



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

***Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflous* UÇUCU
YAĞ BİLEŞENLERİNİN SPME-GC-MS-FID
YÖNTEMİYLE AYDINLATILMASI VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ**

İrem KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Ahmet YAŞAR

TRABZON - 2014

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Doç. Dr. Ahmet YAŞAR

Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi İrem KURT' un hazırladığı '*Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflous* Uçucu Yağ Bileşenlerinin SPME-GC-MS-FID Yöntemiyle Aydınlatılması ve Antimikrobiyal Aktiviteleri' başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Ahmet YAŞAR

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ahmet YAŞAR

Doç. Dr. Miraç OCAK

Yrd. Doç. Dr. Fatma AĞIN

Tarih:

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun / / tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Yüksek Lisans Tez çalışmamın KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallarına bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

21/05/2014

İrem KURT

TEŞEKKÜR

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflous* Uçucu Yağ Bileşenlerinin SPME-GC-MS-FID Yöntemiyle Aydınlatılması ve Antimikrobiyal Aktiviteleri adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Danışmanlığımı üstlenen, çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren, araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen başta sayın hocam Doç. Dr. Ahmet YAŞAR olmak üzere analizlerini yaptığım bitki örneklerinin teşhisini sağlayan sayın Doç. Dr. Kamil COŞKUNÇELEBİ' ye teşekkürü bir borç bilirim.

Bilimsel, cihaz ve kimyasal malzeme katkısından dolayı yardımlarını bizden esirgemeyen sayın Prof. Dr. Nurettin YAYLI' ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Sena ATAL, Nevin ULAŞ ve Büşra KAYA' ya teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman olduğu gibi maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan, moral ve sevgi kaynağım canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, K.T.Ü. B.A.P. biriminin desteklediği 1238 kodlu projenin desteğiyle tamamlanmıştır. Tüm personeline hizmetlerinden dolayı teşekkür ederim.

İrem KURT

İÇİNDEKİLER**Sayfa No**

İç Kapak Sayfası

BEYAN**TEŞEKKÜR****İÇİNDEKİLER**

v

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

RESİMLER DİZİNİ

x

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

xi

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

2

3. GİRİŞ ve AMAÇ

3

4. GENEL BİLGİLER

4

4.1. Uçucu Yağlar

4

4.2. Uçucu Yağların Biyolojik Etkinlikleri ve Kullanım Alanları

4

4.3. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

5

4.3.1. Su Destilasyonu

5

4.3.2. Buhar Destilasyonu

6

4.3.3. Soğukta Sıkma

6

4.3.4. Çözücü Ekstraksiyonu

6

4.3.5. Enjlarüj

7

4.3.6. Süper Kritik Sıvı Ekstraksiyonu

7

4.3.7. Katı Faz Sıvı Ekstraksiyon

8

4.3.8. Mikrodalga Ekstraksiyon

9

4.4. Uçucu Yağların Sınıflandırılması

10

4.4.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

10

4.4.2. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

11

4.4.3. Terapik Etkilerine Göre Sınıflandırılması

11

4.5.	Terpenler	11
4.6.	Terpenlerin Sınıflandırılması	12
4.6.1.	Hemiterpenler	12
4.6.2.	Monoterpenler	12
4.6.3.	Seskiterpenler	13
4.6.4.	Diterpenler	14
4.6.5.	Sesterpenler	14
4.6.6.	Triterpenler	14
4.6.7.	Tetraterpenler	15
4.6.8.	Politerpenler	15
4.7.	Spektroskopik Yöntemler	15
4.7.1.	Kromatografik Yöntemler	16
4.7.2.	Gaz Kromatografisi	17
4.7.2.1.	Taşıyıcı Gaz	18
4.7.2.2.	Enjeksiyon Portu	18
4.7.2.3.	Kolon	18
4.7.2.4.	Dedektör	19
4.8.	Antimikrobiyal Maddelerin Özellikleri	20
5.	MATERYAL ve METOT	21
5.1.	Kullanılan Cihazlar	21
5.2.	Bitki Materyali ve Temini	23
5.2.1.	Çalışmada Kullanılan Bitki	23
5.2.2.	Bitki Materyalinin Temini	23
5.3.	Uçucu Yağların İzolasyonu	24
5.4.	Antimikrobiyal Aktiviteleri	24
5.4.1.	Agar Jel Difüzyon Metodu	24
5.5.	Kullanılan Alet ve Cihazlar	25
6.	BULGULAR ve SONUÇLAR	26
6.1.	Clevenger Yöntemi Sonuçları	26
6.2.	SPME Yöntemi Sonuçları	26

6.3.	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	29
7.	TARTIŞMA	31
8.	ÖNERİLER	32
9.	KAYNAKLAR	33
10.	EKLER	36
11.	ÖZGEÇMİŞ	38

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Gazların, Sıvıların ve Süperkritik Akışkanların Fiziksel Özelliklerinin Karşılaştırılması	8
Tablo 2. Terpenlerin Sınıflandırılması	12
Tablo 3. Dedektör Tiplerinin Uygulanabilir Örnekleri	19
Tablo 4. GC Spektrumlarının Alındığı Deneysel Koşullar	21
Tablo 5. SPME Deneysel Koşulları	22
Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Satın Alındıkları Firmalar	25
Tablo 7. <i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i> Bitkisinin GC-MS Uçucu Yağ Bileşenlerinin Sınıflandırılması	26
Tablo 8. <i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i> Bitkisinin Kimyasal Sınıf Dağılımındaki Anabileşenler	27
Tablo 9. <i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i> Bitkisinin Tüm Uçucu Bileşenleri	28
Tablo 10. <i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i> Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Kromatografi'nin Sınıflandırılması	17
Şekil 2. Gaz Kromatografi Sistemi	17

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Clevenger Destilasyon Düzeneği	6
Resim 2. Çözücü Ekstraksiyonu Reaksiyon Düzeneği	7
Resim 3. Katı Faz Mikro Ekstraksiyon Fiber Ucu	9
Resim 4. Mikro Dalga Fırın	10
Resim 5. GC-MS Cihazı	21
Resim 6. SPME Fiber Uç	22
Resim 7. <i>Lathyrus laxiflorus</i> subsp. <i>laxiflorus</i> Bitkisi	23
Resim 8. GC-MS Cihazındaki Uçucu Yağların Konulduğu Vialler	24

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

AED	Atomik Emisyon Dedektörü
Ar	Argon
CGC	Kapiler Gaz Kromatografisi
CO ₂	Karbondiyoksit Gazı
ECD	Elektron Yakalama Dedektörü
FID	Alev İyonizasyon Dedektörü
GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
H ₂	Hidrojen Gazı
He	Helyum
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IR	İnfrared (kırmızı ötesi) Spektroskopisi
MIC	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MS	Kütle Spektroskopisi
MSD	Kütle Spektrometre Dedektörü
MWE	Mikro Dalga Ekstraksiyon
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NPD	Nitrojen Fosfor Dedektörü
PID	Fotoiyonizasyon Dedektörü
RI	Alıkonma İndeksi
SCOT	Destek Kaplı Kapiler Kolon
SFE	Süper Kritik Sıvı Ekstraksiyon
SPME	Katı Faz Mikro Ekstraksiyon
TCD	Termal İletkenlik Dedektörü
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
N ₂	Azot
WCOT	Duvar Kaplı Kapiler Kolon

Singeler

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
M	Molar
eV	Elektronvolt

1. ÖZET

***Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflrous* Uçucu Yağ Bileşenlerinin SPME-GC-MS-FID Yöntemiyle Aydınlatılması ve Antimikrobiyal Aktiviteleri**

Bu tezde, *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflrous* bitkisinin uçucu yağ içerikleri GC-MS ve SPME-GC-MS-FID teknikleri ile araştırılmıştır. Tıbbi amaçla kullanılan ilaçların büyük bir kısmının bitkisel kaynaklı oldukları bilinmektedir. Bu amaçla bu çalışmada cleverger yöntemiyle elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktiviteleri yapılmıştır. Uçucu yağlar, bitkilerden su buharı destilasyonu veya değişik yöntemlerle elde edilebilen, genelde oda sıcaklığında sıvı halde olup bazen donabilen, uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı karışımlardır. Literatürde belirtildiği gibi doğal bitkilerde yüzlerce değişik tür organik bileşikler vardır. Bitkide, miligram mertebesinde çok daha az miktarda bulunan organik bileşikler örneğin uçucu yağları gaz-kromatografisi (GC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) veya katı faz mikro ekstraksiyon (SPME) GC-MS-FID gibi tekniklerle aydınlatılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflrous*, Uçucu Yağ Bileşenleri, SPME-GC-MS-FID, Antimikrobiyal Aktiviteler

2. SUMMARY

Antimicrobial Activities and Illumination of Essential Oils Component of *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflours* with SPME-GC-MS-FID Methods

In this thesis, the contents of volatile oil of *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflours* plant have been researched by GC-MS and SPME-GC-MS-FID techniques. Most of the drugs used for medical purposes are known to be herbal. For this purpose, antimicrobial activities of the volatile oil contents obtained by Clevenger method have been made in this study. Volatile oils, which can be obtained by water steam distillation or different methods, are volatile, strongly redolent and greasy mixtures which are generally in the liquid state at ambient temperature and can sometimes be frozen. As stated in the literature, there are hundreds of different types of organic compounds in natural plants. In plant, organic compounds existing less than milligram level, for instance volatile oils, are highlighted by the techniques like gas-chromatography (GC) and gas-chromatography mass spectrometer (GC-MS) or solid phase micro extraction (SPME) GC-MS-FID.

Key Words: *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflours*, Essential Oil Components, SPME-GC-MS-FID, Antimicrobial Activities

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Bütün dünya ülkelerindeki gibi, Türkiye’de de yıllardır çok fazla bitki türü tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Ülkemiz bitki bakımından oldukça zengin bir ülkedir. Toplam bitki türü sayısı 9000’den fazla olup bu sayı alttürlerle 10.000’i geçmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin birçoğu ülkemizde doğal olarak yetişmektedir. Yaklaşık 500 bitki çeşidi tıbbi amaçla kullanılmaktadır (1).

Tıbbi amaçla kullanılan ilaçların büyük bir kısmının bitkisel kaynaklı olduğu bilinmektedir. Günümüzde eczanelerde satılan ilaçların birçoğu da bitkisel kaynaklı ilaçlardır. Bitkilerde bulunan uçucu yağlar bitki kimyasının önemli rolünü üstlendiğinden ilaç ve tıp sektöründe önemli ölçüde tercih edilmektedir.

Bununla birlikte, bitkilerden elde edilen uçucu yağlar farmasötik, kozmetik ve diğer endüstri alanlarında yaygın olarak da kullanılmaktadır (2).

Anadolu topraklarında 18’i endemik tür olup toplamında 61 *Lathyrus* (mürdümük) türün doğal olarak yetiştiği belirlenmiştir (3).

Bu çalışmada kullanılan *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflous* bitkisinin uçucu yağları GC/MS, GC/FID ve SPME yöntemleri ile analizi yapılmış ve antimikrobiyal özellikleri araştırıldı. Uçucu yağ bileşimi NIST ve WILEY kütüphanelerinin yardımıyla belirlenip literatür karşılaştırması gerçekleştirildi.

Bu çalışmadaki amaç; Türkiye’de doğal olarak yetişen *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflous* bitkisinin uçucu yağlarının kimyasal bileşimlerini belirleme ve antimikrobiyal aktivitelerini incelemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkilerin yaprak, gövde, kök gibi kısımlarından destilasyon yoluyla elde edilen kompleks karışımlardır. Eteri yağlar, eterik yağlar, kokulu yağlar, esans yağları, esans ruhu olarak da isimlendirilen uçucu yağlar çoğunlukla renksiz veya açık sarı renkli, oda koşullarında sıvı halde bulunan, çok sayıda bileşenden oluşan doğal ürünlerdir.

En önemli ayırt edici özellikleri, uçucu ve kokulu olmalarıdır. Bu yağların diğer normal yağlardan farklı olma sebebi ise sudan hafif olduklarından dolayı suyun yüzeyinde birikmeleri ve açıkta bırakıldıklarında kolayca buharlaşabilmeleridir. Ancak bileşimindeki oksijenli bileşiklerin bir kısmı suda çözündüğünden aromatik sular hazırlanabilmektedir.

Bitkilerde uçucu yağların neden oluştuğu ve nasıl olduğuna dair çok çeşitli teoriler vardır. Bitkiyi korumak, böcekleri cezbetmek, haşeratları kaçırmak bunlardan bazılarıdır. Bazı araştırmalara göre de, uçucu yağlar doğrudan hücre zarında oluşan artık ürünlerdir ve genellikle serbest halde bulunurlar (4).

4.2. Uçucu Yağların Biyolojik Etkinlikleri ve Kullanım Alanları

Uzun yıllardır yapılan araştırmalar sonucu bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı açısından önemli özellikleri olduğu görülmüştür. Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmalarına göre tedavi amaçlı yaklaşık 20.000 bitki kullanılmıştır. Bitkilerde, protein, nişasta, şeker, pektin, selüloz gibi tedavi yönünden etkin olmayan maddelerin yanında, az miktarda da olsa 'etkili madde' adı verilen farmakolojik etkilere sahip bileşiklerde bulunmaktadır. Uçucu yağların içeriğini ise çeşitli alkoller, esterler, terpenler, aldehitler, kumarinler oluşturmaktadır. Bu maddeler uçucu yağlara;

- Antidepresan,
- Tansiyon düzenleyici,
- Analjezik,
- Antitoksik gibi çok sayıda çeşitli etkinlik kazandırmaktadır (5,6,7).

Bitkilerdeki uçucu yağlar, kokulu olduklarından dolayı aromaterapi alanında oldukça fazla kullanıma sahiptirler. Parfüm veya oda spreyi şeklinde uygulanarak uyku problemleri, stres, endişe gibi problemlerin giderilmesinde kullanılmaktadır. Havaya kolay şekilde karışabildiklerinden solunum sistemindeki rahatsızlıkların giderilmesinde de önemli rol oynamaktadır. Ayrıca ciltten rahatlıkla emilebildiğinden ve kan dolaşımına karıştığından cildin daha sağlıklı hale gelmesi için cilde masajla uygulanmaktadır (8).

Gıda sektöründe de uçucu yağlar oldukça fazla kullanılmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıkların azaltılması için yeni tekniklere ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bakteriyel bozulmayı geciktirdikleri ve bundan dolayı koruyucu amaçla kullanıldıkları saptanmıştır.

Bitkilerden elde edilen ekstraktların yan etkileri ve ilaçlarla birlikte kullanıldığında meydana gelebilecek olan ilaç etkileşimleri tam olarak bilinmemektedir. Günlük olarak alınan bazı yiyeceklerdeki maddelerin etkileşime geçerek istenmeyen yan etkilere neden olduğu belirtilmektedir. Bundan dolayı birçok hastalıkların tedavisinde mutlaka doktor tavsiyesine ihtiyaç vardır (9).

4.3. Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Uçucu yağ eldesinde kullanılan yöntemler;

- Su destilasyonu
- Buhar destilasyonu
- Soğukta sıkma
- Çözücü ekstraksiyonu
- Enflarüj
- Süper kritik sıvı ekstraksiyonu (SFE)
- Katı faz mikro ekstraksiyon (SPME)
- Mikrodalga ekstraksiyon (MWE)'dur.

4.3.1. Su Destilasyonu

Bu destilasyon da, küçük ölçekli üretim yapılmak istendiğinde Clevenger tipi aparatla, büyük ölçekli üretim yapılmak istendiğinde ise büyük destilasyon kaplarında

uygulama yapılmaktadır. Bu yöntem, bitki ve suyun 2-8 saat süre ile soğutucu altında bir cam balon içerisinde kaynatılarak, buhar ile hareket eden yağ moleküllerinin yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılması ile yapılmaktadır. Elde edilen uçucu yağ miktarları volumetrik olarak ifade edilmektedir (10).

4.3.2. Buhar Destilasyonu

Bu yöntemde bitki su ile değil su buharı ile temasta bırakılır. Kurutulmuş olan bitkiler bir cam balona alınıp üzerine su ilave edilir. Geri soğutucu yardımıyla su buharı yağı sürükleyerek uygun bölmeye gönderir. Sıvılaştıran su-y yağ karışımı toplama kabında yoğunluk farkından dolayı iki tabakaya ayrılır ve uçucu yağ elde edilir. Düzenek Resim 1 'de gösterilmiştir.



Resim 1. Clevenger destilasyon düzeneği

4.3.3. Soğukta Sıkma

Destilasyon işlemi sırasında narenciye esansları gibi bazı uçucu yağlar bozulurlar. Narenciye kabuklarının yağ içeren hücreleri yağ eldesi için patlatılır ve bir miktar açığa çıkan yağ su ile yıkanarak kabuktan alınır. Santrifüj ile narenciye esansı alınır. Bu işlem için, FMC In Line ve Polisitrus ekstraktör olmak üzere iki tip ekstraktör kullanılır (1).

4.3.4. Çözücü Ekstraksiyonu

Bitki direkt olarak oda sıcaklığında çözücü içerisinde kaynatılmaktadır. Çözücü olarak en çok hegzan ve etanol kullanılmaktadır. Ekstraksiyon sonunda, çözücü

destilasyon ile uzaklaştırılarak geri kazanılmaktadır. Kalan yağimsı kısım içerisinde ise uçucu yağ aranır.

Çözücü ekstraksiyonunda, düşük sıcaklıkta uygulandığından daha doğal uçucu yağ elde edilmektedir. Fakat ekstraksiyon sonrası yoğunlaştırma sırasında molekül ağırlığı düşük uçucu bileşiklerin kaybı söz konusudur. Bu nedenle hem ekonomik hem de çevre kirliliği (toksik özellikleri) bakımından diğer yöntemlere göre dezavantaja sahiptir (10). Düzenek Resim 2’ de gösterilmiştir.



Resim 2. Çözücü ekstraksiyonu reaksiyon düzeneği

4.3.5. Enflarüj

Genelde çiçeklere ve aromatik bitkilere uygulanan bu yöntem, örneklerin soğuk hayvansal yağa temas ettirilmesiyle gerçekleştirilir. Cam plakların yüzeylerine sürülen yağ ile temas eden bitki, bu plaklar arasına sıkıştırılarak bitkinin aroma maddelerinin yağ tarafından absorplanması sağlanır.

4.3.6. Süper Kritik Sıvı Ekstraksiyonu (SFE)

Bu yöntem 1980’lerden sonra parfüm endüstrisi için geliştirilmiş bir yöntemdir. Soğutulan karbondioksit gazıyla basınç uygulanarak sıvı hale getirilir. Basınç

kaldırıldığında karbondioksit buharlaşır geriye uçucu yağ kalır. Karbondioksit inert olduğundan dolayı uçucu yağla etkileşime girmez ve saf yağ elde edilir. Yöntem soğukta uygulandığından bitkideki uçucu yağların bozunmasına da ihtimal yoktur (11,12,13). Süper kritik bir akışkanla ekstraksiyon, seçilen akışkanın, basınç ve sıcaklık değerinin üzerinde bir çözücü olarak kullanılması olduğundan bu bölgede, akışkanın fizikokimyasal özellikleri değişerek, sıvı ve gaz arası farklı özellikler gösterirler. Bundan dolayı, bu koşullardaki madde ‘akışkan’ olarak isimlendirilir (14). Tablo 1’de gaz, sıvı ve süper kritik akışkanın fiziksel özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 1. Gazların, sıvıların ve süper kritik akışkanların fiziksel özelliklerinin karşılaştırılması (15).

Özellik	Yoğunluk (kg/m ³)	Viskozite (cP)	Difüzivite(mm ² /s)
GAZ	1	0.01	0.1-10
SFE	100-800	0.05-0.1	0.01-0.1
SIVI	1000	0.5-1.0	0.001

Ekstraksiyon işleminde karbondioksit kullanımının avantajları şunlardır;

- Sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan dolayı, sulu çözeltilerden organik maddelerin ekstraksiyon edilmesi oldukça kolaydır.
- Viskozitesi düşüktür.
- Isıl iletim özellikleri çok iyidir.
- Toksik değildir.
- Yanıcı değildir.
- Maliyeti düşüktür.
- Kolaylıkla ve saf halde eldesi mümkündür.
- Çevre açısından herhangi bir problem oluşturmaz (14).

4.3.7. Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME)

SPME, modifiye edilmiş bir şırıngaya benzeyen, oldukça basit ve çözücü gerektirmeyen bir yöntemdir. İnce polimer film kaplı eritilmiş slika optik bir life sahiptir. Örnek, gaz ya da çözelti halinde iken SPME iğnesi kapalı ortama sokulur ve

lifi koruyan kısım geri çekilir. Daha sonra örnek GC veya GC-MS'e desorpsiyon ile aktarılarak analiz edilir (10).

SPME ekstraksiyonunun süresi 1-20 dakika arasında değişmektedir. Bu süre hegzan gibi uçucu bileşiklerde yeterli olmakta fakat daha az uçucu bileşikler için daha fazla süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Maliyeti düşük bir yöntemdir. Resim 3'te kullanılan fiber uç gösterilmiştir.



Resim 3. Katı faz mikro ekstraksiyon fiber ucu

4.3.8. Mikrodalga Ekstraksiyon (MWE)

Mikrodalga enerjisinin etkinliği çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlıdır. Bu ekstraksiyon yöntemi, sıcaklık ve basınç kontrolü edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan veya atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleşen bir sistemdir. Ayrıca bu yöntemde az çözücü kullanıldığından işlem kısa sürede gerçekleşmektedir. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemi için kullanılan fırın Resim 4'te gösterilmiştir.



Resim 4. Mikro Dalga Fırın

4.4. Uçucu Yağların Sınıflandırılması

4.4.1. Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağlar bileşimlerinde hidrokarbonlar, alkoller, asitler, esterler, aldehitler, ketonlar ve fenoller gibi çeşitli bileşikler bulundurmaktadır. Karmaşık bir kimyasal yapıya sahip oldukları bilinen uçucu yağlar kimyasal yapılarına göre başlıca 4 grupta toplanmıştır. Bunlar;

- Terpenik maddeler,
- Aromatik maddeler,
- Düz zincirli hidrokarbonlar,
- Azot ve kükürt taşıyan bileşiklerdir.

Terpenik ve aromatik olan grup uçucu yağların ana bileşiklerini oluştururlar. Düz zincirli hidrokarbonlardan ve azot-kükürt taşıyan uçucu yağlardan etken maddeyi oluşturanlar çok azdır.

Günümüzde uçucu yağların yapısında 2000'den fazla kimyasal bileşik bulunmaktadır ve bunların % 90'ı terpenik maddelerden oluşmaktadır. Uçucu yağların kendisine has kokusu terpenlerin oksitlenmesi ile oluşan oksijenli türevlerinden kaynaklanır (16).

4.4.2. Aromatik Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağlar koku ve tat özelliklerine göre de gruplandırılırlar. Bunlar;

- Aromatika (çok kokulu ve tadı iyi olanlar),
- Aromatika-aroma (kokulu ve tadı acı olanlar),
- Aromatika-akria (kokulu ve tadı keskin olanlar)'dır.

4.4.3. Terapik Etkilerine Göre Sınıflandırılması

Uçucu yağlar, terapik özelliklerine göre;

- İltihap oluşmasını azaltıcı
- İdrar söktürücü
- Öksürük kesici
- Balgam söktürücü
- Gaz giderici
- Safra söktürücü olarak kullanılırlar (16).

4.5. Terpenler

Terpenler hidrokarbonların geniş bir sınıfıdır. Bitkilerde, özellikle iğne yapraklılarda üretilmekte olup bazı böcekler de terpen salgılamaktadırlar. Çoğu bitki ve çiçeklerdeki esans yağlarının başlıca bileşkeleridir (17).

Terpenler, uçucu yağlarda en fazla bulunan doğal bileşiklerdir. Terpen adı turpentin kelimesinden türemiştir. Terpenlerin başta oksijen olmak üzere heteroatom içeren türevleri 'terpenoid' olarak isimlendirilmektedir (18).

Terpenler C_5H_8 kapalı formülüne sahip 'izopropen' olarak adlandırılan, 2-metil-1,3-bütadienin bir araya gelmesiyle oluşurlar. Dallanmanın olduğu uç 'baş kısmı' diğer uç 'kuyruk kısmı' olarak adlandırılır ve 25 karbonlu yapılara kadar izopropenler çoğunlukla baş-kuyruk şeklinde bağlanırlar. Daha fazla sayıda karbon içeren yapılar da genellikle 2 terpenin birleşmesinden oluşurlar (19,20).

4.6. Terpenlerin Sınıflandırılması

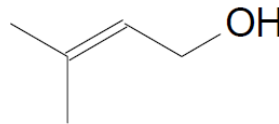
Terpenler içerdikleri izopropen birimlerinin sayısına göre 8 ana başlık altında sınıflandırılırlar. Terpenlerin sınıflandırılması Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Terpenlerin Sınıflandırılması

Sınıfı	İzopren Ünitesi	Karbon Sayısı	Kapalı Formül
Hemiterpenler	1	5C	C ₅ H ₈
Monoterpenler	2	10C	C ₁₀ H ₁₆
Seskiterpenler	3	15C	C ₁₅ H ₂₄
Diterpenler	4	20C	C ₂₀ H ₃₂
Sesterpenler	5	25C	C ₂₅ H ₄₀
Triterpenler	6	30C	C ₃₀ H ₄₈
Tetraterpenler	8	40C	C ₄₀ H ₆₄
Politerpenler	n	5nC	(C ₅ H ₈) ₅

4.6.1. Hemiterpenler

Hemiterpenler terpenlerin en küçük birimidir. Bitkide genellikle alkaloid, flavonoid gibi yapılara bağlı olarak bulunurlar. Yapısında oksijen içerenlerine ‘hemiterpenoidler’ denir. Doğal alkol olarak bilinen prenol (3-metil-2-büten-1-ol) bu sınıfa örnektir.

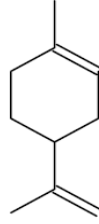


Prenol

4.6.2. Monoterpenler

İki izopren ünitesinin biraraya gelmesiyle oluşan doğal bileşiklerdir. Oksijen içermelerine göre ‘monoterpenoidler’ olarak isimlendirilirler. Monoterpen ve türevleri

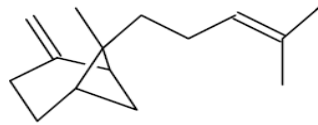
asiklik, monosiklik ve bisiklik yapıda olabilirler. Asiklik yapıda olanları düz zincirli ve çift bağ taşıyabilirler. Monosiklik yapıda olanlar, bir halka ve çift bağ taşırlar. Bisiklik yapıdakiler de, iki halka ve çift bağ taşırlar. Monosiklik monoterpenler bir izopropil grubu içeren siklohegzandan türetilebilirler. Monosiklik yapıda olan limonen buna örnektir.



Limonen
(Monosiklik)

4.6.3. Seskiterpenler

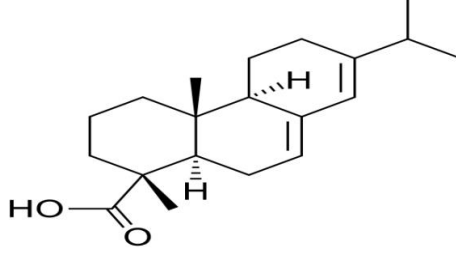
Seskiterpenler 15 karbonlu olup, üç izopren biriminin birleşmesiyle oluşan bileşiklerdir. Yapısında oksijen içermelerine göre ‘seskiterpenoidler’ ismini alırlar. Seskiterpenler asiklik, monosiklik, bisiklik, trisiklik ve tetrasiklik yapılarda olabilmektedirler. Asiklik yapıda olanlar, düz zincirli olup çift bağ taşırlar. Monosiklik yapıdakiler, bir halka ve çift bağ taşırlar. Bisiklik yapıdakiler, iki halka ve çift bağ taşırlar. Trisiklik yapıdakiler, üç halka taşımakta olup tetrasiklik yapıda olanlar dört halka taşımaktadırlar. Bisiklik yapıya sahip olan bergamoten buna örnektir.



Bergamoten
(Bisiklik)

4.6.4. Diterpenler

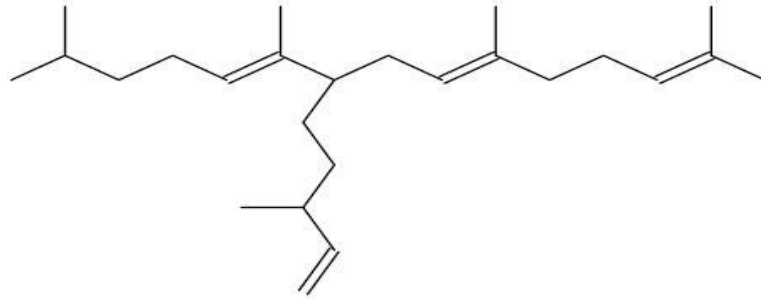
Diterpenler 20 karbonlu olup, dört izopropen biriminin birleşmesiyle oluşmuşlardır. Oksijen içerenlere ‘diterpenoidler’ denilmektedir. Asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik yapılarındadırlar.



Abietic Asit

4.6.5. Sesterpenler

Beş izopren biriminin birleşmesiyle oluşurlar ve oksijen içerenler ‘sesterpenoidler’ olarak isimlendirilirler. Çeşitli doymamış ve dallanmış sesterpenler haslenler olarak da bilinmektedirler (18).



Haslen

4.6.6. Triterpenler

Triterpenler altı izopren ünitesinin biraraya gelmesi ile oluşurlar. Oksijen içerenlerine ‘triterpenoidler’ denir. Genellikle iki seskiterpen ünitesinin birleşmesiyle oluşurlar. Asiklik, tetrasiklik ve pentasiklik yapılarındadırlar.

kataloglarda bulunan spektrumlarla karşılaştırılır. Bunun için kullanılan cihazlar, infrared absorpsiyon spektrofotometreleridir.

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, daha çok saf haldeki bileşiklerin nitel analizinde ve yapılarının belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle nicel analiz de gerçekleştirilebilmektedir ancak bu amaçla kullanılırken yöntemin duyarlılığı oldukça azdır. Moleküllerdeki belirli çekirdeklerin kuvvetli bir magnetik alandayken, radyo dalgalarını absorblamasına dayanır ve bir moleküldeki C ve H atomlarına dair bilgiler verir (21).

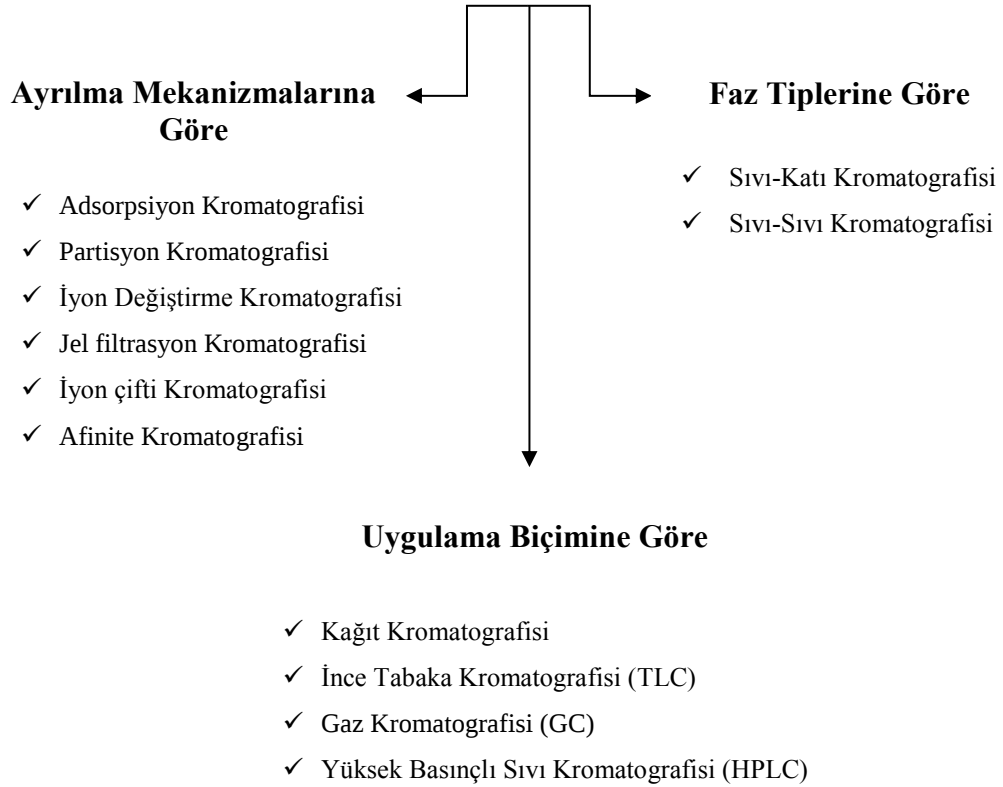
Kütle (MS) spektroskopisi, maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesinde, moleküllerinin yapılarının aydınlatılmasında ve bir örnekteki atomların izotopik oranlarının bulunmasında kullanılan bir yöntemdir.

4.7.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımdaki iki veya daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmelerine dayanan saflaştırma ve ayırma tekniğidir. Bu yöntemle, birbirine hem kimyasal hem de fiziksel olarak çok yakın karışımları ayırmak oldukça kolaydır ve kısa zaman alır.

Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvıdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne Sıvı Kromatografisi; hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne de Gaz Kromatografisi denir (22).

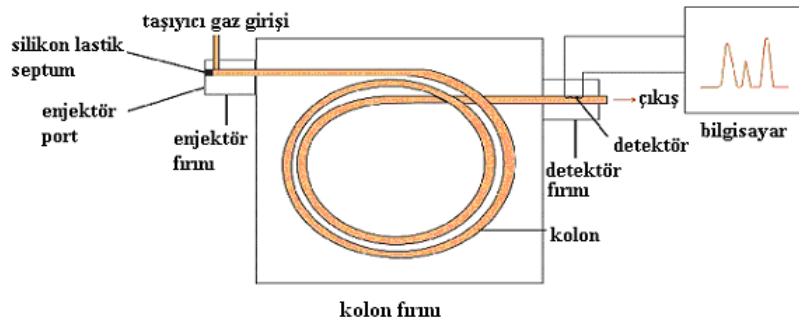
Kromatografi'nin Sınıflandırılması



Şekil 1. Kromatografi'nin sınıflandırılması

4.7.2. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi, uçucu organik bileşikleri ayırmak için kullanılan kromatografik bir yöntemdir. Bir taşıyıcı gaz kaynağı, bir enjeksiyon portu, sabit faz içeren ayırma kolonu, bir dedektör ve kayıt edici kısımlardan oluşmaktadır. Genel bir gaz kromatografi cihazı Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Gaz kromatografi sistemi (16)

Kolon boyunca numuneyi ilerletmek için hareketli faz olarak hidrojen, helyum ya da azot gibi inert gazlar taşıyıcı gaz olarak kullanılırlar. Gaz akış hızını ölçmek için genellikle basınçölçerler kullanılır. Gaz kromatografisinde (GC) kullanılan en yaygın form kapiler gaz kromatografisidir (CGC). Çoğu kapiler kolonlar dışı poliimidle kaplı eritilmiş silikadan yapılmış olup, oldukça esnek bir yapıya sahiptirler. Bundan dolayı, çok uzun bir kolon küçük bir bobin halinde sarılabilir. Organik bileşikler kolonda hareketli faz ve sabit faz arasında farklı dağıldıklarından dolayı ayrılırlar. GC kolonlarında en yaygın sabit fazlar polisiloksanlardır. En apolar sabit faz ise polidimetilsiloksandır. Çok polar analitler için polietilen glikol yaygın bir şekilde sabit faz olarak kullanılır (16).

4.7.2.1. Taşıyıcı Gaz

Taşıyıcı gaz, analiti kolon boyunca taşır. Genellikle kullanılan taşıyıcı gazlar He, Ar, N₂, H₂ ve CO₂ dir. Taşıyıcı gazın seçimi kullanılan dedektöre bağlıdır. Asıl görevi, safsızlıkları uzaklaştırmak için kullanılan elek olmasıdır. Hidrojen gazı da iyi bir taşıyıcı gazdır fakat analit ile reaksiyona girip yeni maddeler oluşturabileceğinden çok fazla tercih edilmez.

4.7.2.2. Enjeksiyon Portu

Enjeksiyon kısmı kolonun başında, içinde buharlaştırıcı olan lastik bir septumdan oluşur ve sıcaklığı maddeyi buharlaştırabilmek için oldukça yüksek olmalıdır. Enjeksiyon portu iki modda çalışır. Bunlar; split ve splitlessdir. Split mod kolonun kirlenmesini önler. Derişik numuneler için split mod tercih edilir. Splitless mod da ise, enjekte edilen maddenin tamamı kullanıldığından numune miktarı az olduğunda bu mod tercih edilir.

4.7.2.3. Kolon

Gaz kromatografisinde kullanılan iki tip kolon vardır. Bunlar dolgulu kolonlar ve kapiler kolonlardır. Günümüzde kullanılan dolgulu kolonlar, cam, paslanmaz çelik, bakır veya teflon gibi malzemelerden yapılmaktadır. Kolonlar 2-3 m uzunluğunda, 2-4 mm çapındadırlar. Kapiler kolonlar ise, duvar kaplı kapiler kolonlar (WCOT) ve destek kaplı kapiler kolonlar (SCOT) olmak üzere iki türdür. Bu kolonların avantajları, fiziksel dayanıklılık, numune bileşenlerine karşı inertlik ve yüksek esnekliğe sahip

olmalarıdır. Kolonun optimum sıcaklığı maddenin kaynama noktasına bağlıdır. Düşük sıcaklıklar iyi çözünürlük verir ancak alıkonma zamanını artırır (23).

4.7.2.4. Dedektör

Kromatografik kolonla elde edilen ayrılmayı bir dedektör takip eder. Gazlar kolondan dedektöre geçerek atık kısımdan çıkarlar. Dedektörden çıkış sinyali kromatogramı çizen kaydediciye iletilirler ve ayrılmış olan numune bileşenlerine karşılık gelen bir seri pik elde edilir. Bir dedektörde olması beklenen özellikler şunlardır: stabilite, hassasiyet, hızlilik, aynı derecede tekrarlanabilen sonuç. Gaz kromatografisinde birçok dedektör kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları;

- ✓ İnfrared Analiz Cihazı (GC-FT-IR)
- ✓ Yüzey Potansiyeli Detektörü
- ✓ Kütle (mass) Spektrometresi (GC-MS)
- ✓ Deşarj Detektörü
- ✓ Alev İyonizasyon Detektörü (FID)
- ✓ Beta Işını İyonizasyonu Detektörü (Elektron Yakalama Dedektörü (ECD))
- ✓ Termal İletkenlik Dedektörü (TCD)
- ✓ Nitrojen Fosfor Dedektörü (NPD)'dür (24,25).

Bazı dedektör türlerinin kullanılabilir örnekleri Tablo 3'te gösterilmiştir (26).

Tablo.3. Dedektör Tiplerinin Uygulanabilir Örnekleri

Dedektör Tipi	Uygulanabilir Örnekler
Termal iletkenlik (TCD)	Evrensel
Alev iyonizasyon (FID)	Hidrokarbonlar
Nitrojen fosfor (NPD)	N, P içeren örnekler
Elektron yakalama (ECD)	Halojenli hidrokarbonlar
Atomik emisyon (AED)	Element seçici
Fotoiyonizasyon (PID)	Gaz ve buhar bileşikler
Kütle spektrometre (MSD)	Ayarlanabilir örnek

4.8. Antimikrobiyal Maddelerin Özellikleri

Uçucu yağlar çeşitli amaçlar için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Son yıllarda farklı özelliklerinden yararlanılarak daha geniş amaçlı kullanımları ve bu amaç doğrultusunda yapılan araştırmalar hızla sürdürülmektedir. Üzerinde en çok durulan konu ise antimikrobiyal özellikleridir (27). Bu özelliklerinden dolayı uçucu yağlar çiğ gıdaların korunmasında, modern ilaçlarda katkı maddesi ve doğal tedavilerde kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotiklerin duyarlılıklarını belirlemek için kullanılmakta olan testler, uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesinde de kullanılabilir. Uzun yıllarca bu konuyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Genelde uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerini test etmek ve değerlendirmek zordur. Bunun sebebi de, sudaki çözünürlüklerinin az olmasıdır. Yapılan deneyi ve sonuçları etkileyen en önemli faktörler; deneyin yapılış tekniği, kullanılan mikroorganizma ve uçucu yağın yapısal özellikleridir.

Antimikrobiyal madde; istenmeyen fakat herhangi bir sebepten dolayı bulunabilen bakteri, küf ve mayaları, her türlü mikroorganizmayı ortamdan yok etmek ve çoğalmasını önlemek için gıdalara katılmaktadır. Antimikrobiyalların etkisi, çoğalmayı durdurucu veya öldürücü olabilmektedir. Mikroorganizma ölümü; genetik yapılarının etkilenmesi, protein sentazinin etkilenmesi, enzim sisteminin etkilenmesi şeklinde olabilir.

Uygun antimikrobiyal madde seçiminde dikkat edilmesi gereken konular şunlardır;

- ✓ Geniş spektrumlu olmalı
- ✓ Gıda bileşeni ile reaksiyona girmemeli
- ✓ Saf olmalı, toksikolojik yönden problem oluşturmamalı
- ✓ Ucuz olmalı
- ✓ Paketleme materyali ile reaksiyona girmemeli
- ✓ Fizyolojik yönden sakıncalı olmamalı
- ✓ Gıdanın duyusal özelliklerini etkilememeli
- ✓ Gıdalarda bulunan mikroorganizmaları mümkün olduğu kadar az etkilemelidir.

5. MATERYAL ve METOT

5.1. Kullanılan Cihazlar

Yapılan çalışmada gaz kromatografisi cihazı olarak Shimadzu QP20104 Ultra marka cihaz kullanılmıştır. Bununla birlikte, Shimadzu 2010 plus FID, Shimadzu Class-5000 Chromatography Workstation yazılımları ve dedektör olarak Shimadzu marka kütle spektrometresi kullanılmıştır. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisi için elde edilen deneysel koşullar Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. GC Spektrumlarının Alındığı Deneysel Koşullar

Sıcaklık	60 °C'dan 240 °C
Akış Hızı	1.0 mL dk-1
Toplam Analiz Süresi	62 dk
Enjekte Edilen Numune Miktarı	2 µL
Enjeksiyon Sıcaklığı	260 °C
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Kolon	RTX-5M 30 m Kapiler Kolon
İyonizasyon Voltajı	70 eV

Laboratuvarda kullandığımız GC-MS cihazı Resim 5'te gösterilmiştir.



Resim 5. GC-MS cihazı

Bitki yaprakları 0.2 cm ve daha küçük parçalara ayrıldıktan sonra bir havan içinde ezildi ve toz haline getirilen materyalden 7 g kadar tartılıp 10 mL hacimli bir erlen içerisine koyulup bölme içerisine yerleştirildi. 10-15 dakika kadar ekstraksiyon yapıldıktan sonra RTX-5M kapiler kolonu içerisinde 62 dakikada analiz edildi.

Tablo 5. SPME Deneysel Koşulları

Kolon	RTX-5M 30 m Kapiler Kolon
Toplam Analiz Süresi	62 dk
Kullanılan Fiber Uç	DVB/Karboksen/PDMS Kararlı Uç
Enjeksiyon Sıcaklığı	260 °C
Ekstraksiyon Süresi	10 dk

Laboratuvarda kullandığımız SPME fiber uç Resim 6’da gösterilmiştir.



Resim 6. SPME fiber uç

Bu çalışmada tüm bileşenlerin alıkonma zamanları n-alkanların (C6-C32) standart olarak kullanıldığı Kovats metodu ile belirlendi. Spektral data eşleştirmeleri ve karşılaştırmaları NIST (National Institute of Standards and Technology) ve Wiley kütüphanelerinden yararlanılarak yapıldı.

5.2. Bitki Materyali ve Temini

5.2.1. Çalışmada Kullanılan Bitki (*Lathyrus laxiflorus* subsp. *Laxiflorus*)

Fabaceae familyasına ait *lathyrus* cinsi bu bitki uçucu yağ bakımından zengin içeriğe sahiptir. Baklagiller olarak bilinen bu familya (fabaceae), çoğunlukla otsu bitkilerin oluşturduğu çalı ve ağaç türlerini de içeren geniş bir alana sahiptir. 400 cins ve 10.000 civarında tür içerir. Fasulye, bakla, nohut, soya, mercimek, bezelye gibi insan gıdası olarak kullanılan türler bu familyadandır. Bu bitkinin literatürdeki bazı kullanımları; kalp hastalıklarına karşı koruması, sırt ağrılarını iyileştirmesi, ciğer tıkanıklığına faydalı olması, vücut direncini artırması, kırılan kemikleri iyileştirmesi şeklindedir (28).



Resim 7. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisi

5.2.2. Bitki Materyalinin Temini

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisi Temmuz 2010'da Türkiye'nin kuzeydoğusundaki Bayburt ilinin Kopuz Köyü çevresinden (2900 m) toplanmıştır. Bitki doğrulanması Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Kamil Coşkunçelebi'ye yaptırılmıştır. Tüm bitki materyali Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü herbaryumunda muhafaza edilmiş ve analiz süresine kadar oda sıcaklığında açık havada kurutulmuştur.

5.3. Uçucu Yağların İzolasyonu

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisinden 50 gram alınarak parçalanmış şekilde Clevenger balonuna koyuldu. Balona yaklaşık 400 mL kadar su ilave edildi. Clevenger düzeneğinde bitki 3 saat su buharı destilasyonuna tabi tutuldu. -15 °C deki soğutma banyosuyla soğutularak su üzerinde toplandı. Bitkiden elde edilen uçucu yağlar, 0.5 mL n-hegzan ile çözülerek alındı. 2 µL'si GC-MS cihazında viallere konularak analizleri yapıldı. Kullanılan GC-MS cihazındaki uçucu yağların konulduğu vialler Resim 8'de gösterilmiştir.



Resim 8. GC-MS cihazındaki uçucu yağların konulduğu vialler

5.4. Antimikrobiyal Aktiviteleri

Antimikrobiyal aktivite testi için kullanılan bütün mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsünden alınmıştır. Bu mikroorganizmalar; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* 702 Roma, *Mycobacterium smegmatis* ATCC607 ve *Candida albicans* ATCC 60193' dür.

5.4.1. Agar Jel Difüzyon Metodu

İzole edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri, agar-jel difüzyon metodu kullanılarak tayin edilmeye çalışıldı. Her bir mikroorganizma Mueller Hinton (MH) (Difco, Detroit, MI) suyunda bir süre bekletildikten sonra, mililitresinde yaklaşık olarak 106 koloni oluşturulacak biçimde seyreltilti. Daha sonra Mueller Hinton Agar (MHA)

ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, MI) üzerine aşılanarak kurutuldu. *Candida tropicalis* mikroorganizması için sadece SDA kullanıldı. Agarlardan, steril bir mantar matkabı kullanılarak 5 mm'lik kuyucuklar kesildi ve bu kuyucuklara 50 µl numune konuldu. Plakalar 35 °C' de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Antimikrobiyal aktivite, test organizmalarına karşı meydana gelen inhibisyon alanları ölçülerek belirlenmiştir. Ampicillin (10 µg) standart ilaç olarak ve dimetilsülfoksit çözücü olarak kullanılmıştır (29,30).

5.5. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan aletler, cihazlar ve satın alındıkları firmalar Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Satın Alındıkları Firmalar

Ad	Satın Alındığı Firma
GC-MS	Shimadzu
Clevenger	Wisetherm Heating Mantle
Sıcaklık Kontrol Sistemi	Poly Science Chiller
Tartı	Gec Avery
Blendir	

6.BULGULAR ve SONUÇLAR

Bu çalışmada *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisine ait uçucu yağların GC-MS cihazı ve SPME yöntemi ile analizi yapıldı. Analiz sonucunda, bitkiye ait toplam bileşiklerin yapısı aydınlatıldı. Yapısı aydınlatılan bileşikler monoterpen, monoterpenoid, seskiterpen, seskiterpenoid halinde 4 sınıf olarak gruplandırıldı. Bitkide, toplam clevenger yöntemi ile yirmi yedi, SPME yöntemi ile otuz uçucu yağ bileşiği tespit edildi.

6.1. Clevenger Yöntemi Sonuçları

Clevenger yöntemi ile *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisine ait toplam 27 uçucu yağ bileşeni tespit edilmiştir. Bu uçucu yağ bileşenleri; 11 monoterpen, 14 monoterpenoid, 1 seskiterpen, 1 seskiterpenoid bileşiklerinden oluşmaktadır.

6.2. SPME Yöntemi Sonuçları

SPME yöntemi ile toplam bu bitkiden 30 uçucu yağ bileşeni elde edilmiştir. Bu uçucu yağ bileşenleri; 12 monoterpen, 9 monoterpenoid, 9 seskiterpen bileşiklerinden oluşmaktadır.

Tablo 7. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin GC-MS Uçucu Yağ Bileşenlerinin Sınıflandırılması

Bileşik Sınıfı	Clevenger		SPME	
	%Alan	Bileşiklerin Sayısı	%Alan	Bileşiklerin Sayısı
Monoterpen	27.03	11	53.71	12
Monoterpenoid	69.49	14	14.15	9
Seskiterpen	0.14	1	18.96	9
Seskiterpenoid	0.2	1	-	-
Diğerleri	68.2	15	31.84	15

Tablo 8. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin Kimyasal Sınıf Dağılımındaki Anabileşenler

Bileşik Sınıfı	Clevenger			SPME		
	Ana Bileşen	% Alan	RI	Ana Bileşen	% Alan	RI
Monoterpen	Camphene	9.64	946	β - Phellandrene	16.28	1038
Monoterpenoid	Camphor	44.60	1246	Isobornyl formate	6.6	1239
Seskitерpen	<i>trans</i> -Caryophyllene	0.14	1434	α - Copaene	5.05	1380
Seskitерpenoid	Juniper camphor	0.2	1688	-	-	-

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisine ait elde edilen sonuçlardan, Clevenger ve SPME yöntemleriyle sırasıyla toplam 27 ve 30 tane uçucu yağ elde edilmiştir. Tablolarda görüldüğü gibi Clevenger yöntemi ile yapılan analizde monoterpenoid grubu ana bileşenlerini oluştururken SPME yöntemine göre ise monoterpenler ana bileşenleri oluşturmaktadır. Clevenger yöntemi için Camphor, SPME yöntemi için de β - Phellandrene ana bileşen olarak tespit edilmiştir. Tablo 7’de *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisine ait 4 uçucu yağ sınıfına göre yüzde bileşimler verilmiş. Bu bitkinin toplam olarak uçucu yağ bileşen yüzdeleri, Clevenger için %96.86, SPME için %86.82 olarak belirtilmiştir. Clevenger yönteminde, monoterpenoid grubu %69.49 bulunurken SPME metodunda %14.15 tespit edilmiştir.

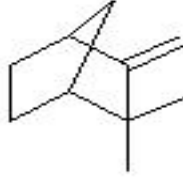
Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisi içerisinde uçucu yağlardan Camphor ve β - Phellandrene büyük terpen türleridir. Karşılaştırma amaçlı yapılan bu çalışmada her iki destilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu bileşenlerin benzer oldukları gözlenmiştir. Tablo 8’ de temel gruplardan daha az miktarda olan farklı grupların yüzdeleri de gösterilmektedir. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisinin literatürde bulunan uçucu yağ verilerine bakıldığında temel bileşenlerinin camphor, izobornil format, trans-chrysanthenly asetat, kamfen, trans-karyofilen olduğu görülmektedir.

Tablo 9. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin Tüm Uçucu Bileşenleri

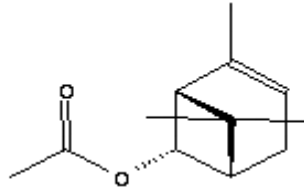
No	Bileşikler	Clevenger		SPME		DeneyRI	Sapt. (RI/MS)
		%B	%Alan	%B	%Alan		
1	α -Thujene	98	5.99			938	931
2	α -Pinene	97	1.71	97	2.60	945	939
3	Thuja-2,4(10)-diene	96	3.83			955	953
4	Camphene	97	9.64	97	3.16	957	946
5	Sabinene	97	0.55	97	2.76	973	969
6	β -Pinene	97	0.5	97	11.04	978	974
7	Myrcene			96	12.85	997	991
8	α -Phellandrene	96	0.15	95	0.27	1009	1002
9	Δ -3-Carene			97	1.09	1020	1008
10	α -Terpinene	98	0.57			1020	1014
11	<i>p</i> -Cymene	95	2.89	85	0.61	1028	1020
12	Thujol	88	2.75			1036	
13	β - Phellandrene			95	16.28	1038	1031
14	trans- β -Ocimene			97	1.86	1042	1044
15	γ -Terpinene	97	0.96	94	0.62	1066	1054
16	cis-Sabinene hydrate			93	0.25	1076	1068
17	Terpinolene	93	0.24	87	0.57	1095	1086
18	Linalool	97	0.66	98	1.74	1102	1095
19	Phellandral	95	0.45			1114	
20	trans- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	93	0.53			1135	1136
21	Camphor	98	44.60	97	0.50	1148	1141
22	Borneol			97	1.06	1167	1165
23	cis-Pinocarveol	95	1.42			1178	1182
24	4-Terpineol	96	2.41	94	0.35	1189	1177
25	<i>p</i> -Cymen-8-ol	93	0.27			1194	1183
26	α -Terpineol	97	0.39	91	0.65	1193	1186
27	trans-Piperitol	95	0.23	95	0.40	1214	1027
28	Isobornyl formate			96	6.60	1239	1235
29	trans-Chrysanthenyl Acetate	96	11.78			1246	1235
30	Chrysanthenone	84	0.35			1262	
31	Isobornyl acetat	88	3.13	97	2.60	1289	1283
32	Carvacrol	97	0.52			1301	1298
33	Δ -Elemene			93	0.33	1347	1339
34	α - Copaene				5.05	1380	1374
35	β -Bourbonene			96	1.06	1394	1387
36	β -Elemene			96	2.46	1396	1389
37	trans-Caryophyllene	95	0.14	97	3.97	1434	1438
38	α -Humulene			98	1.71	1469	1452
39	γ -curcumene			85	0.28	1488	1481
40	Germacrene D			94	2.23	1495	1484
41	δ -Cadinene			97	1.87	1535	1522
42	Juniper camphor	91	0.2			1688	1691
	Toplam			96.86	86.82		

Bu çalışmada *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisinin GC-MS cihazı ile clevenger yöntemine göre toplam 27 uçucu bileşen, SPME yöntemine göre de toplam

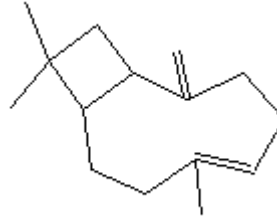
30 adet uçucu bileşen saptanmış olup toplamda her iki yöntem ile 42 adet uçucu bileşen belirlenmiştir. Tabla 9’da toplam uçucu bileşenler gösterilmiştir. Aşağıda bu bileşiklerden bazılarının sınıflarına göre moleköl yapıları verilmiştir.



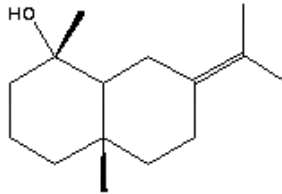
(4) Kamfen (Monoterpen)



(29) *trans*-Chrysanthemyl Acetate (Monoterpenoid)



(37) *trans*-Caryophyllene (Seskitерpen)



(42) Juniper camphor (Seskitерpenoid)

6.3. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisinin uçucu yağlarının sahip olduğu antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek amacıyla yapılan antimikrobiyal aktivite testleri

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) yöntemine göre yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testi *Escherichia coli* ATCC 25922, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* 702 Roma, *Mycobacterium smegmatis* ATCC607 ve *Candida albicans* ATCC 60193 mantarlarına karşı standart antimantar ajan olarak Ampicillin kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 10. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Num.	Stok. µg/ml	Mikroorganizmalar ve İnhibisyon alanı (mm)						
		Ec	Yp	Sa	Ef	Bc	Ms	Ca
<i>L. laxiflors</i>	33	9	18	-	-	-	15	-
Ampicillin	10	10	18	35	10	15	10	-

(Ec: *Escherichia coli* ATCC 25922, Yp: *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 911, Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ef: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Bc: *Bacillus cereus* 702 Roma, Ms: *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, Ca: *Candida albicans* ATCC 60193)

6 tür bakteri, 1 tür mantar ile yapılan bitkinin antimikrobiyal aktivite çalışmasında daha çok gram negatif bakterilere karşı aktivite gözlenmiş, gram pozitif bakterilere aktivite göstermemiştir. Standart olarak kullanılan maddeler gibi mantar türü üzerinde de bu bitkinin aktivitesi gözlenmemiştir.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları temel alınarak aktiviteleri belirlenen bakteri ve mantarlar Tablo 10’da gösterilmiştir.

7. TARTIŞMA

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisine ait uçucu yağlar, su buharı destilasyonu ile elde edilerek, GC-MS, GC-FID yöntemleriyle analiz edilmiş ayrıca SPME yöntemi ile de uçucu bileşenleri analiz edilmiştir. GC-MS analizi sonucu yapısı aydınlatılan 42 adet bileşik 5 ayrı türde sınıflandırılmıştır. Sınıflarına göre bu terpenlerin maximum miktarda bulunan bileşikleri Tablo 8 'de verilmiştir. Clevenger yöntemiyle yapısı aydınlatılan bu bitkinin neredeyse tamamını terpenler oluşturmaktadır. Terpenler günümüzde ilaç, gıda, kozmetik gibi alanlarda kullanıldığından dolayı bu tür bileşikler bitkilerin uçucu yağlarından izole edilebilirler. Toplamda belirlenen 42 adet uçucu bileşenin, 27 tanesi clevenger yöntemi ile 30 tanesi ise SPME yöntemi ile belirlenmiştir. Yapısı aydınlatılan terpenlerden monoterpenler %27.03, monoterpenoidler %69.49, seskiterpenler %0.14, seskiterpenoidler %0.2, diğerleri %68.2 'lik alan kaplamakta olup, %69.49 oranla monoterpenoidler en fazla bulunan terpen sınıfını oluşturmaktadır.

Elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi aydınlatılmış olup, yağ verimi %0.22 olmasına rağmen büyük bir kısmını monoterpenoidlerin oluşturduğu zengin bir kimyasal bileşime sahip olduğu görülmüştür.

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisinin clevenger yöntemi ile belirlenen ana bileşenleri; camphene (9.64), camphor (44.60), *trans*-Caryophyllene (0.14), Juniper camphor (0.2)'dir. SPME yöntemi ile belirlenen bitkideki ana bileşenler ise; β -Phellandrene (16.28), Isobornyl formate (6.6), α -Copaene (5.05)'dir.

Bu bitkilerdeki yapısı aydınlatılamayan bileşikler farklı spektroskopik yöntemlerle aydınlatılabilir. İzole edilen bileşiklerin, antimikrobiyal aktiviteleri incelenip tıbbi amaçla kullanılabilirlikleri araştırılabilir.

Lathyrus laxiflorus subsp. *laxiflorus* bitkisine ait uçucu yağlara Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) yöntemine göre antimikrobiyal aktivite testleri uygulanmıştır. Bu test sonuçlarına göre; 6 bakteri ve 1 mantar üzerinde test edilmiştir ve daha çok gram negatif bakterilere karşı aktivite gösterdiği görülmüştür.

8. ÖNERİLER

Bu çalışmada *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* bitkisinin GC-MS cihazı ile cleavenger yöntemine göre toplam 27 uçucu bileşen, SPME yöntemine göre de toplam 30 adet uçucu bileşen saptanmış olup toplamda 42 adet uçucu bileşen belirlenmiştir. Yapısı aydınlatılan bileşiklerin çoğunun terpen sınıfı olduğu görülmektedir ve terpenlerin kullanım alanları oldukça geniş olduğundan bu tür bileşikler izole edilip, saf hale getirilip, antimikrobiyal aktiviteleri incelenebilir.

Bu çalışmada yapılan antimikrobiyal testi 6 bakteri ve 1 mantar üzerinde test edilmiştir. Elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal aktiviteleri bu mantar ve bakteriler haricinde farklı mikroorganizmalar üzerinde incelenip aktivite gösterip göstermedikleri incelenebilir.

9. KAYNAKLAR

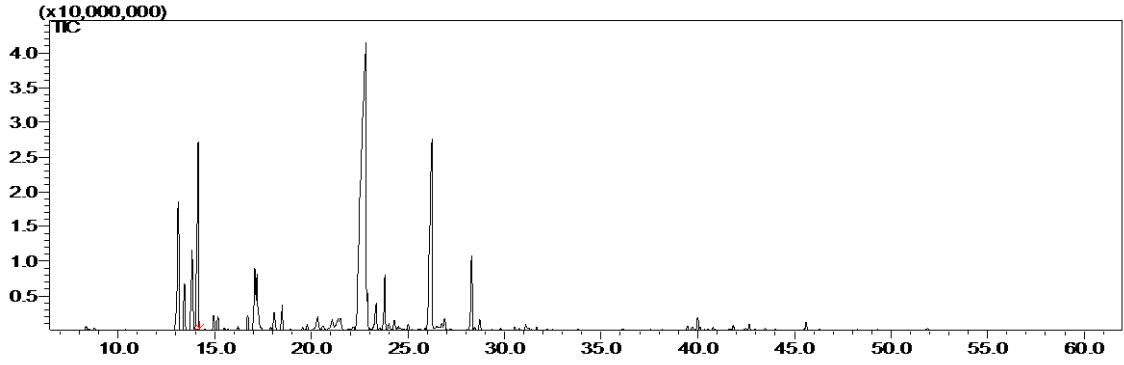
1. Akkurt A (2011). Bazı *centaurea l.* türlerinin uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
2. Miguel MG (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils. A Short Review Molecules 15: 9252-9287.
3. Davis PH (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol 3:328-369.
4. Akgül A (1993). Baharat bilimi ve teknolojisi. Gıda teknolojisi derneği yayınları No 15(1-56:101-104).
5. Ahmad I, Mehmood Z, Mohammed F (1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. J Ethnopharmacol 62:113-115.
6. Perez C, Pauli M, Bazerque P (1990). An antibiotic assay by agar well diffusion method. Acta Bio Med Exp 15:113-115.
7. Toroğlu S, Çenet M (2006). Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metotlar. KSU Journal of Science and Engineering 9:12-20.
8. Güleç C, Yaylı N, Yeşilgil P, Terzioğlu S, Yaylı N (2007). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from the flowers of delphinium formosum. Asian J Chem 19: 4069-4074.
9. Essential Oils. Bu siteden erişilebilir: <http://www.buzzle.com/articles/aromatherapy-essential-oils.html>. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
10. Kılıç A (2008). Uçucu yağ elde etme yöntemleri. Bartın Orman Fakültesi Dergisi 10:13.
11. Holistik Aromaterapi. Bu siteden erişilebilir: http://www.webnaturel.com/index.asp?alt_cat_id=102&cat_id=4&ayrintiid=1853. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.

12. Aromatherapy Essential Oils - Methods of Extraction of Aromatic Essential Oils. Bu siteden erişilebilir: <http://www.buzzle.com/articles/aromatherapy-essential-oils-methods-extraction-aromatic.html>. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
13. Çelik E, Çelik GY (2007). Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 5:1-6.
14. Ünlü N, Hışıl Y (1997). Kapiler gaz kromatografisi ile birleştirilmiş süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve bu sistemin aroma malzemelerinin analizinde kullanımı. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi No 15(1-2:203-217).
15. Sarker SD, Latif Z, Gray AI (2006). Natural products isolation. New Jersey 2(27-46:47-76).
16. İskefiyeli Z (2010). Ormangülü uçucu yağ ve ekstraktlarının kimyasal bileşimleri ve biyolojik aktiviteleri. Yüksek Lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
17. Wikipedia. Bu siteden erişilebilir <http://www.tr.wikipedia.org/wiki/terpen/>. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
18. Yılmaz İskender N (2007). Türkiye doğal *viburnum l.* (caprifoliaceae) türlerinin uçucu yağ bileşimleri ve antimikrobiyal aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
19. Terpenes and Their Derivatives. Bu siteden erişilebilir: <http://www.vcampus.uom.ac.mu/upload/public/2003122103128.pdf>. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
20. Ikan R (1991). Natural products. Academic Press Inc, California.
21. Altınışik M. Spektroskopik analiz yöntemleri. Bu siteden erişilebilir: <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/45-uzm-02.pdf>. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
22. Kromatografinin Sınıflandırılması. Bu siteden erişilebilir <http://www.kimyasanal.net/yukle/kromatografi.doc/Kromatografi/>. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.

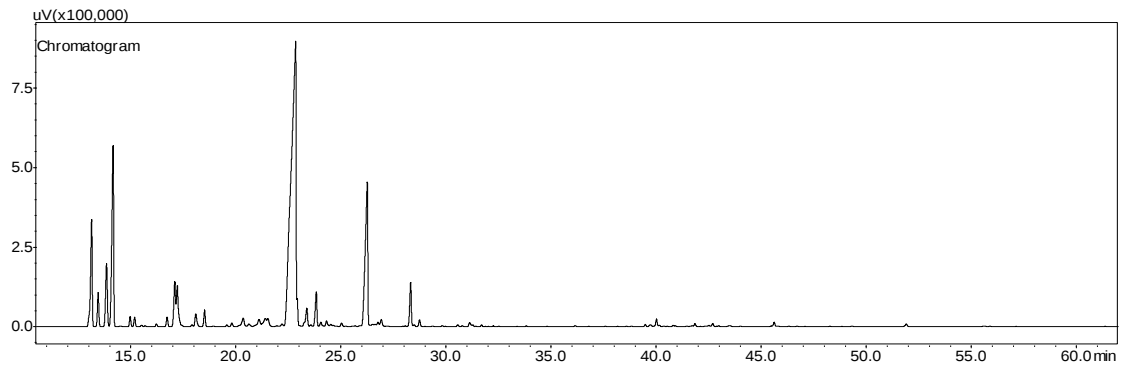
23. GC Columns. Bu siteden erişilebilir. http://testequipment.globalspec.com/LearnMore/Labware_Test_Measurement/Chromatography_Instruments/GC_Columns. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
24. Wikipedia. Bu siteden erişilebilir: http://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography-mass_spectrometry. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
25. Douglas F. GC-MS Analysis. Bu siteden erişilebilir: <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html> 04.04.08. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
26. Dedektörler. Bu siteden erişilebilir http://portal.firat.edu.tr/Disaridan/_TEMP/94/file/GAZ%20KROMATOGRAF%C4%B0S%C4%B0-1.pdf. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
27. Vanden B, Vlietinck AJ (1991). Screening methods for antimicrobial and antiviral agents from higher plants. Academic Press 37-53.
28. Wikipedia. Bu siteden erişilebilir <http://tr.wikipedia.org/wiki/Baklagiller>. Erişilebilir tarih: 19 Mayıs 2014.
29. Yılmaz N, Yaylı N, Mısır G, Coşkunçelebi K, Karaoğlu Ş, Yaylı N (2008). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Viburnum opulus*, *Viburnum lantana* and *Viburnum orientalis*. Asian J Chem 20:3324-3330.
30. Terzioğlu S, Yaşar A, Yaylı N, Yılmaz N, Karaoğlu Ş, Yaylı N (2008). Antimicrobial activity and essential oil compositions of two *Ranunculus* species from Turkey. Asian J Chem 20:3277-3283.

10. EKLER

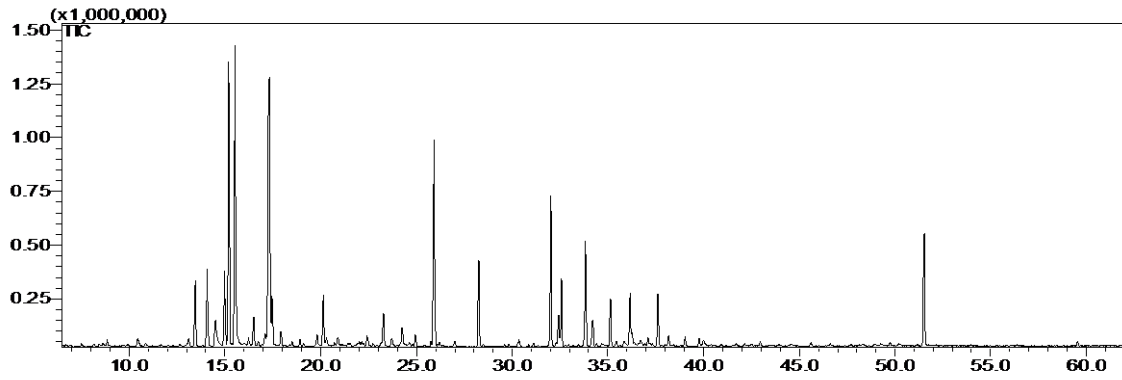
Ek 1. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin GC-MS Spektrumu



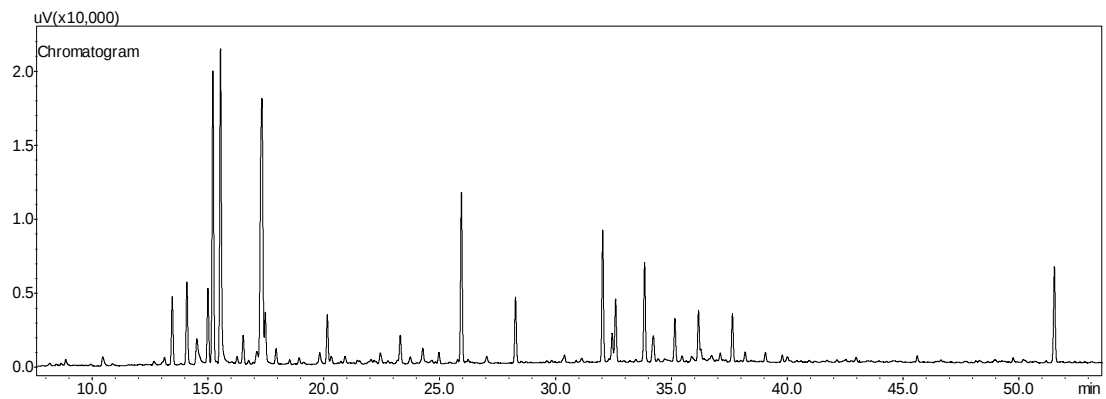
Ek 2. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin GC-FID Spektrumu



Ek 3. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin GC-MS-SPME Spektrumu



Ek 4. *Lathyrus laxiflorus* subsp. *laxiflorus* Bitkisinin GC-FID-SPME Spektrumu



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : İrem, Kurt
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 10.10.1987/Şişli
Medeni hali : Bekar
E-Posta : iremkurt87@hotmail.com
Yazışma adresi : Üniversite Mahallesi Yılmazlar Sitesi A-1
Blok Kat:2 Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	2014
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2012
Lise	Aydın (YDA) Lisesi	2005

YABANCI DİL

İngilizce