştukları izopren gruplarının bağlanma şekline göre regular ve irregular yapıda olabilirler. Asiklik terpenler açık yapıya sahiptir. Monosiklik terpenler bir adet, bisiklik terpenler iki adet ve trisiklik terpenler yapılarında üç adet halka içerirler (Hamdard, J., 2007).

Monoterpenler birçok uçucu yağın ana bileşenidir. Tatlandırıcı ve parfüm hammaddesi olarak endüstriyel öneme sahiptirler. Mirsen, geraniol, mentol, karvon, lavandulol monoterpenlere örnek verilebilir (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005). Aşağıdaki örneklere bakılarak mirsen ve geraniolün açık yapıları olduğu için asiklik monoterpen olduğu ve mentol ve karvonun ise tek bir halka içerdiği için monosiklik monoterpen olduğu söylenebilir.

Tablo 1.3. Bazı monoterpenler ve yapıları

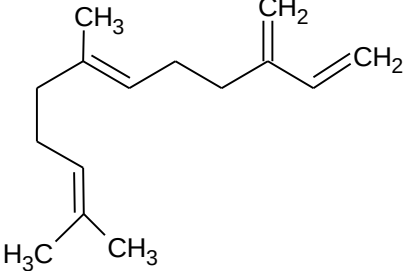
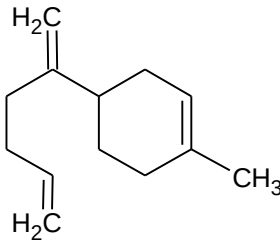
Asiklik monoterpen	 mirsen
Monosiklik monoterpen	 mentol

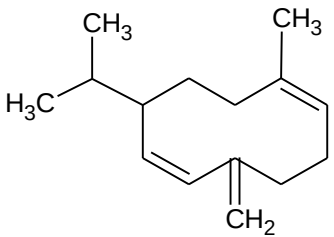
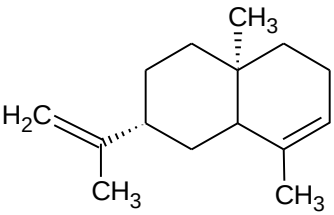
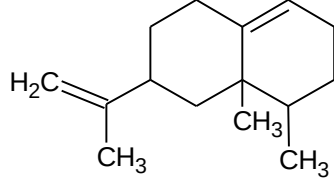
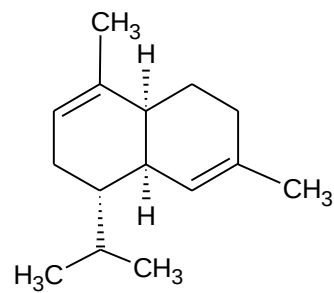
Bisiklik monoterpen ve trisiklik monoterpenler	 karan  tujan  pinan
--	--

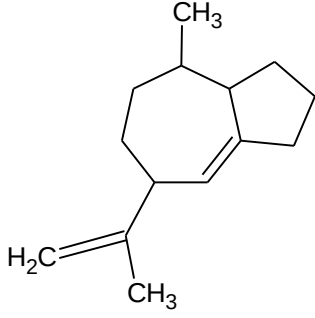
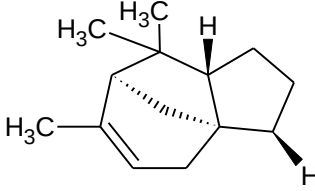
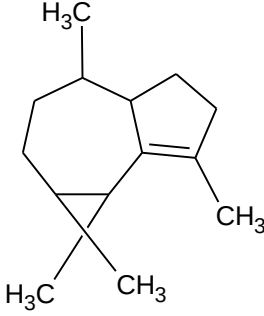
1.3.2.3. Seskiterpenler (C₁₅)

Seskiterpenler onbeş karbon atomu içerirler ve üç izopren biriminden türemişlerdir. Yapısal olarak halka sayılarına göre asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik yapıda olabilirler. Seskiterpenler, monoterpenler gibi uçucu yağa karakteristik koku ve tat özellikleri verebilirler. Monoterpenlere göre buharlaşma noktaları daha yüksektir. Çeşitli yapısal grupları vardır. Bunlar; ödesmanlar, gayonanlar ve germakrenlerdir.

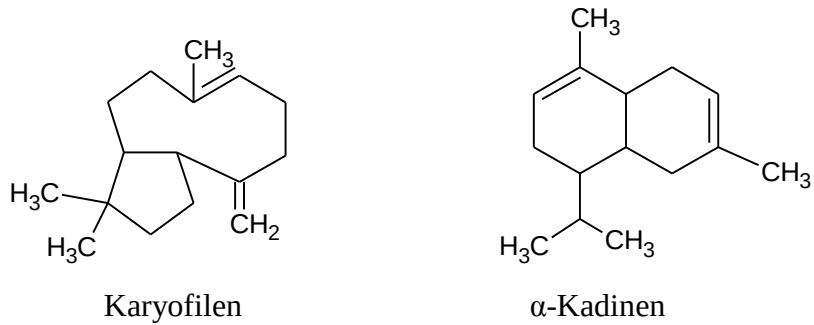
Tablo 1.4. Bazı seskiterpenler ve yapıları

Asiklik seskiterpen	 (E)-β-Farnesen
Monosiklik seskiterpen	 (E)-β-Bisabolen (Bisabolen iskeleti)

	 Germakren D (Germakren iskeleti)
Bisiklik seskiterpenler	 α-Selinene (Eudesman iskeleti)
	 Valensene (Eremophilan iskeleti)
	 α-Muurenen (Kadinen iskeleti)

	 γ-Gurjunen (Guain iskeleti)
Trisiklik seskiterpenler	 α-Sedren (Sedran iskeleti)  α-Gurjinen (Aromadendren iskeleti)

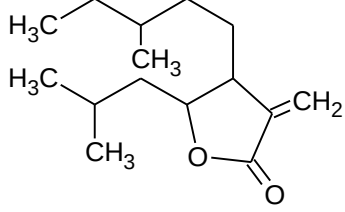
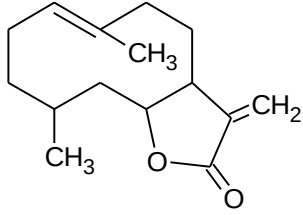
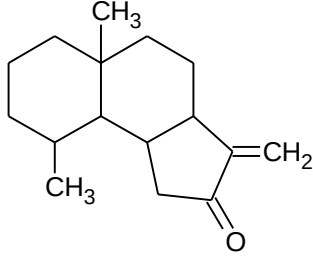
Karanfil yağının temel bileşenlerinden biri olan karyofilen ile ardıç ve sedir ağaçlarından elde edilen kadinenler de çok bilinen seskiterpenlerdir (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005).



Şekil 1.8. Karyofilen ve α -Kadinen yapıları

Seskiterpenler yapılarında hidroksil, ester, keton, karboksilli asit ve epoksit gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahip olabilirler. Seskiterpenler yapılarında lakton halkası bulundurabilirler ve bu tür yapılara seskiterpen lakton denir (Fischer, N., H., 1979)

Tablo 1.5. Bazı seskiterpen laktonlar ve yapıları

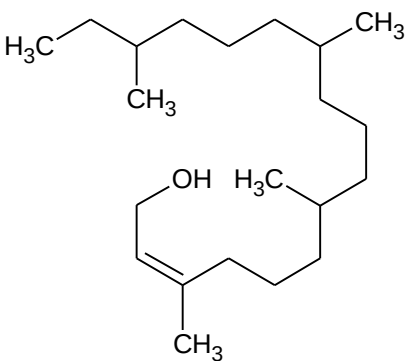
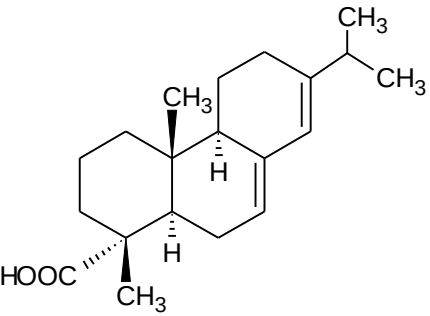
Monosiklik seskiterpen lakton	 seko-germakranolid
Bisiklik seskiterpen lakton	 germakranolid
Trisiklik seskiterpen lakton	 ödesmanolid

1.3.2.4. Diterpenler (C₂₀)

Diterpenler, 4 izopren grubundan oluşan terpenlerdir. Yüksek kaynama noktalarına sahip olmaları nedeniyle bu maddelere uçucu yağlar içerisinde seyrek olarak rastlanılmaktadır. Bu bileşikler bitki ekstresinin distilasyonundan sonra kalan maddelerdir (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005).

Bazı önemli diterpen örnekleri Tablo 1.6’da gösterilmiştir.

Tablo 1.6. Bazı diterpenler ve yapıları

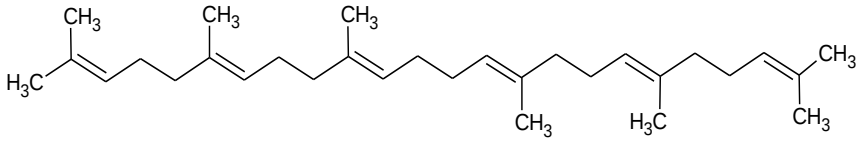
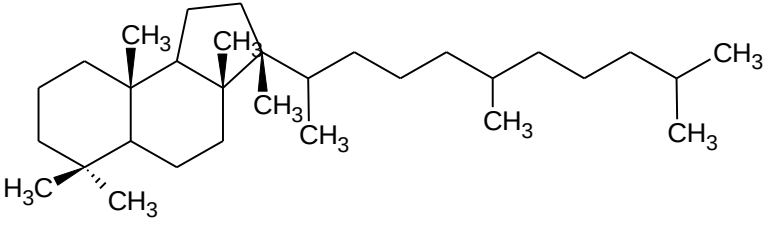
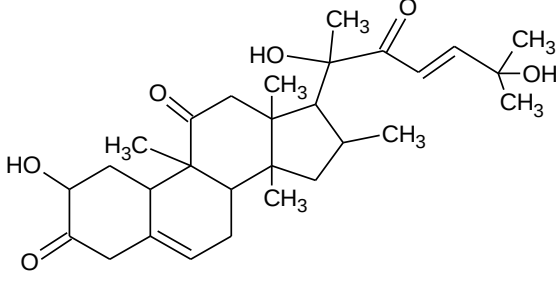
Asiklik diterpen	 Fitol
Trisiklik diterpen	 Abietik asit

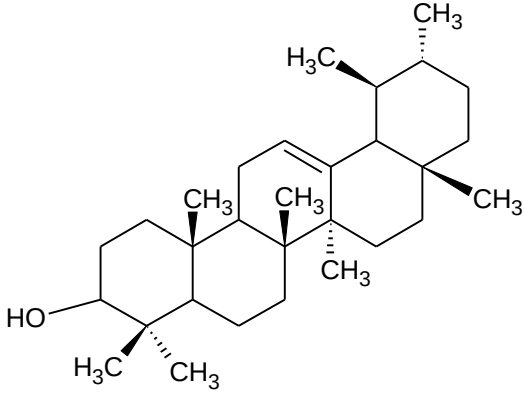
1.3.2.5. Triterpenler (C₃₀)

C₃₀ terpenleri 6 izopren biriminden oluşur. Biyosentetik olarak iki asiklik seskiterpenin kondenzasyonu ve elde edilen asiklik triterpen yapı üzerinde halka oluşumu reaksiyonlarının gerçekleşmesi ile oluşurlar. Triterpenlerin prekürsörü olan skualen iki adet farnesil pirofosfat molekülünün birbirlerine kuyruk-kuyruk konfügirasyonu ile bağlanması ile oluşur. Triterpenler glikozitleri olarak (saponin) veya aglikon olarak (streol, triterpen) bulunurlar. Genellikle yapraklarda ve bazı meyvelerde mumsu tabakalar içinde bulunurlar. Diğer triterpenler limoninler ve kukurbitasinleri içerir (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005). Bazı önemli triterpenler Tablo 1.7’de gösterilmiştir.

Saponinler ile ilgili açıklamalar ve örnek yapı (A) kısmında, streoller ile ilgili açıklama ve örnek yapı (B) kısmında verilmiştir.

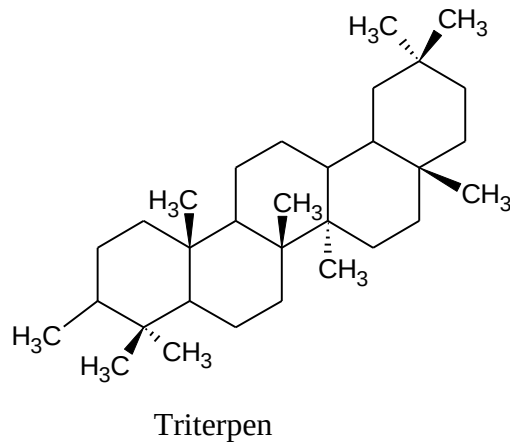
Tablo 1.7. Bazı triterpenler ve yapıları

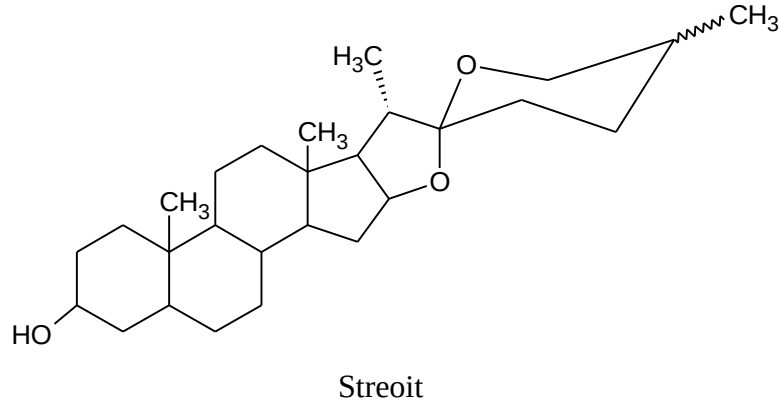
Monosiklik triterpen	 skualen
Trisiklik triterpen	 malabarican
Tetrasiklik triterpen	 Kukurbitasin

Pentasiklik triterpen	 α-Amirin
---	--

A) Saponinler

Saponinler yüksek molekül ağırlığına sahip triterpen glikozitleridir. İçerdikleri şeker grubu ya bir sterole ya da diğer bir triterpene bağlıdır. Bunlar bitkilerde yaygındır ve iki kısımdan oluşurlar. Glikoz (şeker) ve aglikon (triterpen). Aglikonlar ya da bazen geninler olarak adlandırılan grup, triterpen, steroid veya steroidal alkaloid sınıfından olabilirler (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005). Bazı saponin örnek iskeletleri şekil 1.9’da gösterilmiştir.

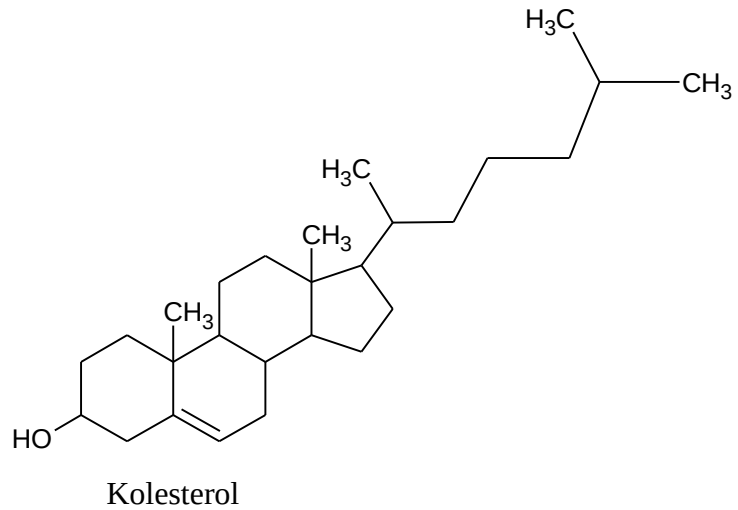


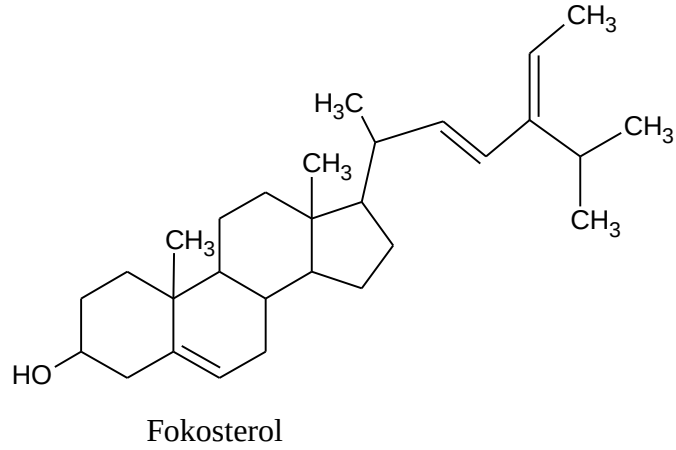
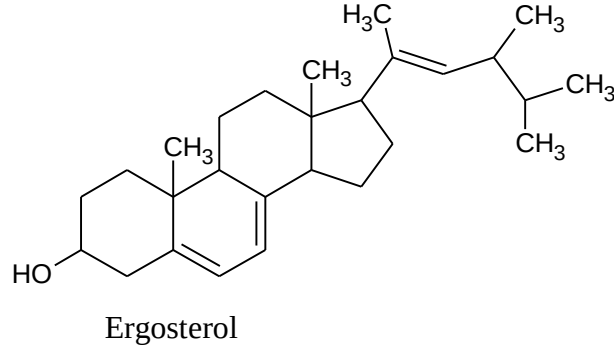


Şekil 1.9. Bazı saponin iskeletleri

B) Streoller

Genel steroid yapılar Şekil 1.10’da gösterilmiştir. Temelde bütün bitkisel steroidler C-3 konumunda hidroksil taşımakta ve bunlar sterol olarak bilinen bileşiklere karşılık gelmektedir. Hayvanlar aleminde steroidler hormon, koenzim ve provitamin olarak büyük öneme sahiptir (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005). Streoller ve steroidler triterpenlerin degradasyonu sonucu elde edilirler.

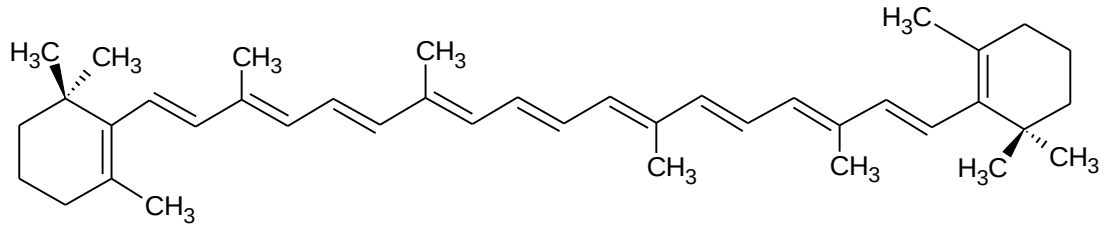




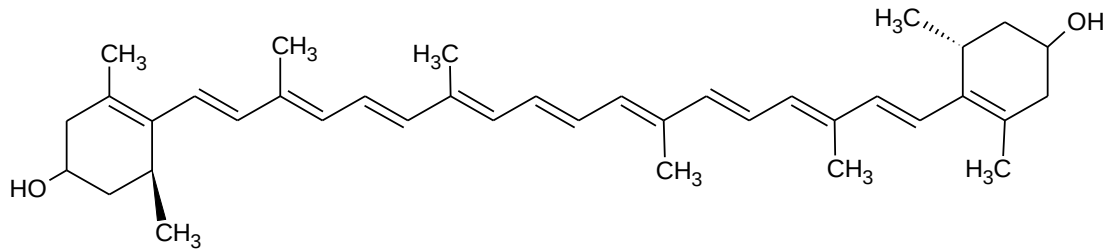
Şekil 1.10. Bazı steroller ve yapıları

1.3.2.6.Tetraterpenler (C₄₀)

Tetraterpenler yapılarında 8 izopren grubu bulundurmaktadır. Biyosentetik olarak iki asiklik diterpenin kondenzasyonu ile oluşurlar. En yaygın tetraterpenoitler karotenoitlerdir. Bitkilerde karotenoitler, fotosentezde gerekli pigment olarak, çiçeklerde ve meyvelerde renk ajanı olarak görev yaparlar. Ayrıca, bitkiyi klorofil gibi diğer ışık absorplayan pigmentlerin neden olduğu aşırı oksidasyona karşı koruduğuna inanılmaktadır. Yapısında β -karoten kısmı içeren karotenoitler, insan intestinal mukozasında retinole (vitamin A) dönüşür. Bu olay bazı meyve ve sebzelerin (havuç, ıspanak, mango, domates) önemini artırır (Kumar, B., Chobra, K.H., 2005). Bazı önemli tetraterpenler şekil 1.11’de gösterilmiştir.



β -karoten



Lutein

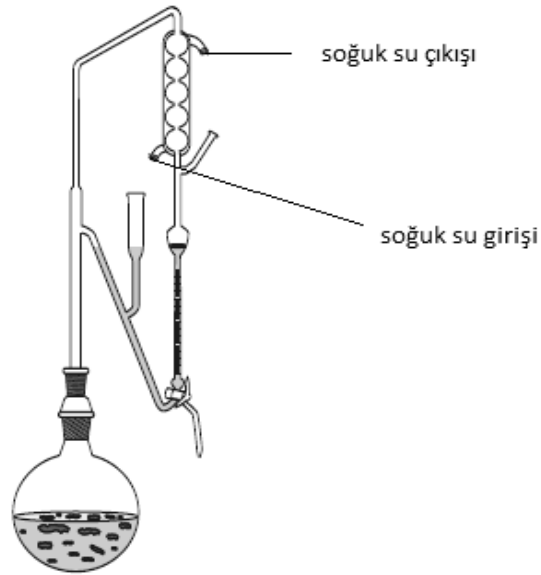
Şekil 1.11. Bazı tetraterpenler ve yapıları

1.4. Uçucu Yağ ve Uçucu Sekonder Metabolitleri Elde Etmede Kullanılan Yöntemler

1.4.1. Hidrodistilasyon (Su Distilasyonu)

Uçucu bileşiklerin eldesinde yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Hidrodistilasyon, kaynatıldığında bozulmayan taze ve kuru bitkisel materyale uygulanabilir. Yöntemde Clevenger düzeneği olarak adlandırılan ve yapısında kondenser ve reflaks akımı sağlayan cam düzeneği ve bir cam balon kullanılmaktadır. Cam balon içerisinde bulunan su ve bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılmaktadır. Sıcaklık ile bitkinin yapısında bulunan yağ keseleri içerisindeki

yağ genişterek bu keseleri patlatır ve su buharı ile birlikte hareket eder ve kondenserde su ile birlikte yoğunlaşır. Yağ ve su birbirleri ile faz oluşturur. Su distilasyonunda bitkisel materyal her zaman su ile doğrudan temas halindedir (Tanker,1985; Thapa, 1989; Wijesekera, 1993). Küçük ölçekli üretimlerde Şekil 1.12’te görülen Clevenger tipi bir aparatla yapılan distilasyon işlemi, endüstriyel uygulamalarda büyük distilasyon kazanlarında (imbik) gerçekleştirilmektedir. Elde edilen uçucu yağ miktarı elde edilen yağ miktarı/toplam bitki ağırlığı v/w olarak ifade edilir (Jackson, 1997).



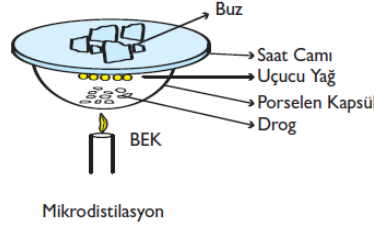
Şekil 1.12. Clevenger Apareyi

1.4.2. Buhar Distilasyonu

Buhar distilasyonu yönteminde cam kap içerisine yerleştirilen taze bitki materyaline basınç yardımıyla uygulanan buhar, yağ damlacıklarını da beraberinde sürükleyerek toplama kabına getirmekte ve yağ burada yoğunlaştırılarak sudan ayrıştırılmaktadır (Linskens ve Jackson, 1997).

1.4.3. Mikro Distilasyon

Uçucu bileşik içeren bitkilerin kalite kontrolünde kullanılabilecek hızlı bir yöntemdir. Bir porselen kapsül içine az miktar bitki örneği konur ve üstüne bir saat camı kapatılır. Saat camının üstüne de birkaç parça buz eklenir. Hafif ateşte ısıtılarak uçucu bileşiklerin buhar fazına geçmesi sağlanır. Bu buharlar saat camının soğuk alt yüzeyine çarpınca yoğunlaşarak damlacıklar halinde toplanırlar.

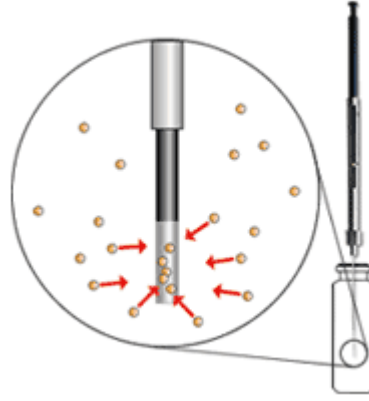


Şekil 1.13. Mikrodistilasyon düzeneği

1.4.4. Katı-Faz Mikroekstraksiyon (Solid Phase Microextraction-SPME)

Katı-faz mikroekstraksiyon (SPME) yöntemi, bitkilerde bulunan uçucu maddelerin analizinde örnek hazırlama aşamasında kullanılabilmektedir. SPME, örnek hazırlama, ekstraksiyon ve yoğunlaştırma aşamalarını çözücü içermeyen tek bir aşamada birleştirmektedir. Bu yöntemle işlem süresi ve maliyeti açısından önemli kazançlar sağlanırken, teşhiste de iyileşmeler görülmüştür. SPME, GC veya GC-MS ile birlikte özellikle çevre, biyoloji ve gıda örneklerindeki uçucu ve yarı uçucu organik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır (Vas ve Vekey, 2004).

SPME, modifiye edilmiş bir şırıngaya benzemektedir. İç kısmında bir adsorban tutucu ve adsorban kaplanmış bir yüzey bulunmaktadır. Adsorban kaplı yüzey, 1-2 cm uzunluğunda silindirik bir kılıf dışına ve içine, ileri geri hareket edebilen silindirik bir yüzeydir. SPME adsorbanı, ince polimer film ile kaplanmış eritilmiş silikadır. SPME uygulaması gaz (headspace) ya da çözelti halindeki örneğe uygulanabilmektedir. Her iki durumda da SPME iğnesi kapalı ortama sokulur, adsorbanı koruyan kısım geri çekilir ve adsorbanın ortamla temas etmesi sağlanır. Adsorbanı oluşturan polimer yüzey örneği adsorbe eder. Sonra adsorban örneklemin etkilenmemesi için metal iğnenin içerisine geri çekilir. Bir sonraki aşama adsorban üzerindeki analitin GC veya GC-MS'e termal desorpsiyon ile aktarılarak analiz edilmesi sağlanmaktadır (Arthur ve Pawliszyn,1990).



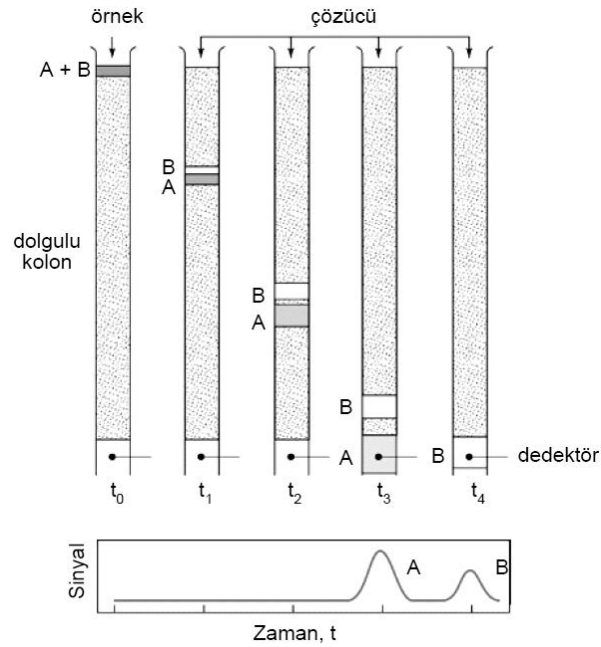
Şekil 1.14. SPME iğnesi ve örneğin adsorblanması

SPME yönteminin etkinliğini etkileyen en önemli faktör adsorbanı oluşturan materyalin tipi ve kalınlığıdır. Poli(dimetilsiloksan)-divinilbenzen (PDMS-DVB) tipi lifler terpenler gibi önemli uçucu bileşiklerin tutulmasında kullanılmaktadır. Diğer faktörler ise sırasıyla ekstraksiyon işlemi, desorpsiyonun optimizasyonu, türev hazırlama ve nicelik yönünden incelenmesidir. Basit, düşük maliyetli, temiz ve konsantre ekstre eldesi ile kütle spektrometre uygulamaları için ideal bir yöntemdir (Araujo ve ark., 2007). Ayrıca SPME metodu kullanılarak uçucu olan bitki sekonder metabolitleri ve buna benzer doğal materyalden (böcek, mikroorganizma vb.) uçucu metabolitleri inceleyebilmek mümkündür.

1.5. Kromatografi

Kromatografi kompleks karışımlarda bulunan birbirine benzer yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan birçok yöntemi içerir. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya bir süperkritik akışkandan ibaret olan bir hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içerisinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz numune bileşenlerinin hareketli ve sabit fazlarda farklı oranlarda ilgi (affinite) gösterebileceği şekilde seçilir. Eğer analitlerin ilgisi sabit faza karşı ise sabit faz tarafından alıkonulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık numune bileşenleri sabit faza karşı zayıf ilgi gösterdiklerinde bileşenler hareketli fazda daha fazla bulunacaklarından hızlı hareket

ederler. Farklı moleküllerin sabit ve hareketli faza karşı farklı oranda ilgi göstermelerinden dolayı kromatografik sistemde farklı hızla ilerlemektedirler. Kromatografik ayırma sisteminin çıkışında bir dedektör kullanılması ile zamana karşı sinyal şiddetini gösteren “kromatogram” adı verilen çıktı elde edilir. Bu ayırma işlemi kullanılarak örnek içerisinde bulunan analitlerin kalitatif ve/veya kantitatif olarak analizlerinin elde edilen kromatogramlar üzerinden yapılması mümkün olmaktadır. Kromatografik ayırma sonucu maddeler farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar. Şekil 1.15’de kolon elüsyon kromatografisi ile A ve B maddelerinden oluşan bir karışımın ayrılması gösterilmektedir (Skoog D.A. ve ark., 1998).



Şekil 1.15. A ve B maddelerinden oluşan bir karışımın kromatografik olarak ayrılması ve her basamak için dedektör sinyali

Kromatografi, hareketli fazın tipine göre, sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkan kromatografisi şeklinde sınıflandırılabilir. Bu üç teknikte hareketli faz sırasıyla sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır (Skoog D.A. ve ark., 1998).

Kromatografik yöntemlerde sabit ve hareketli faz ile numune arasındaki etkileşimlere bağlı olarak çeşitli ayırma mekanizmaları kullanılabilir. Bu mekanizmalara dayanarak kromatografi, adsorpsiyon, dağılma, iyon değişirme,

moleküler eleme ve afinite kromatografisi şeklinde sınıflandırılır (Sewell, P.A. ve ark., 1987).

1.5.1. Kromatografi Türleri

1.5.1.1. Adsorpsiyon kromatografisi

Sıvı/gaz - katı kromatografisidir. Ayırım, sıvı veya gaz hareketli faz ve ayrılacak molekülleri geri dönüşümlü olarak adsorplayan katı sabit faz arasında gerçekleşir. Ayrılacak madde molekülleri ilgilerine göre hareketli fazdaki çözücünde bulunarak veya sabit faz üzerine adsorbe olarak ayrılırlar.

1.5.1.2. Dağılma (partisyon) kromatografisi

Sıvı-sıvı kromatografisidir. Birbirleriyle karışmayan iki sıvı faz arasında maddelerin dağılması temeline dayanmaktadır. Ayrılacak maddeler, sabit faz ve hareketli arasında dağılma katsayılarına bağlı olarak dağılırlar, bu dağılım farklı oranda göçe neden olur ve ayırım gerçekleşir. Partisyon kromatografisinde sabit faz sıvıdır. Sıvı sabit faz bir katı taşıyıcı faz üzerinde adsorbe edilir ve hareketli faz bu sabit faz içerisinden geçirilir.

Sabit faz ve hareketli faz polaritelerinin farklılığına göre adsorbsiyon ve dağılma kromatografisi, ters faz sıvı kromatografisi ve normal faz sıvı kromatografisi olmak üzere iki farklı şekilde olabilir (Bidleymeyer, B.A.,1992).

A. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Ters faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha düşüktür. Bu kromatografi türü, apolar sabit fazda daha fazla alıkonulan apolar maddelerin ayırımında kullanılır. Bu tür kromatografide en fazla kullanılan sabit faz oktadesil silan'dır (ODS). Hareketli faz olarak da genellikle su, sulu tampon çözeltileri ve suyla karışabilen polar organik çözücü veya karışımları kullanılmaktadır (Adamovics, J.A., 1997).

B. Normal Faz Sıvı Kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz polaritesi hareketli faz polaritesinden daha yüksektir. Buna bağlı olarak, polaritesi yüksek olan maddeler, polar olan sabit faz ile daha fazla etkileşmekte, buna bağlı olarak kolonu daha geç terketmektedir. Sabit faz olarak genellikle silika jel, fluorosil veya alümina kullanılmaktadır. Hareketli faz olarak da genellikle apolar çözücüler olarak kabul edilen pentan, hekzan, diklorometan, kloroform, dietil eter, petrol eteri veya bunların karışımı kullanılmaktadır (Bidlemeier, B.A., 1992).

1.5.1.3. İyon Çifti Kromatografisi

İyon çifti kromatografisi, iyonik ve iyonize olabilen türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir tür kromatografidir (Skoog D.A. ve ark., 1998). Özellikle asidik veya bazik maddelerin ayrılmasında kullanılır. Hareketli faza ilave edilen iyon çifti reaktif sabit faz tarafından adsorplanır ve iyonize olmuş maddeler bu iyon çiftleri ile iyonik etkileşime girerek birbirinden ayrılır.

1.5.1.4. İyon Değiştirme Kromatografisi

Sabit fazdaki iyonlarla numunedeki aynı yükteki iyonların karşılıklı yer değiştirmesi sonucu ayırma gerçekleşir. Bu kromatografik teknikte maddenin iyonlaşabilmesi gereklidir, bu nedenle maddelerin rahatlıkla iyonlaşabileceği taşıyıcı bir ortam kullanılır. Ayrılacak madde ile sabit faz arasında ne kadar kuvvetli iyonik bağ oluşursa alıkonma o kadar güçlü olmaktadır. İyon değiştirici dolgu maddeleri silika veya bazı polimerler üzerine iyonik fonksiyonel grupların bağlanması ile elde edilir (Sewell, P.A. ve ark., 1987).

1.5.1.5. Moleküler Eleme Kromatografisi

Maddelerin molekül büyüklüğüne ve biçimine bağlı olarak ayrılmanın gerçekleştirildiği yöntemdir. Bu kromatografik teknik jel geçirgenlik veya jel filtrasyon yöntemleri olarak da bilinir. Katı faz olarak, belli gözenek büyüklüğüne sahip ve karışımdaki bileşenlerle etkileşmeyen bir sabit faz kullanılır (Sephadex vb.)

kullanılır. Büyük moleküller gözeneklere sığmayarak hareketli fazla birlikte sürüklenerek kolondan çıkarlar. Küçük moleküller ise gözenekleri dolduran hareketli faza difüze olurlar (Krstuvolic, A.M., Brown, P.R.,1982).

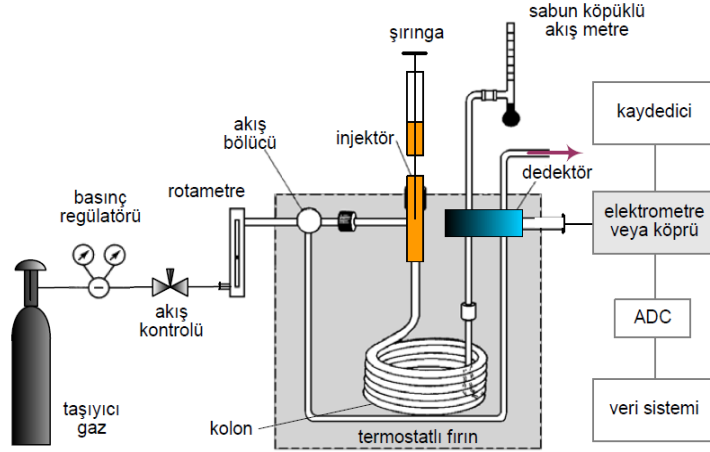
1.5.1.6. Afinite Kromatografisi

Matriks adı verilen katı bir destek materyaline ligandın kovalent olarak immobilize edilmesi işlemini kapsar. Biyokimyasal bir molekülün antijen-antibadi, enzim-sübstrat veya reseptör-ligand gibi spesifik etkileşim kurularak ayrılması esasına dayanır. Ayrılacak maddenin spesifik bağlanma eğilimi göstereceği bir sabit faz oluşturmak üzere özel hazırlanan bir jel matrikse reseptör, sübstrat vb. bağlanır. Örneğin, sabit faz, özel bir proteine karşı gelen bir antikör ise, protein karışımı kolondan geçirildiğinde sadece antikör ile etkileşen protein kolona bağlanır. Proteinin kolondan alınması için pH değeri veya hareketli faz karışımı değiştirilerek antikordan ayrılması sağlanır (Sewell, P.A. ve ark., 1987). Bu yöntem proteinlerin saflaştırılmasında kullanıldığı gibi bazı antikörler, antijenler, steroidler ve yağ asitleri gibi moleküllerin de saflaştırılmasında kullanılır.

1.6. Gaz Kromatografi (GC)

Gaz kromatografisi gaz olan veya kolay buharlaşabilen maddelerin gaz fazda ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Gaz kromatografisinde (GC) numune sisteme üç şekilde verilebilir, numune buharlaştırılıp kromatografik kolonun girişine enjekte edilebilir, numune sıvı olarak kromatografik kolonun girişine enjekte edilebilir veya gaz numune doğrudan kolona enjekte edilebilir. Gaz kromatografisinde inert bir hareketli gaz taşıyıcı olarak kullanılır (carrier gas – taşıyıcı gaz). Diğer kromatografik yöntemlerin aksine gaz faz analitin molekülleri ile etkileşmez; gazın tek işlevi, analiti kolon boyunca taşımaktır (Skoog D.A. ve ark., 1998). Gaz kromatografisinde ayırım örnek içerisinde bulunan maddelerin buharlaşmalarına ve sabit fazla yaptıkları etkileşime dayanmaktadır. Sabit faza düşük ilgisi olan ve buhar basıncı yüksek olan maddeler gaz fazda daha çok vakit geçirdikleri için taşıyıcı gaz tarafından sistemde az alıkonularak ayrılırlar. Gaz kromatografisi kolonları hassas bir fırın içerisinde bulunmaktadır. Kolon üzerine uygulanan sıcaklığa göre farklı buhar basıncına sahip moleküller izo-termal veya bir sıcaklık gradiyentine göre ayarlanan

sıcaklıktaki buhar basınçlarına göre ayrılabilir. Gaz kromatografisinde kolon çıkışında birçok farklı dedektör kullanılabilmektedir.



Şekil 1.16. Gaz kromatografisinin şematik gösterimi

1.6.1. Gaz Kromatografisinin Ayırma Etkinliği

Genel kromatografi ilkeleri ve matematiksel bağıntıları, hareketli faz olan gazın sıkıştırılabilirliğinden kaynaklanan bazı düzeltmelerle gaz kromatografiye de uygulanabilir.

Bir kolonun iki çözünen maddeyi ayırmadaki etkinliği, kısmen bu iki maddenin kolondan elüsyonlarının bağıl hızına dayanır. Bu hızlar, maddenin hareketli ve sabit fazlar arasında dağılmasını sağlayan proseslerin denge sabitlerinin büyüklüğü ile belirlenir.

1.6.1.1. Dağılma Sabitleri

Kromatografide dağılma dengeleri analitin hareketli ve durgun fazlar arasında aktarımı ile ilgilidir. Bu nedenle bir A çözüneni için

$$A_{\text{hareketli}} \rightleftharpoons A_{\text{durgun}}$$

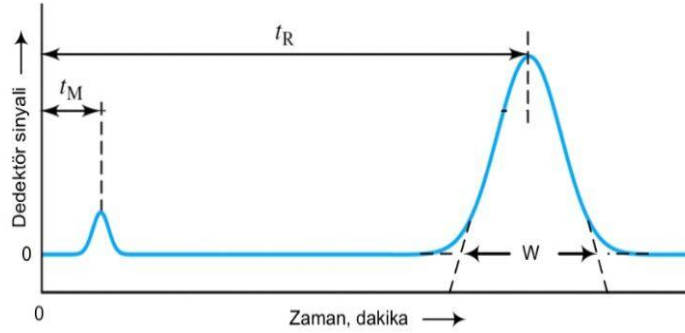
yazılabilir. Reaksiyonun K denge sabiti dağılma sabiti, bölüşüm oranı veya bölüşüm katsayısı olarak adlandırılır.

$$K = C_s / C_M$$

olarak gösterilir. C_s , çözünenin durgun fazdaki molar derişimi, C_M , ise hareketli fazdaki molar derişimidir.

1.6.1.2. Alıkonma Zamanı

Numune enjeksiyonundan sonra, analit pikinin dedektöre ulaşması için geçen zamana alıkonma zamanı denir ve t_R sembolü ile gösterilir. Şekil 1.17’de iki bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram gösterilmiştir. Soldaki küçük pik kolonda tutulmayan türe aittir. Çoğu zaman numune veya hareketli faz kolonda tutulmayan bir tür içerir. Kolonda tutulmayan maddenin dedektöre ulaşması için geçen zamana ölü zaman denir ve t_M sembolü ile gösterilir. Tutulmayan türün kolondan göç hızı, hareketli faz moleküllerinin ortalama hareket hızına eşittir.



Şekil 1.17. İki bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram

Gaz kromatografide sıcaklık ve basıncın etkilerini dikkate almak için, alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmini (V_R) kullanmak daha yararlı olmaktadır. Bir maddenin alıkonma hacmi, bir bileşenin sabit fazdan elüe olması için gerekli olan hareketli faz hacmi olup alıkonma zamanı ve hacimsel akış hızından (F) hesaplanabilir. İki arasındaki ilişki şöyledir:

$$V_R = t_R F$$

$$V_M = t_M F$$

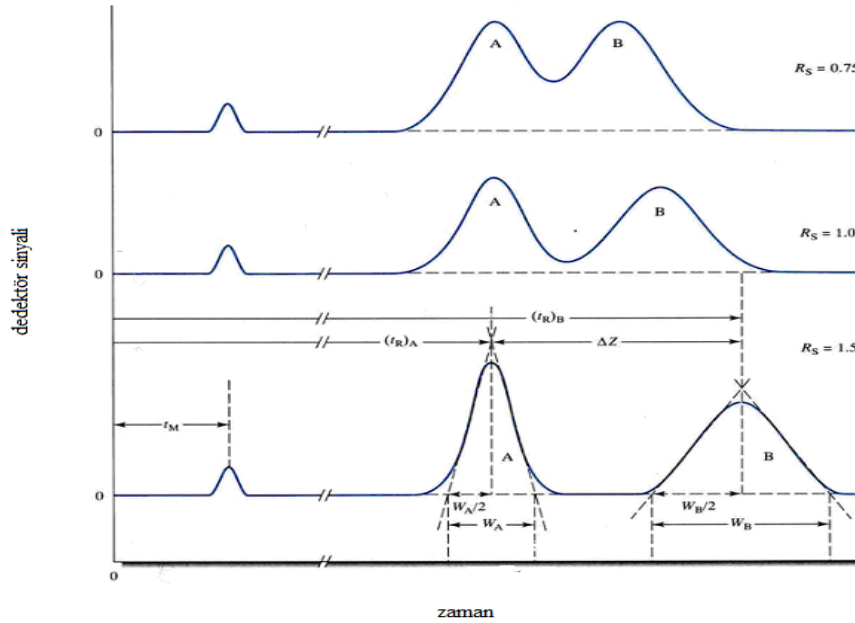
Alıkonma hacmi, temel kromatografik parametre olan dağılım katsayısı K ile aşağıdaki formül gereği doğrudan ilişkilidir.

$$V_R = V_M + K V_S$$

Bu eşitlikte V_M kolondaki hareketli faz hacmi, V_S kolondaki sabit faz hacmidir. Dağılım katsayısı (K) ise, çözünenin sabit fazdaki molar derişiminin (C_S), hareketli fazdaki molar derişimine (C_M) oranlanması ile hesaplanır.

1.6.1.3. Kolon Ayırma Gücü

Bir kolonun ayırma gücü (R_S) kolonun iki analiti ayırabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Bu terimin önemi, farklı ayırma gücüne sahip üç kolonda A ve B türlerinin kromatogramlarından oluşan aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. W_A , A pikinin genişliği, W_B , B pikinin genişliği ve ΔZ ise piklerin tepe noktaları arasındaki uzaklıktır.



Şekil.1.18. Üç ayrı ayırma gücünde ayrılma ($R_S = 2\Delta Z/(W_A + W_B)$)

$R_S = 1$ olduğunda komşu iki pik alan olarak yaklaşık 4% oranında çakışır. $R_S = 1.5$ olduğunda ise alan olarak çakışıklık yalnızca yaklaşık 0.3% kadar olup ayrılma pratikçe tam kabul edilir. Ayırımı artırmak için kolon uzunluğu artırılabilir ancak kolon boyu artırıldığında analiz süresi uzar.

1.6.2. Gaz Kromatografi Enstrümantasyonu

1.6.2.1. Taşıyıcı Gaz Kaynağı

Hareketli faz olarak azot, argon, helyum gibi inert gazlar ve hidrojen kullanılır. Gaz seçiminde dedektörün türü de göz önünde bulundurulmalıdır. Taşıyıcı gaz su ve diğer safsızlıklardan moleküler elek ve benzeri tutucular kullanılarak arındırılmalıdır. Tekrarlanabilir kromatogramlar elde edebilmek için taşıyıcı gaz hızının gaz silindirlerine bağlı iki basamaklı basınç ayarlayıcıları ile kontrol edilmesi gerekir. Gaz basıncı genellikle kolon girişinde 10-50 psi arasında değişir. Taşıyıcı gaz hızı genellikle dolgulu kolonlar için 25-150 mL/dakika ve açık boru tipi kapiler kolonlar için 1-25 mL/dakika kadardır. Gaz hızı kolon giriş gaz basıncı ayarlanarak kontrol edilir ve bilyalı rotametreler veya kolon çıkışında bir sabun köpüğü büreti ile ölçülür.

1.7.2.2. Numune Enjeksiyon Sistemi

Kolonda iyi bir ayırma yapabilmek için örnek kolona gaz fazında ve çok kısa sürede verilmelidir. Bu nedenle kolon önüne monte edilmiş enjeksiyon bölümü, örneği hızlı buharlaştırabilmek için örnekteki en az uçucu bileşenin kaynama noktasının 50° C kadar yüksek sıcaklığında tutulur.

Kolon ayırma kapasitesinin farklılığı nedeniyle kapiler ve dolgulu kolonlar için örnek enjeksiyon sistemleri farklıdır. Dolgulu kolonlarda kapasite daha büyük olduğu için sızdırmayan silikon lastik bir septumdan enjekte edilen örneğin tamamı kolona gönderilir. Kapiler kolonlarda ise kapasitenin aşılmasından kaçınmak için bir bölüştürücü (split) ile enjekte edilen örneğin ancak küçük bir kısmı kolona gönderilir. Tipik bir bölücülü enjeksiyon sisteminde enjekte edilen örneğin bir kısmı kolona gönderildikten sonra geriye kalan kısmı bölücü çıkışı ile atılır. İşte bu şekilde örneğin yüzde kaçının kolona gittiğini, yüzde kaçının bölücü çıkışından atıldığını gösteren orana split oranı denir. Bazı cihazlarda bu oranlar bilgisayardan ayarlanır.

1.6.2.3. Kromatografik Fırın

Bir maddenin kolonda alıkonması kolon sıcaklığına bağlıdır. Bu nedenle kolon içerisinde sıcaklık homojen olarak dağılmalı ve $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ile sabit olmalıdır. Optimum kolon sıcaklığı numunenin kaynama sıcaklığına ve istenen ayırma verimine bağlıdır. Kabaca, numunenin ortalama kaynama sıcaklığının biraz üstünde bir sıcaklıktaki kolonda maddelerin elüsyon zamanı 2-30 dakika arasında değişebilir. Çok geniş bir kaynama noktası aralığındaki numuneler için sıcaklık programlaması yapmak gerekir. Sıcaklık programlamasında kromatografik ayırım devam ederken kolon sıcaklığı sürekli veya basamaklar halinde artırılır.

1.6.2.4. Kromatografik Kolonlar

Başlangıçta gaz kromatografik çalışmalar toz şeklindeki inert katı destek üzerine kaplanmış sıvı fazla doldurulan dolgulu kolonlarda yapılmaktaydı. Daha sonra, dolgusuz boru şeklindeki kapiler kolonlarla da daha başarılı ayırmaların yapılabileceği görüldü. Kapiler kolonlarda sabit faz kapiler boru çeperlerine mikrometre veya daha az kalınlıklarda kaplanmaktadır. Dalgulu kolonlarla kıyaslandığında açık borusal kolonların daha büyük ayırma gücü, daha kısa analiz süresi ve daha büyük seçiciliği gibi avantajları ve daha düşük örnek kapasitesi gibi dezavantajı vardır.

Günümüzde açık kapiler borusal kolonların çoğu erimiş silikadan yapılmaktadır. Kolonlarda kullanılan sabit fazlar ayrılacak analitlerin yapısına göre seçilirler. Apolar maddeleri ayırmak için apolar kolonlar ve polar maddeleri ayırmak için polar kolonlar kullanılır.

Dolgulu kolonlar ise cam, paslanmaz çelik, bakır, alüminyum veya Teflon gibi malzemelerden yapılmaktadır. Boyları 2-3 metre, iç çapları 2-4 mm arasında değişmektedir. Bu kolonlar, ince (0,05-1 μm) bir durgun sıvı faz ile kaplanmış, homojen ve ince taneli bir katı (destek katısı) ile iyice doldurulur. Bunlar, sıcaklığı ayarlanabilen fırına kolayca yerleştirilebilmeleri için 15 cm çaplı sarımlar haline getirilirler. Katı destekler genellikle diatome topraklar, Teflon ve bazı gözenekli polimerlerdir.

1.6.2.5. Dedektörler

Örnek karışımının bileşenleri kolonda ayrıldıktan sonra kolon çıkışında uygun bir detektörle belirtilmesi gerekir.

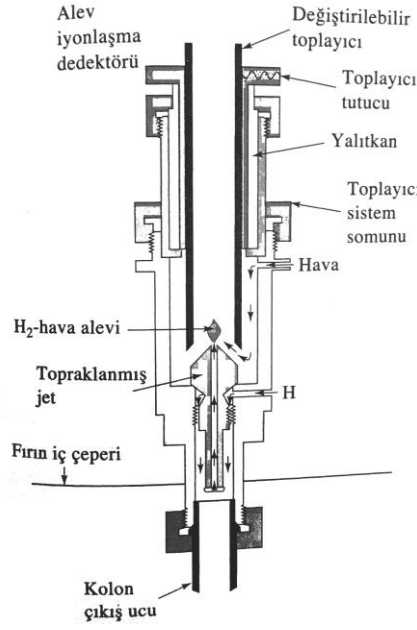
İdeal bir dedektörde aşağıdaki özellikler aranır;

1. Uygun duyarlık
2. Kararlılık ve tekrarlanabilirlik
3. Oda sıcaklığı ile 400°C arasında kullanılabilirlik
4. Akış hızından bağımsız kısa yanıt süresi
5. Yüksek güvenilirlik ve kullanma kolaylığı
6. Tüm solütler için benzer yanıtlar veya bir veya daha fazla tür solütler için yüksek ve seçimli yanıtlar
7. Örneği bozmaması

Mevcut dedektörlerin hiçbiri bu özelliklerin hepsini taşımamaktadır. Günümüzde çok sayıda dedektör bulunmakla beraber bunlardan en yaygın olarak kullanılanlar kütle duyar dedektörler ve derişim duyar dedektörlerdir. Kütle duyar dedektörler, birim zamanda dedektöre ulaşan madde miktarına göre yanıt verirler. Alev iyonlaştırmalı dedektörler, alev fotometrik dedektörler ve elektron yakalama dedektörleri kütle duyar dedektörlerdir. Derişim duyar dedektörler ise taşıyıcı gaz içindeki madde derişimine yanıt verirler. Termal iletkenlik dedektörü derişim duyar dedektörlere örnek verilebilir.

A- Alev İyonizasyon Dedektörü (FID)

Gaz kromatografisinde en yaygın kullanılan dedektördür. Kolondan gelen örnek ve taşıyıcı gaz kolon çıkışında hidrojen ve sonra hava ile karıştırılarak küçük bir bekin ucunda yakılır. Birçok organik bileşik yakıldığında iyonlar, elektronlar ve karbon tanecikleri oluşturularak alevin iletken hale gelmesini sağlarlar. Bek ucu ile alevin üstüne yerleştirilen kollektör elektrot arasına birkaç yüz volt gerilim uygulanır. Oluşan akım yüksek empedanslı bir işlemci anfi ile ölçülür. Bu akım birim zamanda aleve ulaşan madde miktarı ile orantılıdır.



Şekil 1.19. Alev iyonizasyon dedektörünün şematik gösterimi

Karbonil, alkol, halojen ve amin gibi bazı fonksiyonel gruplar alevde çok az iyon oluştururlar. FID ayrıca H_2O , CO , CO_2 , CS_2 , SO_2 , NH_3 , N_2O , NO , NO_2 , SiF_4 ve $SiCl_4$ gibi gazlara da yanıt vermemektedir.

FID nin duyarlılığı yüksek, zemin gürültüsü az ve doğrusal yanıt aralığı geniştir, ancak örneği bozar (Şekil 1.19).

B- Termal İletkenlik Dedektörü (TCD)

Katarometre olarak da bilinen termal iletkenlik dedektörleri analit moleküllerinin taşıyıcı gazın termal iletkenliği değiştirmesine dayanır. Bu dedektörlerde sabit bir elektrik gücü ile beslenerek ısıtılan platin, altın veya tungsten tel veya yarı iletken termistör bulunur. Bu tellerin sıcaklığı ve dolayısıyla direnci üzerlerinden geçen gazın termal iletkenliği ile değişir.

Kromatografik ölçümlerde bir çift dedektör kullanılır. Bu dedektörlerin birinden saf taşıyıcı gaz geçirilirken diğeri kolon çıkışına bağlı olup üzerinden örnek ve taşıyıcı gaz karışımı geçer. Böylece taşıyıcı gaz hızı basınç ve elektrik gücündeki değişikliklerin sinyale etkisi azaltılır. Hidrojen ve helyumun termal iletkenlikleri organik ve anorganik gazlara göre 6-10 kat daha fazla olduğu için bu dedektörler

yapılan çalışmalarda taşıyıcı gaz helyum ve hidrojenidir. Böylece çok düşük derişimde bir organik madde varlığında bile kolondan çıkan gazların termal iletkenliğinde önemli azalma ve dedektör sıcaklığında ve direncinde ise artış oluşur.

TCD dedektörlerin avantajları arasında basitlikleri, çok geniş bir doğrusal yanıt aralığı ($\sim 10^5$), tüm bileşiklere yanıt verebilmesi ve örneği parçalamaması (analit gerekirse belirtme sonrası toplanabilir) sayılabilir. En büyük dezavantajı ise diğer dedektörlere göre düşük duyarlılığıdır.

C- Elektron Yakalama Dedektörü (ECD)

Elektron yakalama dedektörü çevre örnekleri analizleri için en çok kullanılan dedektörlerden biridir. Çünkü bu dedektör çevre açısından çok önemli olan klorlu pestisitler ve poliklorobifenillerin seçimli olarak yüksek duyarlılıkla tayinlerine elverişlidir.

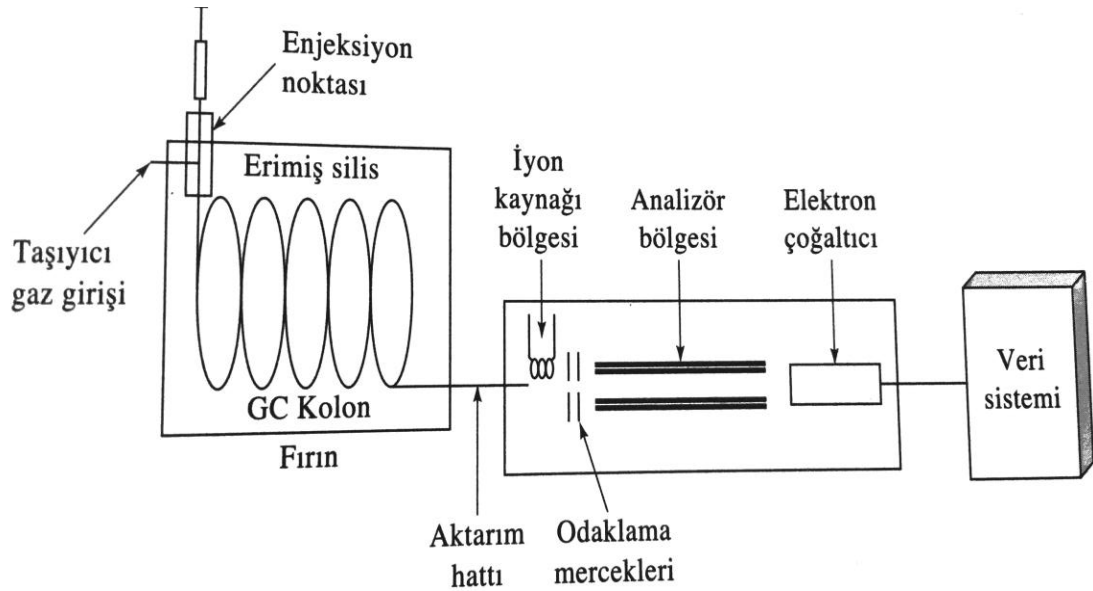
Bu dedektörlerde kromatografik kolondan çıkan gazlar β ışınları yayan nikel-63 önünden geçer. Taşıyıcı gaz, çoğunlukla azot, β ışınları etkisiyle iyonlaşarak iyon ve elektronları oluştururlar. Dedektör içinde bulunan iki elektrod arasında sabit bir akım geçer. Ancak bu dedektöre elektron yakalayan organik moleküller girdiğinde elektron derişimi azaldığı için dedektör akımı da azalır. Dedektöre pulslu bir gerilim uygulayarak birim zamanda dedektöre ulaşan madde miktarıyla doğrusal olarak azalan bir akım sinyali elde edilir.

ECD elektronegatif fonksiyonel gruplar (örneğin; halojenler, peroksitler, kinonlar ve nitro grupları) içeren moleküller için yüksek seçimlilik ve duyarlılık gösterirler. Buna karşılık ECD, alkoller, aminler ve hidrokarbonlara karşı duyarsızdırlar.

Bu dedektörler, örneği bozmazlar, çok duyarlı ve seçimlidirler, ancak doğrusal çalışma aralığı dar olup yalnızca iki mertebedir.

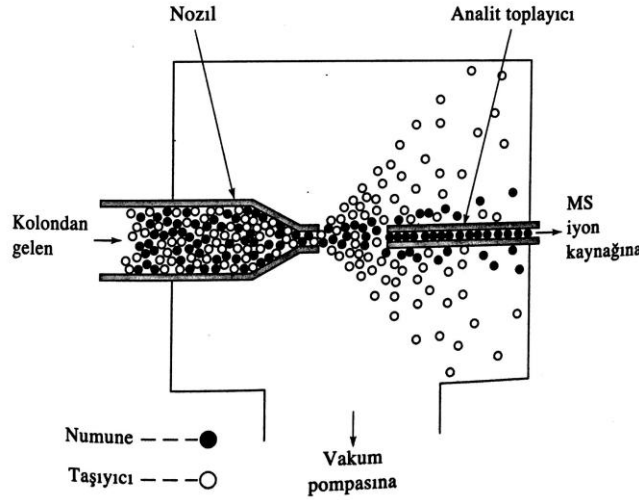
1.7. Gaz Kromatografi/ Kütle Spektrometri (GC-MS)

Gaz kromatografi çoğu zaman seçici spektroskopik ve elektrokimyasal tekniklerle bağlantılı olarak kullanılır. Böylece ikili yöntemler adı verilen bu sistemler, kompleks karışımların analizinde güçlü bir araç olarak kullanılır. Gaz kromatografi cihazları, hızlı tarama yapabilen çeşitli kütle spektrometrelerine doğrudan bağlanmış olarak üretilir. Kılcal kolonlardan gelen eluatın akış hızı genellikle küçük olduğu için, madde doğrudan kütle spektrometrenin iyonlaştırma bölgesine verilebilir. Bu tür bir sistemin şematik görünümü şekil 1.20.'de verilmiştir.



Şekil 1.20. Gaz kromatografi/kütle spektrometrenin şematik gösterimi

Dolgulu kolonlar ve kapiler kolonlar için Şekil 1.21.'de olduğu gibi taşıyıcı gazın büyük bir kısmını analitten ayıran camdan bir jet ayırıcı sistemin kullanılması gerekir.



Şekil 1.21. Bir jet ayırıcının şeması

Bu sistemde kolon gazları jet ayırıcının ucundan çıkarken, ağır analit molekülleri yüksek momentum kazanır ve bunların %50'si karşı tüpe girerken, hafif helyum atomları vakum tarafından emilir. Kuadropol ve manyetik sektörlü kütle spektrometreleri gaz kromatografına bağlı olarak kullanmayı sağlayan donanım ile birlikte satılmaktadır. 1970'li yılların başlarında özellikle gaz kromatografide kullanılmak üzere çeşitli kütle spektrometreleri imal edilmiştir. Gaz kromatografı ile kullanılan en basit kütle dedektörü iyon-tuzak dedektörüdür (ITD). Bu dedektörde, kolondan gelen gaz, elektron bombardımanı veya kimyasal iyonlaşma ile iyonlaştırılır ve radyo frekans manyetik alanında depolanır. Tutulan iyonlar daha sonra elektron çoğaltıcı dedektöre sevk edilir. Bu sevk, kütle/yük oranının taramasının yapılabilmesi için kontrollü gerçekleşir.

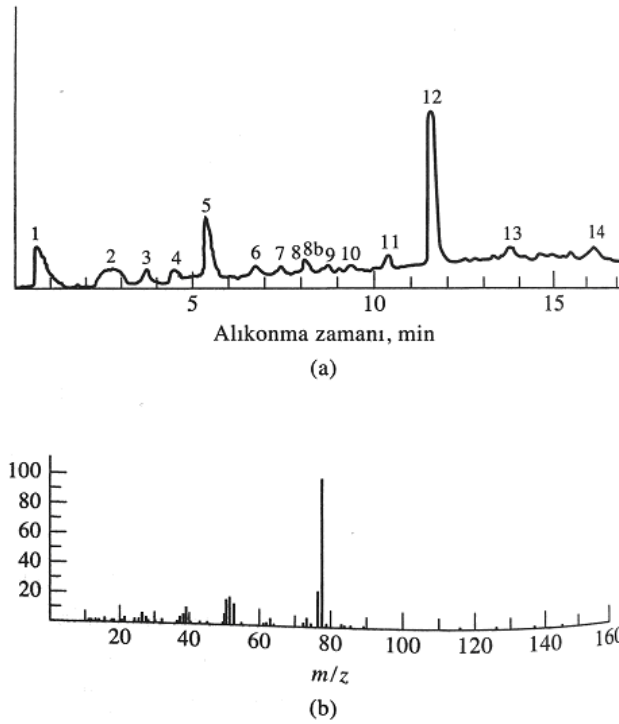
Kütle spektrometrik dedektörler genellikle iki tip sinyal görüntüsü verebilirler; anında sinyal görüntüleri ve bilgisayarda yeniden biçimlendirilmiş sinyal görüntüleri. Bunların her birinde aşağıdaki seçimler yapılabilir.

- (a) Toplam iyon kromatogramları (zamana göre tüm iyon akımlarının grafiği)
- (b) Seçimli iyon akımı kromatogramları (zamana karşı bir veya birkaç iyonun oluşturduğu akımlar)
- (c) Bazı kromatografik piklerin kütle spektrumları

Ayrım olayı tamamlandıktan sonra bilgisayar ile oluşturulmuş kromatogramları ekrana yansıtmak ve bazı cihazlardaki bilgi bankaları sayesinde maddeleri tanımak mümkündür.

GC-MS sistemi biyolojik veya doğal sistemlerdeki yüzlerce maddeyi aynı anda tanımak amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin, gıdalardaki tat ve koku veren maddelerin, su kirleticilerin tayininde, ilaç ve uyuşturucu metabolitlerin incelenmesinde kullanılır (Skoog D.A. ve ark., 1998).

GC/MS sisteminin kullanımına ait bir örnek şekil 1.22.'de verilmiştir. Birinci grafikte (a), yanma geciktirici bir kimyasal madde ile işlem görmüş bir giysinin yakılması sırasında oluşan gazların kromatogramı verilmiştir. Dikey eksen toplam iyon akımı, yatay eksen ise alıkonma zamanı olarak alınmıştır. Pikler şunlara karşılık gelmektedir; (1) Hava, (2) su, (3) hidrojen siyanür, (4) bilinmeyen, (5) asetaldehit, (6) etanol, (7) asetonitril, (8) aseton, (8b) bilinmeyen, (9) karbon disülfür, (10) bilinmeyen, (11) bilinmeyen, (12) benzen, (13) toluen, (14) ksilen. İkinci grafikte (b), kromatogramdaki 12 numaralı pikin (benzen) kütle spektrumu görülmektedir. Kütle numarasına karşı bağıl iyon akımları grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 1.22. GC/MS kullanımına ait örnek

1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografik sistemlerdir. Mobil fazın sabit fazı içeren bir kolondan belirli bir basınç uygulanarak geçirildiği kromatografik sistemlere yüksek basınçlı veya performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) denir.

Sıvı kromatografisinin teorisi gaz kromatografisi ile aynıdır. Yalnızca hareketli faz gaz yerine sıvıdır. Amaca göre seçim yapılır. Kromatografide ayrılan bileşiklerle daha başka işlemler yapılacaksa bileşiklerin toplanması istenir. Toplamada gaz kromatografisinde taşıyıcı gaz olduğundan ortamdan hemen uzaklaşır ve saf bileşik kolayca uygun bir soğutma sistemiyle sıvı veya katı halde elde edilebilir. Sıvı kromatografisinde ise taşıyıcı sıvı olduğundan toplam saf bileşik yanındaki taşıyıcı sıvıyı uzaklaştırmak için işlemler gerektirir. Bu nedenle toplama için gaz kromatografisi ile çalışmak tercih edilir. Buna karşılık ayrılacak bileşik ısıya karşı duyarlıysa veya büyük molekülü ise sıvı kromatografisi kullanılır.

Kromatografik ayırım, sabit faz ile molekül arasındaki etkileşmelere dayanır. Bunlar; adsorpsiyon, partisyon, çözücü itmesi, iyon değişimi ve moleküler eleme gibi etkileşimlerdir. Moleküller, sabit fazla farklı derecelerde etkileşmelerine bağlı olarak farklı sürelerde kolonu terk ederler. Sabit faza afinitesi en fazla olan en geç gelir. Kolonun uzunluğu arttıkça bantlar genişler, kolon çok kısa olursa maddeler iyi ayrılamaz. Ayırım için bantlar birbirinden tamamen uzak, homojen olmalıdır.

HPLC bütün analitik yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılandır. Bu yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinler yapılabilmesi, kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolaylıkla bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olmasıdır. Amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler gibi maddelere uygulanabilirliği de kullanımını artıran sebeplerdendir (Skoog D.A. ve ark., 1998).

1.8.1. HPLC Enstrümantasyonu

1.8.1.1. Hareketli faz

HPLC’de daha iyi ayırım gerçekleştirmek için sabit fazı değiştirmek zor ve kısıtlıdır. Bu nedenle ayırım gücünü artırmak için hareketli fazda değişiklikler yapılabilir. Hareketli faz iki sistemden oluşturulabilir.

A- İzokratik sistem

Elüsyon sırasında mobil fazın bileşimi değiştirilmez. Bileşenler sabit bileşimli tek bir çözücü ile elüe edilirler. Tüm bileşenler kolonda aynı anda farklı hızlarda göç ederler.

B- Gradient sistem

Elüsyon sırasında mobil fazın bileşimi değişir. Polariteleri birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniktir. Çözücü bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değiştirilir.

1.8.1.2. Pompa

Mobil fazın kolon boyunca akımını sağlamak için kullanılırlar. Deneylerin tekrarlanabilir olması için mobil fazın pompalanma hızı sabit olmalıdır. Kullanılan akım 0.5-10 mL/dakikadır. Sabit basınç ve sabit hacim pompaları kullanılan pompa çeşitleridir.

1.8.1.3. Enjektör

En çok kullanılan enjektör tipi 6 girişli veya çoklu girişe sahip dışardan veya içerden bir örnekleme hücresinin tutturulduğu valf sistemine sahiptir. Septum tipi enjektörler, sabit luplu enjektörler ve değişebilir hacimli enjektörler kullanılan enjektör çeşitleridir.

1.8.1.4. Kolon

Kolon (sabit faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Genellikle çelik, ve camdan imal edilir, içi belli ölçülerde sabit fazla doldurulur (Silika veya polimer gibi). Kolon Fırını kolonu saklamak ve sabit sıcaklıkta tutmak için kullanılır. Blok ısıtıcılı, Fanlı ve Peltier kolon fırınları mevcuttur. Peltier sistemler çok çabuk ısıtılıp soğutulabildiği ve daha stabil sıcaklık sağladığı için tercih edilir. Kaçak sensörlü ve multi kolon teknolojiye olanları da mevcuttur. Kolonlar genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı dolguludur. HPLC'nin hayata geçmesiyle kullanılmaya başlanan silika bazlı kolonlar artık yerini yavaş yavaş hızlı analiz yapabilen mikro ve nano gözenekli polimer bazlı kolonlara bırakmaya başlamıştır. Polimer kolonlar silika bazlı olanlara göre ortalama 3 kat daha uzun ömürlüdür ve rejenere edilebilir. Kullanılan mobil faz, sabit faz (kolon) ve moleküler etkileşim türlerine göre HPLC teknikleri aşağıdaki temel gruplarda toplanabilirler.

A- Normal Faz Kromatografisi

Sabit fazın, polar (silika jel-polimer ve üzerine bağlanmış -CN, -NO₂ veya -NH₂ dolgu maddeleri), mobil fazın apolar yada düşük polariteye sahip (etileter, kloroform, hekzan vb. çözücüler ve karışımları) olduğu durumdur. Düşük polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar analit polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

B- Ters Faz Kromatografisi

Sabit fazın apolar (Silika jel-polimer ve üzerine bağlanmış C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil veya -NH₂ gruplu dolgu maddeleri), mobil fazın polar (metanol, asetonitril, tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları) olduğu durumdur.

Yüksek polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle polar analit apolar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır.

C- İyon Değişirme Kromatografisi

İyonik bileşikleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Ayrıca suda çözünen organik maddelerin analizinde de kullanışlıdır. Katyonlar için negatif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar, anyonlar için pozitif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar kullanılır. İyonun molekül ağırlığı arttıkça kolonda tutunma gücü de artar.

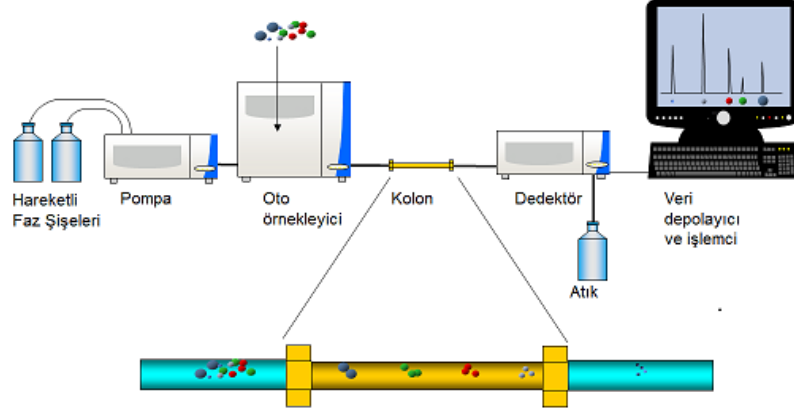
D- Boyut Dışlama (Eleme) Kromatografisi

Molekül ağırlıkları farkı çok büyük olan analitlerin bir arada analizleneceği karışımlar için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte analitler ve kolon dolgu maddesinde kimyasal değil fiziksel bir etkileşim vardır. Büyük molekül ağırlığı olan analit kolon dolgu maddesindeki porlara sığmadığı için kolonu önce terk eder. Genellikle polimer, şeker ve protein analizlerinde kullanılır.

1.8.1.5. Dedektörler

HPLC sisteminde anahtar bileşenlerden biri dedektördür. Kromatografik yöntemle ayrılan herhangi bir moleküle ilişkin anlamlı bir sonuç üretebilmek için, nitel ve nicel yönden değerlendirilmesi gerekir. Bir dedektörün işlevi, örneğin derişimine orantılı olacak şekilde elektrik sinyali üretmektir. İdeal bir dedektör, yaygın olarak kullanılan eluentler için ya çok az ya da hiç sinyal üretmemelidir. Fakat uygulamada böyle bir dedektörle karşılaşmak güç, bu nedenle en iyi dedekte edebilen bölge, mobil fazda ve kromatografik sınırlar içinde seçimlilik ve duyarlık açısından seçilmelidir. HPLC’de en çok kullanılan dedektörler ultraviyole/görünür

bölge (UV/VIS), refraktif indeks (RI), flouresans, elektrokimyasal (EC), evaporatif ışık saçılması esaslı dedektörlerdir. Şekil 1.23.'de HPLC cihazı gösterilmiştir.



Şekil 1.23. HPLC enstrümantasyonu

1.9. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)

Kromatografi yönteminin uygulandığı, yarı otomatize olan bu sistem, tek bir yazılım ile bilgisayar tarafından kontrol edilen ve farklı işlevlere sahip cihazlardan oluşur. Bu cihazlardan ilki plakaya en az 36, en çok 72 numune tatbik edebilen, robotik bir şırınga sistemine sahip örnekleyicidir. Numunelerin, belirlenen miktarda ve bilgisayar kontrolü ile plakaya x-y düzleminde, uygun mesafelerden bant veya spot şeklinde özel bir şırıngadan püskürtülmesiyle uygulanmasını sağlar. Numuneler bu yolla plaka yüzeyine hapsedildikten sonra plaka yürütme tankına ayırım işleminin gerçekleşmesi için bırakılır. Yürütme tankları izokratik ve gradiyent olarak iki çeşittir. İzokratik tank ünitesi, geleneksel ince tabaka kromatografisindeki kapalı bir tank sistemini temsil eder. Bu otomatik cihaz sayesinde tank içindeki yürüme mesafesi, nem, kurutma ve satürasyon kontrolü sağlanmaktadır. Hazneye yerleştirilen plak otomatik olarak tanka indirildikten sonra, belirlenen mobil faz ile muamele gerçekleştirilir. Ardından plakayı tanktan çıkararak, belirlenen süre kadar otomatik kurutma sisteminde bekletilir. Daha sonra plaka, ayırımı gerçekleşen lekelerin densitometrik olarak değerlendirilmesi için üçüncü cihaz olan tarayıcı ünitesine uygun şekilde yerleştirilir. Densitometri, plaka üzerindeki her bir lekeye

gönderilen ışığın şiddetinden, yansıyan ışığın şiddeti çıkartılarak elde edilen spektrumdan bileşenin konsantrasyonuna, miktarına ilişkin bilgi elde etmeyi sağlamaktadır. Lekelerin yerlerinin tatbik noktasına uzaklığının, tüm analiz mesafenin uzunluğuna oranından, lekenin bu sistemdeki alıkonma değeri olan “ R_f ” hesaplanır.

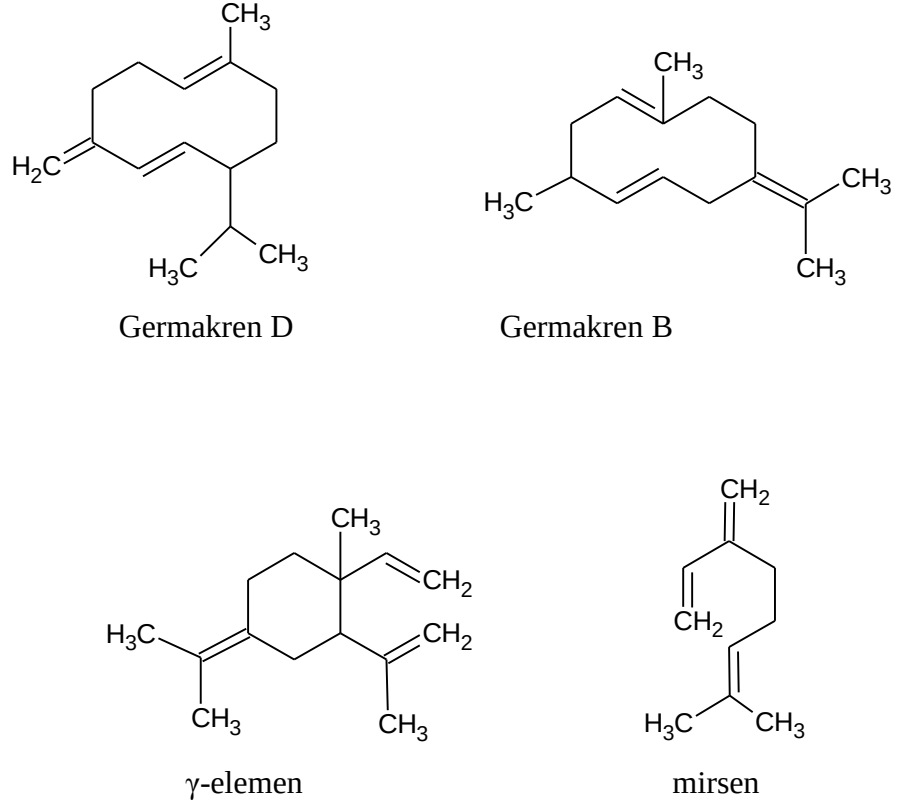
HPTLC metodu, yüksek hassasiyet, kesinlik ve doğruluk gibi çeşitli validasyon parametrelerine sahip olmakla birlikte geleneksel ince tabaka kromatografisi ile kıyaslandığında birçok avantajları öne çıkmaktadır. Sistemin gelişiminde, plaka teknolojisinin gelişimi de etkin rol oynamıştır. Bu anlamda geleneksel TLC ve HPTLC plakaları arasında önemli farklar vardır. Partikül büyüklüğü azaltılarak dağılımın daraldığı, bunun da etkin ayırım sağladığı gözlenmektedir. Tabaka kalınlığı da eskiye göre azaltılarak, bir kerede analizi yapılacak numune sayısı yaklaşık 5 kat artmıştır. Uygulamanın, otomatik şırınga ile yapılması kontrollü bir tatbik sağlayarak kullanıcı hatasını ortadan kaldırmaktadır. Tankın nem ve sıcaklık kontrol üniteleri ile çevresel etkilerden izole edilmesi, standardizasyon için önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bilgisayar ile hem kromatogram hem UV spektrumları kaydedilerek UV kütüphanesi oluşturulabilmektedir. Böylelikle maddelerin R_f değerinin yanı sıra, UV kütüphanesi de maddelerin tanımlanmasında yardımcı bir parametredir. Elde edilen kromatogramdaki pikin standart çözeltiler ile kıyaslanması yoluyla pikin alan ve/veya yüksekliğinden faydalanılarak miktar tayini yapılabilmektedir.

Tüm bu avantajları yanında tekniğin birtakım dezavantajları da vardır. Sınırlı bir ayırım gücüne sahiptir. Mobil fazı için tercih edilen çözücülerin genellikle kaynama noktaları düşüktür ve bu tank içindeki gaz fazın kontrolünü sınırlar. Gaz fazın kontrol edilmemesi analizin tekrar edilebilirliğini etkiler. Tam otomatik bir sistem değildir (Türkmen, Z., Mercan, S., Cengiz, S., 2008).

1.10. *Lathyrus* Türlerinin Uçucu Yağları ile İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar

Literatür çalışmalarında *Lathyrus ochrus*’un uçucu yağları üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak İran’da, 2008 yılında, *Lathyrus rotundifolius*’un GC ve GC/MS ile uçucu yağları analiz edilmiştir. Bitkinin yerüstünde kalan kısımlarından hidrodistilasyonla uçucu yağ elde edilmiştir. Analiz

edilen uçucu yağda toplam 13 bileşen tayin edilmiştir. Germakren D (50.4%), germakren B (18.7%), γ -elemen (9.5%) ve mirsen (7.4%) bitkinin uçucu yağında bulunan ana maddeler olarak tayin edilmiştir. Bu maddelere ait yapılar Şekil 1.24’de gösterilmiştir.

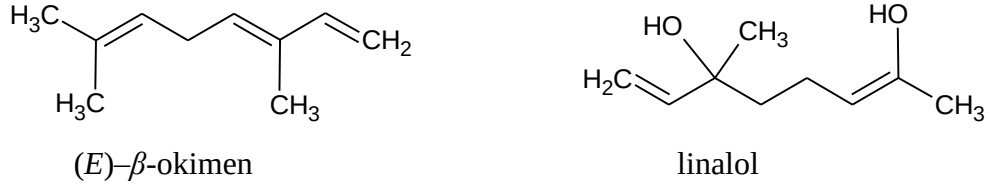


Şekil 1.24. *Lathyrus rotundifolius*’un uçucu yağında bulunan maddeler

Bu çalışmada, kurutulmuş bitki örnekleri Clevenger aпараты kullanarak hidro-distilasyon yöntemi ile 3 saat boyunca distile edilmiştir. Uçucu yağ 0.85% verim ile elde edilmiş ve GC, GC-MS ile analiz gerçekleştirilmiştir (Tajbakhsh, M.ve ark., 2008)

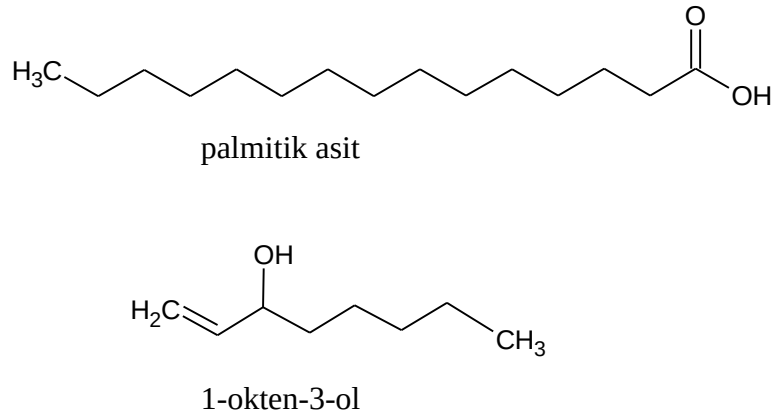
Benzer bir çalışma 1999 yılında, İngiltere’de *Lathyrus odoratus* türü üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada farklı olarak bitkinin çiçekli kısmı ile çalışılmış ve bitkinin uçucu yağ dışındaki diğer uçucu bileşenleri analiz edilmiştir. Bitki öncelikle, 250 mg 2,6-difenil-*p*-fenilen oksit içeren kolonlara koşullandırılarak dietil eter çözücüsüyle elüe edilmiştir. Ardından diğer çalışmada olduğu gibi GC/MS ile analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda toplam 48 uçucu bileşenin varlığı tespit

edilmiştir. Bu analizin sonucunda bitkinin çiçekli kısmında en fazla bulunan bileşenlerin (*E*)- β -okimen (35.5%) ve linalool (20.7%) olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 1.25) (Porter, A.E.A ve ark., 1999).



Şekil 1.25. *Lathyrus odoratus*'un yapısındaki uçucu maddeler

Ayrıca *Lathyrus vernus* L. çiçek ve gövde uçucu yağları üzerinde yapılan çalışmalarda palmitik asit (34.2-35.3% sırasıyla) ve 1-okten-3-ol (49.8 – 0% sırasıyla) maddeleri (Şekil 1.26) ana bileşenler olarak tespit edilmişlerdir (İskender ve ark., 2009).



Şekil 1.26. *Lathyrus vernus*'un uçucu yağında bulunan maddeler

1.11. *Lathyrus* Türlerinin Uçucu Olmayan Sekonder Metabolitleri Üzerinde Yapılmış Önceki Çalışmalar

Literatür çalışmalarında *Lathyrus* türlerinden yeni flavonoidler, flavonoller, şalkonlar, pterokarpanlar, saponinler ve bilinen steroller izole edilmiştir. (Akihisa ve ark., 1991; Fuchs ve ark., 1984; King ve ark., 1998; Markham ve ark., 1992;

Markham ve Hammet, 1994; Reynaud ve ark., 1981; Robeson ve Ingham, 1979; Udayama ve ark., 1998).

Ayrıca *Lathyrus* türlerinden yeni primer metabolitler elde edilmiştir. Özellikle bu cinste spesifik olarak bulunabilen amino asitler α -N-oksaliil-L- α,β -diaminopropiyonik asit (α -ODAP), β -N-oksaliil-L- α,β -diaminopropiyonik asit (β -ODAP) ve karbohidrat L-bornesitol maddeleri bildirilmiştir. (Ichimura ve ark., 1999; Harrison ve ark., 1977)

2. MATERİYAL ve YÖNTEM

2.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada kullanılan bitkisel materyal, KKTC'nin birçok bölgesinde yetişmekte olan *Fabaaceae* familyasına ait *Lathyrus ochrus* L. bitkisidir (Şekil2.1). Bitki, Güzelyurt bölgesinden, 18.03.12 tarihinde çiçekli bir şekilde toplanmıştır. Bitkinin tür teşhisi Yrd. Doç. Dr. Kaan Polatoğlu tarafından yapılmış ve bir adet herbaryum örneği Yakın Doğu Üniversitesi Herbaryumu'na kayıt edilmiştir (Herbaryum no: 6772).



Şekil 2.1. *Lathyrus ochrus* (L.) DC.

2.2. Kimyasal Materyaller ve Cihazlar

Araştırmada kullanılan kimyasallar Tablo 2.1 ve araştırmada kullanılan cihazlar Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Araştırmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Temin Edildiği Yer
Hekzan	VWR Prolabo (HPLC grade)
Kloroform	VWR Prolabo (HPLC grade)

Etil asetat	VWR Prolabo (HPLC grade)
Metanol	VWR Prolabo (HPLC grade)
DPPH	Fluka
BHT	Alfa Aesar
α -Tokoferol	Alfa Aesar

Tablo 2.2. Araştırmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka
Rotary Evaporator	Heidolph Laborota 4001 efficient
Ultrasonik Banyo	Bondelin Sonorex Digitec
HPTLC	Ekim: Linomat 5 Tarama: TLC Scanner 4
İklimlendirilmiş Kabin	Convion S10H
Etüv	Binder – ED 115
Bitki Öğütme Değirmeni	Retsch – SK 100
UV/VIS Spektrofotometre	Shimadzu – UV mini-1240
GC, GC-MS	Agilent 5975 GC-MSD

2.3. Ekstraksiyon

Laboratuvara getirilen örnekler havadar, güneş almayan bir odada kurutulduktan sonra bitki öğütme değirmeninde öğütülmüştür. Araştırmamızda, bitkinin hekzan ve kloroform olmak üzere iki farklı ekstresi ile çalışılmıştır. Kuru bitkinin tamamı öncelikle hekzan ile ekstre edilmiştir. 823,27 g örnek 20 L’lik meserasyon tankında 5 L hekzan ile 3 gün süre ile ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrenin çözücüsü vakum altında uçurulmuştur. Aynı şekilde, hekzan ekstresi hazırlanan örnek süzildükten

sonra 20 L'lik meserasyon tankında 5 L kloroform ile 3 gün süre ile ekstre edilmiştir. Ekstrelerin miktarları ve verimleri Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Elde edilen ekstrelerin miktarları ve verimleri

Bitki Cinsi/Türü	<i>L. ochrus</i>
Çözücü miktarı	5 L
Bitki miktarı	823.27 g
Hekzan Ekstresi/Verim	12.8567g / 1.56%
Kloroform Ekstresi/Verim	10.0856 g / 1.23%
Etil Asetat Ekstresi/Verim	5.2002 g / 0.63%
Metanol Ekstresi/Verim	60.80 g / 7.39%

2.4. Hidrodistilasyon

Lathyrus ochrus bitkisinin içerdiği uçucu maddelerin incelenmesi için bitkiden Clavenger apareyi sayesinde uçucu yağ elde edilmiştir.

-80°C'de taze olarak saklanan *L. ochrus* bitkisi küçük parçalara ayrılmıştır. Miktarı 211,12 g olarak belirlendikten sonra balon jojeye konulmuştur. Bitki parçalarının üzerine 1 L distile su eklenip Clavenger Apareyi bağlanmıştır. Kondenzasyon akımı çalıştırıp ısıtıcıya bağlı olarak 3 saat boyunca distilasyon yapılmıştır. İşlem sonunda elde edilen yağ miktarı aparey üzerinde mililitre cinsinden ölçülmüştür. Elde edilen uçucu yağların verimleri v/w (elde edilen yağ miktarı mL) / (bitki miktarı g) olarak hesaplanmıştır. *Lathyrus ochrus* bitkisinin eldesinde ise verim, <0,01mL olarak hesaplandı. Uçucu yağlar analiz yapılacakları güne kadar bozulmamaları için teflon kapaklı cam flakonlarda 4°C'de ışık almayacak şekilde saklanmıştır. Elde edilen uçucu yağın analizi GC, GC-MS ile gerçekleştirilmiştir.

2.5 Uçucu Yağ Analizleri

2.5.1 GC-MS Analizi

GC-MS analizi Agilent 5975 GC-MSD sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Innowax FSC kolonu ($60\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$ film kalınlığı), akış hızı 0.8 mL/dk olan helyum taşıyıcı gazı ile birlikte kullanılmıştır. GC fırın sıcaklığı 10 dakika süresince 60°C 'de tutulmuştur ve sonra 4°C/dk hızla 220°C 'ye çıkartılmıştır. Bu sıcaklıkta da 10 dakika tutularak 1°C/dk hızla 240°C 'ye çıkartılmıştır. Split oranı 40:1 olarak ayarlanmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C olarak belirlenmiştir. Kütle spektrumları 70 eV enerjide ve $35\text{-}450\text{ m/z}$ (kütle/yük) aralığında alınmıştır.

2.5.2 GC Analizi

GC analizi Agilent 6890N GC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. FID dedektör kullanılmış ve dedektör sıcaklığı 300°C 'ye ayarlanmıştır. GC-MS sistemindeki ile aynı elüsyon sırasını elde etmek için, benzer özellikte bir kolona, aynı koşullar altında eşzamanlı olarak otomatik enjeksiyon yapılmıştır. Ayrılmış bileşiklerin relatif yüzdelik miktarları FID kromatogramları kullanılarak hesaplanmıştır.

2.5.3 Bileşiklerin tanımlanması

Uçucu yağ ve uçucu bileşenlerin tanımlanması, bilinen maddeler ve analizi yapılan maddelerin relatif gecikme zamanları kıyaslanması yada RRI (relative retention index) değerleri *n*-alkan serisi ile kıyaslanarak yapılabilir. Ticari olarak geliştirilmiş bilgisayarlı eşleştirme programları (Wiley GC/MS Library, MassFinder 3 Library) ve bilinen uçucu yağlar için oluşturulmuş, “Başer Library of Essential Oil Constituents” MS dataları da bileşenleri tanımlamak için kullanılmıştır.

2.6. SPME-GC/MS Analizi

Bu yöntemde taze bitkisel materyalin içerdiği uçucu maddeler, katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) tekniği ve GC-MS analizi ile teşhis edilmiştir. SPME analizinde çok az bir bitki materyali (5 g) tartılmış ve cam flakonlara yerleştirilmiştir.

Flakonlar parafilm ile kapatılmış ve 50°C de çalışan ısıtıcının üzerine yerleştirilmiştir. Flakonlar ısıtmaya başlanır başlanmaz SPME fiberini içeren enjektör flakona yerleştirilmiştir ve katı faz mikro ekstraksiyonun yapıldığı fiber uç açığa çıkarılmıştır. Ekstraksiyon ucunun yaklaşık olarak 5 dakika boyunca bitkinin oluşturduğu uçucu maddelere maruz kalması sağlanmıştır ardından fiber uç enjektörün içine çekilmiştir. Bu SPME enjektörü ile GC-MS cihazının “liner” kısmına enjeksiyon yapılmıştır. Sıcaklığı 250°C olan liner kısmında enjektörün ekstraksiyon ucu açığa çıkarılmış ve desorpsiyon sağlanmıştır. GC-MS analizinde Agilent 5975 GC-MSD sistemi, Innowax FSC kolonu (60 m x 0.25 mm, 0.25 µm film kalınlığı) ve helyum taşıyıcı gazı (0.8 mL/dak) akış hızı kullanılmıştır. Analiz sıcaklık programı ile yapılmıştır. Buna göre fırın 60°C’de 10 dakika tutulmuş ardından 220°C’ye 4°C/dak hızla çıkartılmış, bu sıcaklıkta 10 dakika tutulmuş ve sonra 240°C’ye 1°C/dak hızla çıkartılmıştır. Enjeksiyon splitless olarak yapılmıştır. Kütle spektrumları 70 eV enerjide ve 35-450 m/z kütle/yük oranında alınmıştır. Kromatogramlarda görülen piklerin hangi madde olduklarının belirlenmesinde relatif gecikme zamanları ve kütle spektrumlarının bilinen maddeler ile karşılaştırılması ile yapılmıştır.

Her iki yöntemle ilgili çalışmalar Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür.

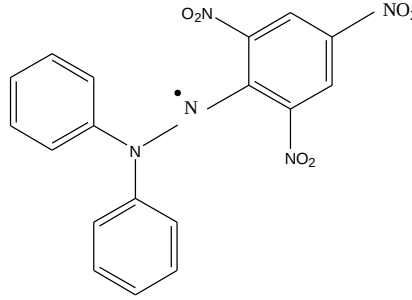
2.7. Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bitkilerden elde edilen uçucu yağların, DPPH aktivite testi, PRAP aktivite testi *L. minor* ile fitotoksik aktivite testi ve antimikrobiyal aktivite testi yapılmıştır. Bunlara ek olarak *L. ochrus* bitkisinin *n*-hekzan ve kloroform ekstraktları üzerinde de aynı aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. DPPH ve PRAP aktivite testleri, bitkinin hem hekzan, kloroform, metanol ve etilasetat ekstraktlarına, hem de uçucu yağına uygulanmıştır. Ekstrelelere tek bir konsantrasyonda (10 mg/mL) aktivite testleri uygulanmıştır. Ancak bitkinin uçucu yağına farklı konsantrasyonlarda DPPH ve PRAP aktivite testleri uygulanmıştır. 200 g bitkiden 0.01 mL’den daha az uçucu yağ elde ettiğimiz için yağı hekzanda çözüp yağ/hekzan 1% (v/v)’lik yağ çözeltisi hazırlandı ve aktivite testlerinde 1%’lik yağ seyreltilerek dört farklı konsantrasyonda

(10 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.1 mg/mL) DPPH ve PRAP aktivite testlerinde uygulandı.

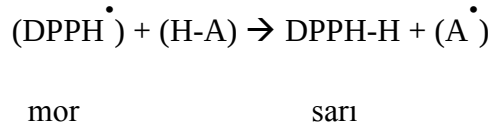
2.7.1. DPPH Aktivite Testi

DPPH kararlı bir serbest radikaldir. Yapısı şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) molekülü

Karakteristik olarak mor bir renge sahiptir ($\lambda_{\text{maksimum}}$ 515-517 nm). Uygun bir donörden hidrojen aldığında bu mor rengi kaybolur ve sarı renkli bir madde oluşur.



Çalışılan uçucu yağda, ekstrede radikal süpürücü aktivitenin varlığı bu şekilde incelenebilmektedir (Tirzitis & Bartosz 2010). DPPH serbest radikali süpürücü etkisi aktivite testleri HPTLC-DPPH yöntemine göre uygulanmıştır (Polatoğlu, 2010). Örneklerin (yağ ve ekstreler) ve pozitif kontrollerin stok çözeltileri (10 mg/mL), pozitif kontroller (α -tokoferol, BHT 2,6-bis(1,1-dimetil etil)-4-metilfenol) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) stok çözeltisi (0,1mM) metanolde hazırlanmıştır. 200 μ L stok çözeltiden alınarak, 1000 μ L DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Negatif kontrol olarak yağ/ekstre içermeyen 200 μ L metanol kullanıldı. Tüm çözeltiler bir dakika vortexte çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında karanlık ortamda bir saat bekletilerek inkübe edildi. Bu süre sonunda hazırlanan tüm çözeltiler HPTLC'de İTK plağına (2 μ L-5 mm) uygulandı ve 517 nm'de

spektroskopik tarama yapıldı. Her bir bandın absorbanası okunduktan sonra DPPH aktivitesi $\text{DPPH \%} = (A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kör}} \times 100$ formülüne göre hesaplandı.

2.7.2. Fosfomolibden İndirgenme Antioksidan Gücü (PRAP)

Bu aktivite testinde antioksidan aktivite Mo^{+6} 'nın Mo^{+5} 'e indirgenmesi sonucu oluşan fosfomolibden kompleksine göre belirlenir. Buna göre indirgen maddeler varlığında yeşil-sarı renkli olan çözelti mavi-lacivert renk almaktadır. Bu aktivite testi HPTLC'de spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Literatürdeki yöntem (Falcioni, 2002) uygulanmıştır. Hazırlanan çözeltiler (metanolde); 10% (w/v) fosfomolibdik asit stok çözeltisi, 10 mg/mL yağ/ekstre ve pozitif kontroller: α - tokoferol, BHT, gallik asit ve negatif kontrol: metanol. Fosfomolibdik asit çözeltisi örneklerle karıştırıldıktan sonra 80°C'de 30 dk süreyle inkübe edildi. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra HPTLC'de İTK plağına uygulandı. (2 μL – 5 mm) 600 nm'de elde edilen bantlar tarandı ve kontrol çözeltileri ile kıyaslandı. Negatif kontrole göre absorbansta gözlenen artış ekstrelerde bulunan antioksidan maddelerin aktivitesi olarak değerlendirildi.

2.7.3. *Lemna minor* ile Fitotoksik Aktivite Testi

Aktivite testi için su mercimeği olarak da bilinen *Lemna minor* L. bitkisi kullanılmıştır. Bu bitki hızlı bir şekilde geliştiği içine fitotoksik aktivitenin değerlendirilmesi için model organizma olarak tercih edilmektedir. *L. minor* bitkisi için literatürde verilen fitotoksik aktivite yöntemi kullanılmıştır (Einhelling et. al., 1985). Ekstre 10 mg/mL olacak şekilde hazırlandıktan sonra 10 mL'lik flakonlara 50 μL ekstre konuldu ve çözücüsünün tamamen uçması beklendi. Ardından üç adet *L. minor* bitkisi (3 yapraklı, 3 adet = 9 adet yaprak) flakonlara alındı. İçinde ekstrenin olmadığı flakonlar negatif kontrol (kör) olarak hazırlandı. Her flakona 2 mL E-medium (bitkilerin büyümesi için gerekli mineralleri içeren besiyeri) eklendi. Tüm flakonlar iklimlendirilmiş kabine yerleştirildikten sonra 1 hafta boyunca burada inkübe edildi. Bu sürenin sonunda bitkilerin yaprak sayılarındaki farklılıklar gözlemlendi. Sayımların yapıldığı flakona yerleştirilen bitkilerdeki ölü ve canlı yaprak sayısı belirlendi.

Lemna minor'ün klorofil miktarı bitki gelişiminin bir ölçütü olarak ayrıca değerlendirilmiştir. Bu nedenle, her bir flakondaki örnek, distile su ile iyice yıkanarak temizlendi. Bitkiden klorofilleri ekstrakte edebilmek için bitkilerin üzerine 96%'lık etanol (v/v) çözeltisi eklendi ve karanlıkta 48 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda her bir flakondaki çözeltinin 649 ve 665 nm'de absorbansları ölçüldü. Literatürde belirtilen yöntemle göre (Winterman & Denots, 1965) absorbanslar klorofil A, klorofil B ve toplam klorofil miktarları cinsinden hesaplandı.

$$\text{Klorofil A miktarı} \rightarrow \text{Klorofil}_A = (13.70 \times A_{665}) - (5.76 \times A_{649})$$

$$\text{Klorofil B miktarı} \rightarrow \text{Klorofil}_B = (25.80 \times A_{649}) - (7.60 \times A_{665})$$

$$\text{Toplam klorofil miktarı} \rightarrow \text{Klorofil}_{\text{Total}} = \text{Klorofil}_A + \text{Klorofil}_B$$

Formülleri ile hesaplandı. Tüm testler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

$$\text{Büyüme hızı} = (A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kör}} \times 100$$

$$\text{Büyüme oranı} = \frac{(\ln(\text{test bitimindeki yaprak sayısı}) - \ln(\text{test başındaki yaprak sayısı}))}{\text{test süresi}}$$

olarak hesaplanmıştır.

2.7.4. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal aktivite testi, 3 adet gram negatif (*Escherichia coli* NRRL B-3008; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Bacillus subtilis* NRRL B-4378), 3 adet gram pozitif (*Serratia marcescens* NRRL B-2544; *Streptococcus pyogenes* ATCC 13615; *S. epidermidis* ATCC 12228) ve 1 candida (*Candida albicans* ATCC 90028) türlerine karşı gerçekleştirilmiştir.

Lathyrus ochrus hekzan ekstresi ve kloroform ekstresi olarak iki farklı ekstre ile çalışıldı. Antimikrobiyal aktivite testleri yapılan hekzan ve kloroform ekstreleri yöntemde saf DMSO da çözüldü. Antimikrobiyal aktivite testi CLSI metoduna

(CLSI, 2007) göre yapılmıştır. Standart antimikrobiyal maddelerden ampisilin ve ketokonazol de (0.025 mg/mL) tek dozda uygulanmış ve sistem uygunluğu kontrol edilmiştir. Bu çalışma, Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3. BULGULAR

3.1. Uçucu Yağ İçeriklerinin GC/MS ve SPME-GC/MS ile Tayininden Elde Edilen Sonuçlar

Bitki uçucu yağı, hidrodistilasyon ile elde edildikten sonra GC ve GC-MS ile analiz edildi. Teşhis edilen maddeler ve rölatif miktarları Tablo 3.1’te verilmiştir. SPME tekniği ile bitkiden elde edilen uçucu maddelerin içeriği GC-MS ile analiz edildi. Teşhis edilen maddeler ve rölatif miktarları Tablo 3.3’de listelenmiştir.

3.1.1. GC/MS ile Tayin Edilen Bileşikler ve Yapıları

Tablo 3.1. *Lathyrus ochrus*⁽¹⁾ bitkisinin GC, GC-MS ile belirlenen uçucu yağ içerikleri.

Relatif Gecikme İndeksi ⁽²⁾	Bileşik	% ⁽³⁾	Analiz Metodu ⁽⁴⁾
1400	Tetradekan	0,25 ± 0,01	<i>t_R</i> , MS
1700	Heptadekan	0,12 ± 0,03	<i>t_R</i> , MS
1779	(<i>E,Z</i>)-2,4-Dekadienal	0,13 ± 0,01	MS
1800	Oktadekan	0,10 ± 0,0	MS
1868	(<i>E</i>)-Geranil aseton	0,21 ± 0,02	MS
1955	Neofitadien izomeri	3,53 ± 0,36	MS
1958	(<i>E</i>)-β-İyonon	0,85 ± 0,02	<i>t_R</i> , MS
1992	Neofitadien	1,35 ± 0,13	MS
2041	Pentadekanal	1,56 ± 0,03	<i>t_R</i> , MS
2131	Hekzahidrofarnesil Aseton	1,73 ± 0,04	MS
2296	İzofitol	0,68 ± 0,05	MS

2384	1-Hekzadekanol	1,02 ± 0.03	MS
2500	Pentakosan	4,20 ± 0.09	t_R , MS
2509	Metil linolat	0,42 ± 0.01	t_R , MS
2583	Metil linolenat	1,72 ± 0.42	t_R , MS
2622	Fitol	49,39 ± 0.44	MS
2670	Tetradekanoik asit	1,99 ± 0.06	t_R , MS
2700	Heptakosan	0,58 ± 0.0	t_R , MS
2822	Pentadekanoik asit	1,08 ± 0.12	t_R , MS
2931	Hekzadekanoik asit	20,64 ± 0.89	t_R , MS
	Toplam	91,5 ± 0.5	

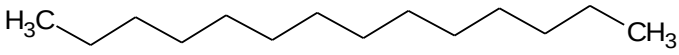
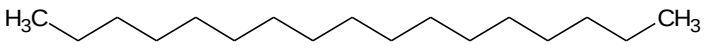
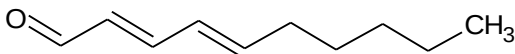
⁽¹⁾ Tüm analizler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

⁽²⁾ RRI Relatif gecikme zamanlarının *n*-alkan serisi ile karşılaştırması yapılmıştır.

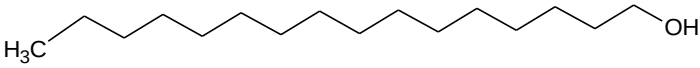
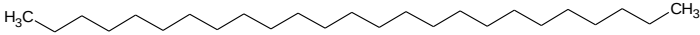
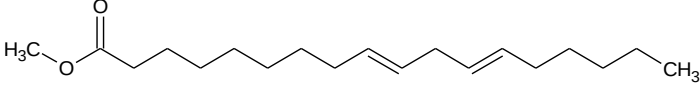
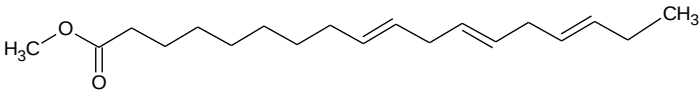
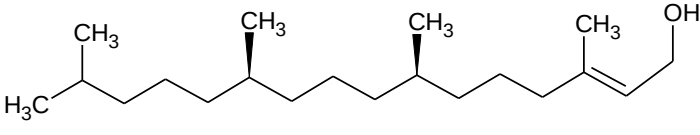
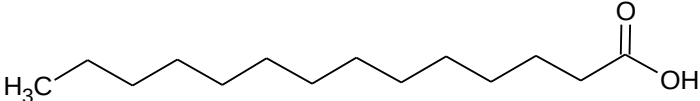
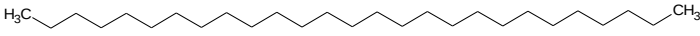
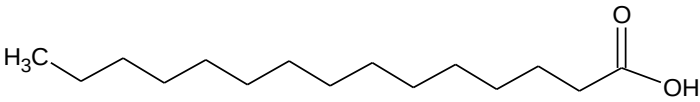
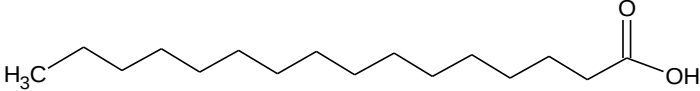
⁽³⁾ Ayrılan maddelerin % miktarları FID kromatogramlarındaki piklerin integrasyonu ile hesaplandı

⁽⁴⁾ Metot: Uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanması için relatif gecikme zamanları, orijinal örneklerin gecikme zamanları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca bilgisayarda Wiley GC-MS ve Mass Finder kütle spektrumu kütüphaneleri ve orijinal bileşikler, bilinen uçucu yağ içerikleri ve kütle spektrumu profilleri karşılaştırılarak tanımlamalar yapılmıştır.

Tablo 3.2. *Lathyrus ochrus*'un GC-MS ile tayin edilen uçucu yağ içeriğindeki bileşiklerin ve yapıları

Bileşik	Yapı
Tetradekan	
Heptadekan	
(<i>E,Z</i>)-2,4-Dekadienal	

Oktadekan	
(E)-Geranil aseton	
Neofitadien izomer	
(E)-β-Iyonon	
Neofitadien	
Pentadekanal	
Hekzahidrofarnesil Aseton	
İzofitol	

1-Hekzadekanol	
Pentakosan	
Metil linolat	
Metil linolenat	
Fitol	
Tetradekanoik asit	
Heptakosan	
Pentadekanoik asit	
Hekzadekanoik asit	

3.1.2. SPME/ GC-MS ile Tayin Edilen Bileşikler ve Yapıları

Bitkilerin SPME tekniği ile ekstraksiyonu ve GC-MS ile ilgili sonuçlar elde edilmiş ve Tablo 3.3’de listelenmiştir.

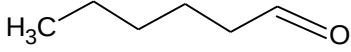
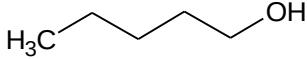
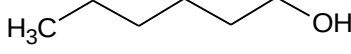
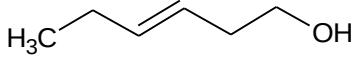
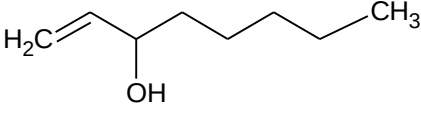
Tablo 3.3. *L. ochrus* bitkisinin SPME/GC-MS yöntemi ile belirlenen uçucu yağ içerikleri

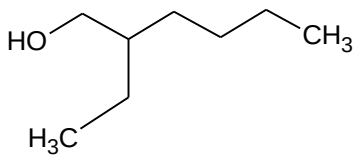
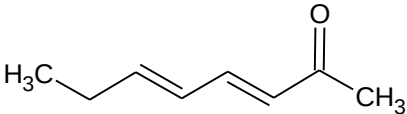
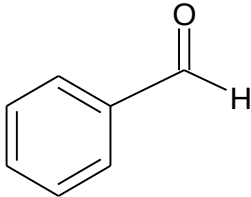
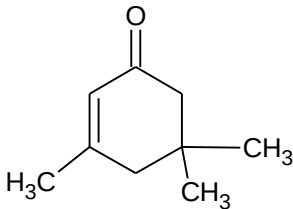
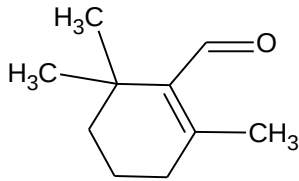
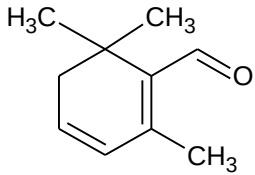
6772 – <i>L. ochrus</i> – SPME/GC-MS		
Relatif Gecikme İndeksi	Teşhis Edilen Madde	(%)
1093	Hekzanal	7,0
1260	1-Pentanol	1,7
1360	1-Hekzanol	2,5
1391	(Z)-3-Hekzen-1-ol	1,2
1452	1-Okten-3-ol	2,3
1496	2-Etil hekzanol	0,4
1520	3,5-Oktadien-2-one	1,8
1541	Benzaldehit	3,6
1601	Teşhis Edilemeyen Madde*	14,8
1600	İzoforon	1,1
1638	β -Siklositral	2,4
1661	Safranal	1,3
1661	2-Metil bütanoik asit	7,2
1703	6-Oksoizoforon	0,9
1751	Karvon	0,4
1871	Hekzanoik asit	1,9
1896	Benzil alkol	3,4
1958	(E)- β -İyonon	3,3
2009	trans- β -İyonon-5,6-epoksit	1,0

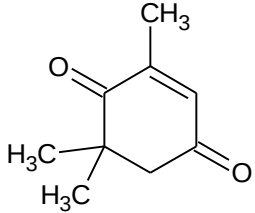
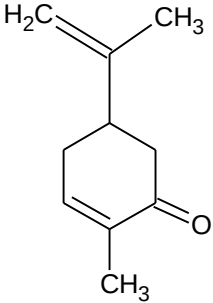
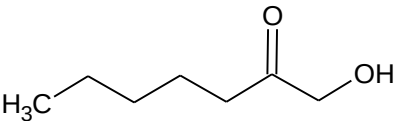
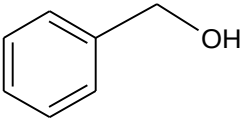
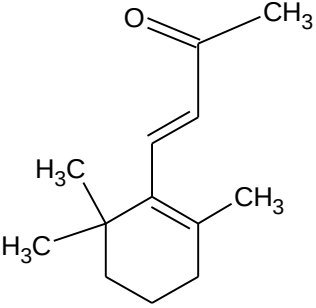
2084	Oktanoik asit	3,6
2192	Nonanoik asit	3,9
2308	Metildihidrojasmonat	1,0
2380	Dihidroaktinidiolit	1,3
2503	Dodekanoik asit	4,4
Toplam		72,4

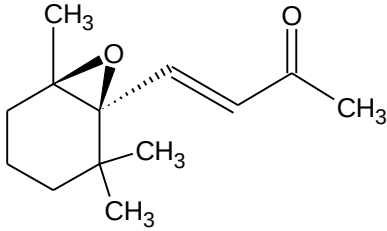
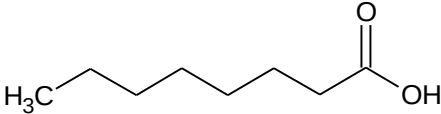
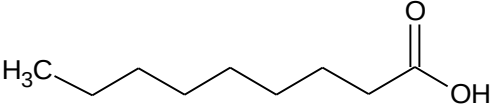
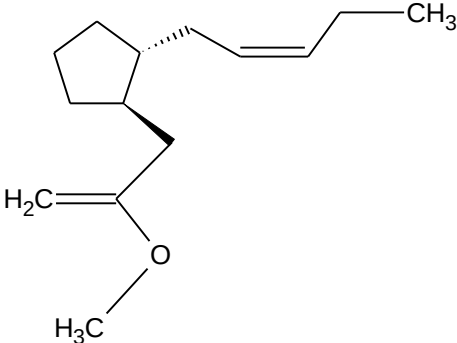
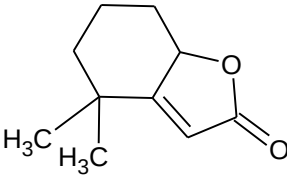
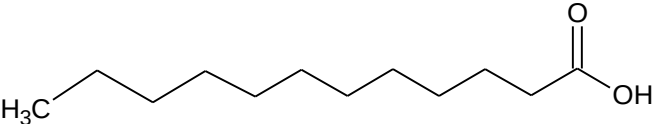
*Maddenin ne olduğu teŖhis edilemedi. EIMS, 70 eV, m/z (rel. .int.): 156[M]+(2), 128(27), 113(5), 110(33), 95(52), 85(19), 84(15), 71(100), 69(11), 58(36), 55(17), 53(5), 43(50).

Tablo 3.4. *Lathyrus ochrus*'un SPME/GC-MS ile tayin edilen uçucu yağ içeriğindeki bileŖikler ve yapıları

BileŖik	Yapı
Hekzanal	
1-Pentanol	
1-Hekzanol	
(Z)-3-Hekzen-1-ol	
1-Okten-3-ol	

2-Etil hekzanol	
3,5-Oktadien-2-on	
Benzaldehit	
İzoforon	
β -Siklositral	
Safranal	

6-Oksoizoforon	
Karvon	
Hekzanoik asit	
Benzil alkohol	
(<i>E</i>)- β -Iyonon	

<i>Trans</i>-β-iyonon-5,6-epoksit	
Oktanoik asit	
Nonanoik asit	
Metildihidrojasmonat	
Dihidroaktinidiolit	
Dodekanoik asit	

3.2. *L. ochrus* ekstralarının DPPH ve PRAP aktivite test sonuçları

L. ochrus ekstralarının DPPH süpürücü aktivite test sonuçları Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.5. *L. ochrus* Ekstrelerinin (10 mg/mL) %DPPH Süpürücü Aktiviteleri

Örnek	% DPPH Süpürücü Aktivite
<i>A</i> -Tokoferol (pozitif kontrol)	85.59 ± 0.2831
BHT (pozitif kontrol)	88.41 ± 0.2464
Metanol Ekstresi	77.07 ± 0.5051
Etil asetat Ekstresi	41.21 ± 1.3664
Kloroform Ekstresi	-
Hekzan Ekstresi	10.28 ± 0.8110

¹ ortalama ± standart sapma ($n = 5$)

L. ochrus ekstralarının PRAP aktivite test sonuçları Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.6. *L. ochrus* Ekstrelerinin (10 mg/mL) PRAP aktiviteleri

Ekstrenin Adı	600 nm’de Pik Yüksekliği
α -Tokoferol (Pozitif kontrol)	838.98 ± 1.74 ¹
BHT (Pozitif kontrol)	753.45 ± 3.86
Gallik Asit (Pozitif kontrol)	784.95 ± 1.63
Metanol (Negatif kontrol)	33.19 ± 1.97
Hekzan Ekstresi	385.6 ± 1.84
Kloroform Ekstresi	603.65 ± 5.59
Etil asetat Ekstresi	455.53 ± 1.96
Metanol Ekstresi	248.80 ± 8.82

¹ ortalama ± standart sapma ($n = 5$)

3.3. *L. ochrus* uçucu yağının DPPH ve PRAP aktivite test sonuçları

L. ochrus uçucu yağının PRAP ve DPPH aktivite test sonuçları Tablo 3.7 ve Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.7. *L. ochrus* uçucu yağının PRAP aktivite test sonuçları

	PRAP Aktivitesi (AU)		
	yağ	α - tokoferol	BHT
10 mg/mL	593.87 $\pm$ 5.14e	837.03 $\pm$ 1.38a	819.7 $\pm$ 2.10b
1 mg/mL	266.73 $\pm$ 5.08h	663.47 $\pm$ 2.60c	622.73 $\pm$ 1.64d
0.5 mg/mL	187.27 $\pm$ 3.8j	554.67 $\pm$ 7.17f	502.8 $\pm$ 4.46g
0.1 mg/mL	71.27 $\pm$ 1.14k	271.10 $\pm$ 2.86h	210.53 $\pm$ 1.81i
Kör (metanol)	48.43 $\pm$ 0.341		

1. Sonuçlar; Absorbans $\pm$ standart sapma (5 tekrarlı) şeklinde verilmiştir. (absorbanslar TLC densimetrik ölçümüne göre, absorbans birimine (AU) göre verilmiştir.
2. Uçucu yağın stok çözeltileri hazırlanırken 1% lik (yağ/*n*-hekzan; v/v) yağ çözeltilisi (metanolde) seyreltilerek hazırlanmıştır.
3. 10 mg/mL; çözeltili 1 mL’de 100 μ g saf yağ içermektedir.
4. 1 mg/mL; çözeltili 1 mL’de 10 μ g saf yağ içermektedir.
5. 0,5 mg/mL; çözeltili 1 mL’de 5 μ g saf yağ içermektedir.
6. 0,1 mg/mL; çözeltili 1 mL’de 1 μ g saf yağ içermektedir.

Tablo 3.8. *L. ochrus* uçucu yağının DPPH aktivite testi sonuçları

	DPPH Süpürücü Aktivite (%)		
	Yağ	α - tokoferol	BHT
10 mg/mL	9.28 $\pm$ 1.30 ef	89.13 $\pm$ 0.54 b	90.81 $\pm$ 0.35a
1 mg/mL	0.40 $\pm$ 0.14g	89.66 $\pm$ 0.30b	88.92 $\pm$ 0.17b
0.5 mg/mL	0.01 >>	60.15 $\pm$ 0.38c	45.36 $\pm$ 0.54d
0.1 mg/mL	0.01 >>	9.74 $\pm$ 0.21e	7.79 $\pm$ 0.26f
Kör (metanol)	48.43 $\pm$ 0.341		

1. Sonuçlar; Absorbans $\pm$ standart sapma (5 tekrarlı) şeklinde verilmiştir. (absorbanslar TLC densimetrik ölçümüne göre, absorbans birimine (AU) göre verilmiştir.
2. Uçucu yağın stok çözeltileri hazırlanırken 1% lik (yağ/n-hekzan; v/v) yağ çözeltisi (metanolde) seyreltilerek hazırlanmıştır.
3. 10 mg/mL; çözelti 1 mL’de 100 μ g saf yağ içermektedir.
4. 1 mg/mL; çözelti 1 mL’de 10 μ g saf yağ içermektedir.,
5. 0,5 mg/mL; çözelti 1 mL’de 5 μ g saf yağ içermektedir.
6. 0,1 mg/mL; çözelti 1 mL’de 1 μ g saf yağ içermektedir.

3.4 *L. ochrus* Ekstrelerinin *Lemna minor* üzerindeki fitotoksik aktiviteleri

Tablo 3.9. *L. ochrus* Ekstrelerinin (10 mg/mL) *Lemna minor* üzerindeki fitotoksik aktiviteleri

Ekstre Adı	Aplikasyon Hacmi	%Fitotoksik Aktivite	Büyüme Hızı
Hekzan	100 μ L	5.23 $\pm$ 1.63 ¹	0.0941 $\pm$ 0.0025
Kloroform	100 μ L	58.36 $\pm$ 3.55	0.0100 $\pm$ 0.0087

¹ ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$)

3.5 *L. ochrus* ekstrelerinin uygulanmasından sonra tek bir 3 yapraklı *Lemna minor* bitkisindeki Klorofil A, Klorofil B ve Toplam Klorofil miktarları (μ g) ile İlgili Sonuçlar

Tablo 3.10. *L. ochrus* ekstrelerinin uygulanmasının (10 mg/mL) ardından tek bir 3 yapraklı *Lemna minor* bitkisindeki Klorofil A, Klorofil B ve Toplam Klorofil miktarları (μ g).

Ekstre Adı	Applikasyon Hacmi	Klorofil A ¹	Klorofil B ²	Toplam Klorofil ³
Hekzan	100 μ L	4.51 $\pm$ 0.54 ⁴	6.00 $\pm$ 0.57	10.51 $\pm$ 1.08
Kloroform	100 μ L	0.69 $\pm$ 0.02	1.64 $\pm$ 0.03	2.33 $\pm$ 0.01

¹ Klorofil A miktarı; ² Klorofil B miktarı; ³ Toplam Klorofil miktarı Klorofil A + Klorofil B; ⁴ ortalama $\pm$ standart sapma ($n = 3$)

3.6. *L.ochrus* Ekstrelerinin farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri

Tablo 3.11. *L. ochrus* ekstrelerinin (10 mg/mL) farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri

Mikroorganizma	Kloroform	Hekzan
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Pseudomonas</i>	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+
<i>Streptococcus</i>	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+

¹ Ön aktivite çalışmasında aktiviteye rastlandı “+”.

² Ön aktivite çalışmasında aktiviteye rastlanmadı “-”

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda, KKTC'nin batısında bulunan Güzelyurt bölgesinden, 18.03.12 tarihinde çiçekli bir şekilde toplanmış, *Lathyrus ochrus* bitkisi kullanıldı. Bitkiye, hidrodistilasyon ve SPME teknikleri uygulanarak uçucu yağ ve diğer uçucu bileşenleri elde edildi. GC ve GC-MS analiz yöntemleri kullanılarak elde edilen uçucu yağ ve diğer uçucu bileşenlerin içerikleri araştırıldı. Uçucu yağda 20 madde tayin edildi. Bitkinin uçucu yağında genel olarak diterpenler (54.9%), monoterpenler (1.0%), seskiterpenler (1.8%), yağ asitleri ile esterler (33.8%) bulunduğu gözlemlendi. Diterpenler, fitol (49.4%), isofitol (0.7%) ve neofitadien ile izomerinden (4.8%) oluşmaktadır. Yağ asitleri ve esterler ise, hegzadekanoik asit (20.6%), pentakosan (4.2%), tetradekanoik asit (2.0%) ve metil linolat (1.7%) bileşiklerinden oluşmaktadır. *Lathyrus ochrus* bitkisinin uçucu yağında fitol bileşiğinin temel bileşen olduğu görülmektedir. Literatürdeki sonuçlarla elde edilen sonuçlar kıyasladığında daha önceki çalışmalarda diterpenler veya fitol, uçucu yağın temel bileşeni olarak bildirilmemiştir. Bunun aksine seskiterpenler ve yağ asidi türevleri *Lathyrus rotundifolius* ve *Lathyrus vernus* bitkilerinin uçucu yağlarında temel bileşenler olarak bildirilmiştir (İskender ve ark., 2009; Tajbakhsh ve ark., 2008).

Sonuç olarak *Lathyrus ochrus* bitkisinin iyi bir fitol kaynağı olduğu görülmektedir. Fitol, α -tokoferol (vitamin E) (Netscher, 2007) ve filokinin (vitamin K1) (Danes, Payne, Humphries&Abell, 2003) sentezinde kullanılabilir. Aynı zamanda kozmetik ürünleri, oda spreyleri ve temizlik malzemelerinde de yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (McGinty, Letizia & Api, 2000). Fitol, Refsum hastalığına sahip bireylerce yüksek dozda kullanıldığında birçok yan etkisi gösterdiği bilinmektedir. Bunlar arasında kaslarda dengesizlik, koku alamama, duyma kaybı gibi çoklu sinir sistemi bozuklukları sıralanabilir. Refsum hastalığına (fitanik asit depo hastalığı) ait bu belirtiler nedeniyle bu tip hastaların fitol içeren gıdalar tüketmemesi önerildiği bildirilmiştir (Wierzbicki, 2007). Fitolün yüksek dozda kullanılması insanlarda olduğu gibi hayvanlarda da olumsuz sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (Steinberg ve ark., 1966). Tüm bu olumsuz etkilerinin yanında saf fitolün iltihap önleyici (Silva ve ark, 2013) ve ağrı önleyici (Santos ve ark, 2013) özellikleri de rapor edilmiştir.

Bitkinin uçucu yağ ve uçucu sekonder metabolitlerinin analizlerinde GC/GC-MS ve SPME/GC-MS kullanılmıştır. Her iki yöntemle de farklı bileşik gruplarının tayin edilmesi beklenen bir durumdur. Çünkü SPME tekniği ile uçucu maddeler elde edilirken düşük sıcaklıklarda (50°C) ekstraksiyon yapılmıştır. Hidrodistilasyonda ise su ile beraber bitkisel materyal kaynatıldığı için 100°C civarında uçucu yağlar elde edilmiştir. Kondenzasyon işlemi sırasında çok uçucu özellikteki bazı maddelerin kayıp edilmesi hidro distilasyon işleminde mümkündür. Bu nedenle farklı sıcaklıkta buharlaşabilen maddeleri analiz edebilmek için farklı yöntemler kullanılmıştır.

Çalışmamızda, *Lathyrus ochrus* bitkisinin uçucu yağında ve ekstralarında çeşitli fitokimyasal ve biyolojik testler uygulanmıştır. Antioksidan aktivite tayini için, DPPH aktivite testi ve PRAP aktivite testi uygulanmıştır. Pozitif kontroller referans alınarak test sonuçları incelendiğinde, bitkinin metanol, etilasetat, kloroform ve hekzan ekstralarının DPPH süpürücü aktivitesi ve PRAP aktivitesi olmadığı görülmüştür. DPPH aktivite testinde pozitif kontroller yaklaşık olarak 85% civarı aktivite gösterirken, buna en yakın sonuç olarak metanol ekstresi 77% oranında aktivite göstermiştir. PRAP aktivite testinde ise en yüksek aktiviteyi kloroform ekstresi göstermiştir. Ancak örneklerin absorbansı aynı konsantrasyondaki pozitif kontrollerin 600 nm'deki absorbanlarına göre çok düşük kaldığı için bitkinin herhangi bir ekstresinde PRAP aktivitesine rastlamadığı görülmektedir.

Çalışmamızda *Lathyrus ochrus* bitkisinin uçucu yağında, DPPH ve PRAP aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. Uçucu yağ, bitkiden düşük verimle elde edildiği için aktivite testinde kullanılan çözelti hazırlanırken elde edilen yağ 1 mL hekzanda çözünerek hazırlanmıştır. Bu nedenle farklı konsantrasyonlarda elde edilen çözelti dilüsyonları belirtilen konsantrasyonlardan çok daha az yağ içermektedir.

1% lik çözeltiden elde edilen dilüsyonların aktivitesi ile pozitif kontrollerin aktivitesi kıyaslandığında, düşük aktivite gösterdiği söylenebilir. Ancak stok çözeltinin seyreltik bir çözelti olduğunu göz önünde bulundurarak gerçek konsantrasyonlar hesaplandığında hazırlanan en yüksek konsantrasyondaki yağ dilüsyonun en düşük konsantrasyondaki pozitif kontrollerle aynı aktiviteyi gösterdiğini söyleyebiliriz. Yapılan çalışmalarda saf fitol maddesinin hidroksil (OH[•]), nitrik oksit (NO[•]) radikallerinin ve tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin (TBARS)

oluşumun engellediği oluşumun *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bu çalışmalarda fitol'ün yüksek antioksidan ve radikal süpürücü özelliği olduğu belirtilmiştir (Santos vd., 2013).

Fitotoksik aktivite ise, *L. minor* bitkisinin test maddeleri varlığında ve yokluğunda gelişimi incelenerek belirlenmiştir. Bitki gelişmesinin kriteri olarak bitkinin oluşturduğu yaprak sayısı ve klorofil miktarı ele alınmıştır. Sonuçlardan görüldüğü gibi yaprak sayısı ele alındığında en yüksek büyüme inhibasyonunu kloroform ekstresinin yaptığı görülmektedir. Klorofil miktarlarına bakıldığında aynı ekstrenin uygulandığı gruptaki *L. minor* bitkilerinin en düşük klorofil miktarına sahip olduğu görülmektedir. Dolayısıyla en düşük bitki gelişme (büyüme) hızı kloroform ekstresinin tatbik edildiği grupta olduğu anlaşılmaktadır. Sonuçlar kloroform ekstresinde bitki gelişimini inhibe eden fitotoksik maddeler olduğunu işaret etmektedir.

Son olarak *Lathyrus ochrus* bitkisinin kloroform ve hekzan örneklerinin belirli konsantrasyonda (10 mg/mL)¹, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pyogenes*, *S. epidermidis* ve *Candida albicans* türü bakterilerine karşı aktif olduğu gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, *Lathyrus ochrus* bitkisinin uçucu sekonder metabolitleri hakkında yaptığımız çalışmaların sonuçları verilmiştir. Bu konuda daha önce KKTC’de veya başka bir ülkede aynı içerikte bir çalışma yapılmamıştır.

Uçucu yağ içeriği incelenirken iki yöntem kullanılması (GC/GC-MS ve SPME/GC-MS) aynı bitkide bulunan farklı buhar basıncına sahip bileşikleri tayin edebilmemize olanak sağlamıştır. GC/GC-MS yönteminde hidrodistilasyon ile 100°C’nin üzerinde uçucu hale gelmiş bileşenler tayin edilmiştir; SPME tekniği ile düşük sıcaklıklarda uçucu olan maddeler de tayin edilmiştir.

Sonuç olarak sekonder metabolitlerden fitolun, *Lathyrus ochrus* bitkisinde 49,4% oranında bulunduğu görülmüştür. Fitol, yüksek dozlarda kaslarda dengesizlik, koku alamama ve duyma kaybı gibi çeşitli sinir sistemi bozukluklarına sebep olmaktadır. Tüm bu belirtiler Refsum hastalığının semptomları olduğundan *Lathyrus ochrus* bitkisinin bu hastalığa sahip kişilerce fazla tüketiminin riskli olabileceğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, hem bitki ekstraktlarına hemde uçucu yağa uygulanan çeşitli aktivite testlerine de yer verildi. Sonuçta bitkinin ekstraktlarında, DPPH süpürücü etkisi ve PRAP aktivitesi gözlenmezken uçucu yağda yüksek aktivite gözlenmiştir. Çalışmanın devamı olarak, *Lathyrus* türlerinde bulunan ve “*Latirizm*” adı verilen hastalığın ortaya çıkmasına sebep olan ODAP’ın *Lathyrus ochrus* bitkisinde üretilip üretilmediğinin ve miktarlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yaptığımız aktivite testlerinden fitotoksik aktivite bize çok anlamlı sonuçlar sağlamıştır. Bitkinin kloroform ekstresinin yaklaşık 50% oranında fitotoksik aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Ancak uçucu yağ eldesinde yağ verimi iyi olmadığından bu aktivite testi direkt uçucu yağa uygulanamamıştır. Çalışmanın devamında bu sonuçları da eklemek daha anlamlı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Adamovics, J.A.(1997). Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals, Marcel Dekker, New York.

Araujo, H.C., Lacerda, M.E.G., Lopes, D., Bizzo, H.R. ve Kaplan, M.A.C., 2007, Studies On The Aroma Of Mate (*Ilex paraquariensis* St.Hil.) Using Headspace Solid-Phase Microextraction. *Phytochemical Analysis*. 18, 469-474.

Arthur ve Pawliszyn,1990, *Anal. Chem.* 62, pages 2145-2148.

Akihisa, T.; Nishimura, Y.; Roy, K.; Ghosh, P.; Thakur, S.; Tamura, T. Sterols of three Leguminosae seeds: Occurrence of 24 α -ethyl-5 α -cholest-9(11)-en-3 β -ol and both C-24 epimers of 24-ethylcholesta-5,25-dien-3 β -ol. *Phytochemistry*. 30, 12, 4029-4032 (1991).

Allkin, R., T.D. Macfarlane, R.J. White, T.A. Bisby and M.E. Adey. 1983. Names and Synonyms of Species and Subspecies in The Viciae Issue 2. Viciae Database Project, Publication No. 2, Southampton.

Ames, B. M., Shigena, M. K., Hagen, T. M., 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of national Academy of Sciences USA*, 90, 7915-7922.

Aruoma, O. I. and Cuppett, S. L., 1997. Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. AOCS Press, p 241.

Bardocz, S., Grant, G., Brown, D.S., Duguid, T.J., Pusztai, A. and Pryme, I.F., 1995, Effect of PHA on intestinal cell proliferation and tumor growth: role of polyamines, Abstracts of the 16th International Lectin Meeting, p.49.

Başer, K.H.C., Kırimer, N., Koşar, M., Tunalier, Z, 2005, Bitkisel drogların kimyasal incelenmesi, Farmakognozi III Uygulamaları El Kitabı, Eskişehir, 13-15.

Başer, K.H.C.,2006, Aromatic plants as a source of botanicals, Acta Horticulturae, 720, 27-33 .

Baydar, H., 2005. Yayla kekigi (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. P. H. Davis)'nde farklı toplama zamanlarının uçucu yağ içeriği ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkisi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 18(2):175-178.

Berlett, B. S. and Stadtman, E. R., 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stres. The Journal of Biological Chemistry, 272, 20313- 20316.

Breitmeier, E., “Terpenes: Flavours, Fragrances, Pharma, Pheromones”, Wiley-VCH, 1-2, (2006)

Campbell, C.G., 1997. Grass pea. *Lathyrus sativus* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 18. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. Cronquist, A., 1968, The evolution and classification of flowering plants, London.

Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3426-3431.

Çelik, E. ve Çelik, G.Y., 2007. Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyel özellikleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 05(2):1-6.

CLSI, M100-S17. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement, Clinical and Laboratory Standards Institute, 27 (1).

Cram, D.J. ve Hammond, G.S., 1964, Organic Chemistry. New York: McGraw-Hill Book Company, 671-673

Cronquist, A. 1968; The Evolution and Classification of Flowering Plants, London.

Davis, P.H. 1970. Flora Of Turkey and East Aegean Islands. Vol. 3, 328-369, Edinburgh.

Dewick, P. M., 2001, Medical Natural Products “A Biosynthetic Approach”, Second Edition, John Wiley&Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G.: J. Appl. Microbiol. 88, 308-316 (2000).

Duranti, M., 2006, Grain legume proteins and nutraceutical properties, Fitoterapia, 77, 67-82.

Finar, J.L., D.Sc, Ph.D.,ARIC, Organic Chemistry, Vol.2, Chp:8, "Stereochemistry and The Chemistry of Natural Products", Longman, Fifth Edition, (1975), p:354358,440-441,451,459.

Fischer, N.H., Jeffrey, D.W., James, L.R., Leovigildo, Q., Marias, A.M., Stimulation of witchweed germination by sesquiterpene lactones: a structureactivity study, Phytochemistry, 29, 8, 2479-2483 (1990).

Frankel, E.N. and Meyer, A.S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, J. Sci. Food Agr., 80, 1925-1941, 2000.

Fuchs, A.; De Vries, F.W.; Landheer, C.A.; Van Veldhuizen, A. Odoratol and methylodoratol, two α -hydroxydihydro-chalcone stress metabolites from *Lathyrus odoratus*. Phytochemistry. 23, 10, 2199-2201 (1984).

Galipo, R. C., Canhoto, A. J., Walla, M.D., Morgan, S. L., 2002 Analysis Of Volatile Fragrance And FlavorCompounds By Headspace Solid Phase Microextraction Combined With Gas Chromatography/Mass Spectrometry. An instrumental analysis experiment. University of South Carolina.

Geisman, T.A. ve Crout, D.H.G., 1969. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. California: Freeman, Cooper and Company, 4, 66, 67, 137-166, 212, 213, 217.

Gepts, P., Beavis, W.D., Brummer, E.C., Shoemaker, R.C., Stalker, H.T., Weeden, N.F. and Young, N.D., 2005, Legumes as a model plant family, Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference, Plant Physiology, 137, 1228-1235.

Grassmann, J. ve Elstner, E.F., 2003. Essential Oils/properties and uses. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition (Elsevier Science Ltd.): 2177-2184.

Gören, A.,C., 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 (2002).

Guenther, E., 1948. The Essential Oils, Vol. 1-6, Robert E. Krieger Publishing Co., Inc., Malabar, Florida.

Gülçin, Ğ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. Ğ., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, Food Chemistry, 83, 371-382.

Hanbury, C.D., White, C.L., Mullan, B.P., Siddique, K.H.M., 2000, A review of the

potential of *Lathyrus sativus* L. and *L. cicera* L. grain for use as animal feed, *Animal Feed Science and Technology*, 87, 1-27.

Harrison, F.L.; Nunn, P.B.; Hill, R.R. Synthesis of α - and β -N-Oxalyl-L- α,β -diaminopropionic acids and their isolation from seeds of *Lathyrus sativus*. *Phytochemistry*. 16, 1211-1215 (1977).

Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53; 1841-1856.

Ichimura, K.; Kohata, K.; Mukasa, Y.; Yamaguchi, Y.; Goto, R.; Suto, K. Identification of L-bornesitol and changes in its content during flower bud development in sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.). *Biosci. Biotech. Biochem.* 63, 1, 189-191 (1999).

Iskender, N. Y., Yaylı, N., Yasar, A., & Çoskunçelebi, K. (2009). Volatile constituents of the flower, leaf and stem of *Lathyrus vernus* (L.) grown in Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 21(8), 6290-6294.

İşcan, G., Demirci, F., Kırimer, N., Kürkçüoğlu, M., Baser, K.H.C., Kıvanç, M., 2002. Bazı Umbelliferae türlerinden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyel etkileri.

Jackson, M.T and A.G. Yunus. 1984. Variation in the grass pea (*Lathyrus sativus* L) and wild Species. *Euphytica* 33: 549-559.

J. Chrtek & B. Slavík, Contribution to the flora of Cyprus in *Preslia* 53. 1981

King, S.S.; Ahn, B.T.; Kim, J.S.; Bae, K. *Lathyrus* saponin, a new trisaccharide glycoside from *Lathyrus japonicus*. *J. Nat. Prod.* 61, 299-300 (1998).

Krstuvolic, A.M., Brown, P.R., 1982, "Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Theory, Practice and Biomedical Applications.

Kumar, B., Chobra, K. H., (2005), Biogenesis of Natural Products, Alfa Sciences International Ltd.

Kürkçüoğlu, M. , Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No :2100, Açık Öğretim Fakültesi Yayını No : 1130, Eskişehir, 2010

Lahlou, M. (2004) Essential Oils and Fragnance Compounds: Bioactivity and Mechanisms of Action.Flavour and Fragnance Journal, 19 159-165.

Larson, R. A., 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry; 27, 969–978.

Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005, Legumes of the World, Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Linkens, H.,F., Jackson, J.F Linkens, H.,F., Jackson, J.F., 1997a Modern Methods of Plant Analysis, Vol.19: Plant Volatile Analysis, Springer, Germany.

Linkens, H.,F., Jackson, J.F, 1997b Modern Methods of Plant Analysis, Vol.12: Essential Oils and waxes, Springer, Germany.

Markham, K.R.; Hammett, K.R.W.; Ofman, D.J. Floral pigmentation in two yellow-flowered *Lathyrus* species and their hybrid. Phytochemistry. 31, 2, 549-554 (1992).

Markham, K.R.; Hammet, K.R.W. The basis of yellow coloration in *Lathyrus aphaca* flowers. Phytochemistry. 37, 1, 163-165 (1994).

Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J. Sci.Technol., 26 (2), 211- 219, 2004.

Netscher T., 2007. Synthesis of Vitamin E. Vitam. Horm.76, 155-202.

Oskay, D., Oskay, M., Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoteknolojik Önemi, e-Journal of New World Sciences Academy, volume:4, no:2, article number, 5A006, 2009.

Özgüven, M. ve Kırıcı, S., 1999. Farklı ekolojilerde Nane (*Mentha*) türlerinin verim ile uçucu yağ oran ve bileşenlerin araştırılması. Tr. J. of Agriculture and Forestry. 23:465-472.

Polatoğlu K., Baser K.H.C., Gören N., Demirci B., Demirci F. Antibacterial activity and the variation of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. essential oils from Turkey, Journal of Oleo Science Vol.59, No.4 (2010)

Porter, A.E.A., Gri, D., W., Robertsonb, G.W.,Sextona, R., 1999, Floral volatiles of the sweet pea *Lathyrus odoratus*, Phytochemistry, 51 (1999) 211±214.

Pratt, D. E., Hudson, B. J. F., 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants.; Hudson B.J.F., Ed.; Elsevier; Amsterdam, pp 17-192.

Reynaud, J.; Ismaili, A.; Jay, M. Flavonoid glycosides of *Lathyrus pratensis* (Leguminosae). *Phytochemistry*. 20, 8, 2052-2053 (1981).

Robeson, D.J.; Ingham, J.L. New pterocarpan phytoalexins from *Lathyrus nissolia*. *Phytochemistry*. 18, 1715-1717 (1979).

Rosa, M.J.S., Ferreira, R.B. and Teixeira, A.R., 2000, Storage proteins from *Lathyrus sativus* seeds, J. Agric. Food Chem, 48, 5432-5439.

R. D. Meikle, Flora of Cyprus 1. 1977

Sales, M.P., Gerhard, I.R., Grossi-de-Sa, M.F. and Xavier-Filho, J., 2000, Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids, Plant Physiology, 124, 515-522.

Santos, C. C. D. M. P., Salvadori, M. S., Mota, V. G., Costa, L. M., de Almeida, A. A. C., de Oliveira, G. A. L., ... & de Almeida, R. N. (2013). Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. Neuroscience journal, 2013.

Scalzo, R.L., Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid, Food Chem., 107, 40–43, 2008.

Sewell, P.A., Clarke, B., Chromatographic Separation, Crown Copyright, UK (1987).

Silva, R.O., Sousa, F.B.M., Damasceno, S.R.B., Carvalho, N.S., Silva, V.G., Oliveira, F.R. M.A., Sousa, D.P., Aragão, K.S., Barbosa, A.L.R., Freitas, R.M., Medeiros, J.V.R., 2013. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. Fund. Clin. Pharmacol. doi: 10.1111/fcp.12049.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition.

Summerfield, R.J. and Roberts, E.H., 1985, *Grain legume crops*, Collins Pub., London, UK.

Tanker, M., Tanker, N., 1985, Uçucu yağlar, Farmakognozi Cilt 2, Ankara Üniversitesi.

Tajbakhsh M., Khalilzadeh M.A., Dabiri H.A., 2008. Volatile constituents of *Lathyrus rotundifolius* Willd. and *Trifolium mazanderanicum* Rech. F. Two Papilionaceae herbs growing wild in Iran. J. Essent. Oil Res. 20, 119-121.

Thapa, B.B., Extraction of essential oil, National Workshop on Chemical Investigation and Processing of Aromatic Plants, Nepal, 71-81 (1989).

Tutin. T. G. 1981. Flora of Europea. Vol.2,Cambridge Univ.Pres, 136-145.

Türkmen Z., Mercan S., Cengiz S., "An HPTLC Method for the Determination of Oleandrin in Nerium Plant Extracts and Its Application to Forensic Toxicology", JPC-JOURNAL OF PLANAR CHROMATOGRAPHY-MODERN TLC, vol.26, pp.279-283, 2013.

Uçan, F., 2008. DL-Limonenin mayalar üzerine antifungal etkisi. Ç.Ü., Fen Bil. Enst.,Biyoteknoloji ABD., Yüksek lisans tezi. Adana. 62 s.

Udayama, M.; Ohkawa, M.; Yoshido, N.; Kinjo, J.; Nohara, T. Structures of three new oleanene glucuronides isolated from *Lathyrus palustris* var. *pilosus* and hepatoprotective activity. Chem. Pharm. Bullet. 46, 9, 1412-1415 (1998).

Urga, K., Fite, A., Kebede, B., 1995. Nutritional and antinutritional factors of grasspea (*Lathyrus sativus*) germplasms. Bull. Chem. Soc. Ethiopia 9:9-16

Uzun, B., Genç, H., 2001. Bazı *Lathyrus* L. türlerinin dış morfolojik ve karyolojik özellikleri. S.D.Ü. Fen Bil. Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Wang F., Chenb X., Chena Q., Qinb X., Zhixiao L. Determination of neurotoxin 3-N-oxalyl-2,3-diaminopropionic acid and non-protein amino acids in *Lathyrus sativus*

by precolumn derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. J Chromatogr A.2000;883: 113–118.

Wijesekera, R.O.B., Practical manual on the essential oils industry, agrotechnology, Processing, Quality Assesment, UNIDO, 100-121 (1993).

Wink M. 1999, Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: "Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology". Annu Plant Rev, Volume 3, Sheffield Academic Press and CRC Press, pp. 1-16.

Vas, G., Vekey, K., 2004, Solid-Phase Microextraction: A powerful Sample Preparation Tool Prior To Mass Spectrometric Analysis. J.of Mass Spectrometry, 39:233-254.

Viney, D.E., An illustrated Flora of North Cyprus, Koeltz Publishing, (1994).

Yamamoto, K., Fujiwara, T. VE Blumenreich, D.I. (1984) , Karyotypes and morphological characteristics of some species in the genus *Lathyrus L.*, Japan, J. Breed, 34:273-284.