



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERİN
SENTEZİ İLE BAZI *ORIGANUM* TÜRLERİNİN
EKSTRAKSİYONU, GC-MS ANALİZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTE UYGULAMALARI**

Nevin ULAŞ ÇOLAK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara 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 kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

31.5.2023

Nevin ULAŞ ÇOLAK
(İmza)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

xii

ŞEKİLLER DİZİNİ

xiv

RESİMLER DİZİNİ

xvi

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xviii

ÖZET

xxi

ABSTRACT

xxii

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Botanik Bilgiler

3

2.1.1. Labiatae (Lamiaceae) Familyası

3

2.1.2. *Origanum* Türleri

3

2.1.3. *Origanum* Türlerinin Morfolojik Özellikleri

4

2.1.4. *Origanum* Türlerinin Takson Bilgileri

5

2.1.5. *O. minutiflorum* 'un Türkiye'de dağılımı

6

2.1.6. *O. micranthum* 'un Türkiye'de dağılımı

7

2.2. Derin Ötektik Çözücüler

7

2.3. Doğal Derin Ötektik Çözücüler

10

2.4. Derin Ötektik Çözücülerin Hazırlanması

11

2.5. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Fiziksel Özellikleri

11

2.5.1. Donma Noktası

12

2.5.2. Yoğunluk

12

2.5.3. Polarite

13

2.6. Derin Ötektik Çözücülerin Uygulamaları

13

2.7. Deney Tasarımı

14

2.7.1. Deneysel Tasarımın Tarihçesi	15
2.7.2. Deney Tasarımında Kullanılan Değişkenler	17
2.7.3. Deneysel Tasarımın Temel İlkeleri	17
2.7.4. Deneysel Tasarımın Uygulanması	18
2.8. Deney Tasarım Türleri	19
2.8.1. Faktöriyel Tasarımlar	20
2.8.1.1. İki Seviyedeki Faktörlerle Faktöriyel Deneyler (2^2 Faktöriyel Deney)	23
2.8.1.2. Üç Seviyedeki Faktörlerle Faktöriyel Deneyler (2^3 Faktöriyel Deney)	29
2.8.2. Yüzey Yanıt Metodolojisi	32
2.8.2.1. Merkezi Kompozit Tasarım	33
2.8.2.2. Box- Behnken Tasarım	36
2.9. Biyolojik Aktivite	38
2.9.1. Serbest Radikal Türleri	39
2.9.2. Antioksidanlar ve Antioksidan Aktivite	40
2.9.3. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri	43
2.9.3.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürme Tayini	43
2.9.3.2. (FRAP) Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç Tayini	44
2.9.3.3. (CUPRAC) Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini	46
2.9.4. <i>Origanum</i> Türlerinin Üzerinde Yapılan Antioksidan Çalışmalar	47
2.9.5. Antimikrobiyal Aktivite	48
2.9.5.1. Dilüsyon Yöntemi	51
2.9.5.2. Difüzyon Yöntemi	51
2.9.6. <i>Origanum</i> Türlerinin Üzerinde Yapılan Antimikrobiyal Çalışmalar	52
2.10. Kromatografik Yöntemler	53
2.10.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması	54
2.10.2. Gaz Kromatografisi	55
2.10.2.1. Taşıyıcı Gaz	57
2.10.2.2. İnjektasyon Bölmesi	57
2.10.2.3. Ayırma Portu (Kolon)	58
2.10.2.4. Kolon Fırını	59
2.10.2.5. Dedektörler	60
2.10.2.6. Rezolüsyon ve Bileşenlerin Ayrılması	62
2.10.2.7. Gaz Kromatografisinde Türevlendiriciler	64

2.10.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	65
2.10.3.1. Hareketli Faz, Hareketli Faz Gaz Giderim Sistemi ve Çözücü Filtrasyonu	66
2.10.3.2. Pompalama Sistemleri	67
2.10.3.3. Gradyent Sistemler İçin Çözücülerin Karıştırılması	68
2.10.3.4. Otomatik Örnekleyiciler	69
2.10.3.5. Dedektörler	69
2.10.3.5. Kolon	71
3. GEREÇ ve YÖNTEM	73
3.1. Enstrümantasyon	73
3.1.1. Gaz Kromatografisi	73
3.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	73
3.1.3. Diğer Cihazlar	73
3.2. Bitki Örneklerinin Toplanması, Kurutulması ve Öğütülmesi	74
3.3. Derin Ötektik Çözücülerin Sentezlenmesi	75
3.3.1. Sentezlenen DDÖÇ'lerin Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Karakterizasyonu	76
3.3.2. IR Analizleri	76
3.3.3. Özkütle Hesaplanması	76
3.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri	76
3.3.5. En İyi Verime Sahip DDÖÇ 'ün Belirlenmesi	77
3.4. Türlerin Ekstraksiyonu	77
3.5. Gaz Kromatografisi Yöntemleri Deneysel Koşulları	78
3.5.1. Uçucu Yağların Eldesi	79
3.5.2. Uçucu Bileşenlerinin Aydınlatılması	80
3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Deneysel Koşulları	80
3.6.1. Yöntem Validasyonu	82
3.6.1.1. Sistem Uygunluğu	82
3.6.1.2. Doğrusallık	82
3.6.1.3. LOD ve LOQ	82
3.6.1.5. Geri Kazanım ve Kesinlik	83
3.6.1.6. Seçicilik	83
3.7. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları	84
3.8. Antioksidan Aktivite Çalışmaları	86

3.8.1. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini	86
3.8.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini	86
3.8.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini	87
3.9. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	88
3.9.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Testi	88
3.10. Deney Tasarımının Design-Expert-11.1.2 ile Kurgulanması	88
3.10.1. Faktörlerin Belirlenmesi	90
3.10.2. Box-Behnken Optimizasyonu	90
4. BULGULAR	92
4.1. Sıvı Formunu Koruyan Doğal Derin Ötektik Çözeltiler	92
4.2. Başlangıç Maddelerine ait IR Spektrumları	92
4.3. Sentezlenen Doğal Derin Ötektik Çözeltilere ait IR Spektrumları	97
4.4. Derin Ötektik Çözücülerin Fiziksel Özellikleri	98
4.4.1. Sentezlenen Derin Ötektik Çözücülerin Gravimetrik Özkütle Tayinleri	98
4.4.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analiz Sonuçları	99
4.5. Clevenger Ekstaksiyonundan Elde Edilen Yağların GC-MS Analiz Sonuçları	100
4.5.1. <i>O. micranthum</i> Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları	100
4.5.2. <i>O. minutiflorum</i> Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları	101
4.6. Ön Muamele Yapılan Bitkilerin GC-MS Analiz Sonuçları	102
4.6.1. <i>O. micranthum</i> Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları	102
4.6.2. <i>O. minutiflorum</i> Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları	104
4.7. Validasyon Parametreleri	107
4.7.1. Sistem Uygunluğu	107
4.7.2. Doğrusallık	107
4.7.3. LOD ve LOQ	108
4.7.4. Geri Kazanım ve Kesinlik	108
4.7.5. Seçicilik	109
4.7.6. Gerçek Numunelerde Fenolik Bileşik Analizleri	109
4.8. Antioksidan Aktivite Sonuçları	111
4.8.1. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Sonuçları	111
4.8.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Sonuçları	112
4.8.3. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Sonuçları	113

4.9. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	119
4.9.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Testi Sonuçları	119
4.10. Fraksiyonel Faktöriyel Analiz Sonuçları	120
4.11. Box-Behnken Optimizasyonu	122
5. TARTIŞMA	129
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	139
7. KAYNAKLAR	141
EKLER	154
EK 1. <i>O. micranthum</i> Bitkinin FID Kromatogramı	154
EK 2. <i>O. micranthum</i> Bitkinin KS Kromatogramı	155
EK 3. <i>O. minutiflorum</i> O. Schwarz & PH. Davis Bitkisinin FID Kromatogramı	156
EK 4. <i>O. minutiflorum</i> O. Schwarz & PH. Davis Bitkisinin KS Kromatogramı	157
EK 5. Ön Muameleli <i>O. micranthum</i> Bitkinin FID Kromatogramı	158
EK 6. Ön Muameleli <i>O. micranthum</i> Bitkinin KS Kromatogramı	159
EK 7. Ön Muameleli <i>O. minutiflorum</i> O.Schwarz & PH Davis Bitkisinin FID Kromatogramı	160
EK 8. Ön Muameleli <i>O. minutiflorum</i> O.Schwarz & PH Davis Bitkisinin KS Kromatogramı	161
EK 9. <i>O. micranthum</i> Bitkisinin d1 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	162
EK 10. <i>O. micranthum</i> Bitkisinin d2 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	163
EK 11. <i>O. micranthum</i> Bitkisinin d3 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	164
EK 12. <i>O. micranthum</i> Bitkisinin 24 Saat Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	165
EK 13. <i>O. micranthum</i> Bitkisinin MW Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	166
EK 14. <i>O. minutiflorum</i> 'in Bitkisinin d1 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	167
EK 15. <i>O. minutiflorum</i> 'in Bitkisinin d2 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	168

EK 16. <i>O. minutiflorum</i> 'in Bitkisinin d3 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	169
EK 17. <i>O. minutiflorum</i> 'in Bitkisinin 24 Saat Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	170
EK 18. <i>O. minutiflorum</i> 'in Bitkisinin MW Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı	171
ÖZGEÇMİŞ	172



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Türkiye’de yetişen <i>Origanum</i> türleri	5
Tablo 2.	Derin ötektik çözücülerin sınıflandırılması ve genel formülasyonları	10
Tablo 3.	Derin ötektik çözücülerin hazırlanma yöntemleri	12
Tablo 4.	İki faktörlü deney tasarımı matrisi	27
Tablo 5.	2 ² faktörlü deneyin ANOVA tablosu	28
Tablo 6.	Üç faktörlü deney tasarımı matrisi	30
Tablo 7.	2 ³ faktörlü deneyin ANOVA tablosu	31
Tablo 8.	Merkezi kompozit türleri ve Box-Behnken tasarımlarının üç faktör için yapısal karşılaştırmaları	37
Tablo 9.	Merkezi kompozit ve Box-Behnken tasarımlarına gereken işlem sayısı	38
Tablo 10.	Biyolojik sistemlerde yer alan bazı radikaller	39
Tablo 11.	Kullanılan araç ve gereçler	73
Tablo 12.	Derin ötektik çözücü sentezi için kullanılan kimyasallar	75
Tablo 13.	Derin ötektik çözücü kombinasyonları	76
Tablo 14.	GC-MS deneysel koşullar	78
Tablo 15.	Fenolik bileşiklerin analizinde kullanılan hplc şartları	81
Tablo 16.	Gradient elüsyonda kullanılan çözücü oranları ve değişim zamanı	82
Tablo 17.	Antioksidan tayinler için kullanılan kimyasallar	84
Tablo 18.	Antioksidan tayinler için kullanılan çözeltiler	85
Tablo 19.	Tasarım programı	89
Tablo 20.	Box- Behnken tasarım programı	90
Tablo 21.	Sıvı formunu koruyabilen derin ötektik karışımlar	91
Tablo 22.	Sıvı formunu koruyabilen derin ötektik karışımların fiziksel özellikleri	98
Tablo 23.	Derin ötektik çözücülerin özkütle değerleri	98
Tablo 24.	<i>O. micranthum</i> bitkisinin GC-MS analiz sonuçları	101
Tablo 25.	<i>O. minutiflorum</i> bitkisinin GC-MS analiz sonuçları	102
Tablo 26.	Ön muamele yapılan <i>O. micranthum</i> bitkisinin GC-MS analiz sonuçları	103

Tablo 27. Ön muamele yapılan <i>O. minutiflorum</i> bitkisinin GC-MS analiz sonuçları	104
Tablo 28. <i>O. micranthum</i> ve <i>O. minutiflorum</i> bitkilerinin kimyasal sınıf dağılımı	105
Tablo 29. Bileşik sınıfı ve türlere göre % dağılımı	106
Tablo 30. Fenolik bileşikler için bulunan sistem uygunluk parametreleri	107
Tablo 31. Fenolik bileşikler için kalibrasyon parametreleri	107
Tablo 32. Fenolik bileşikler için LOD ve LOQ değerleri	108
Tablo 33. Fenolik bileşikler için geri kazanım değerleri	108
Tablo 34. Bitki örneklerine ait fenolik bileşen analiz sonuçları	109
Tablo 35. Agar kuyucuk metodu ile tespit edilen zon çapları	119
Tablo 36. Faktöriyel tasarım ANOVA verileri	121
Tablo 37. Box-Behnken ANOVA karesel model verileri	122
Tablo 38. Box-Behnken optimizasyonu p değerleri tablosu	127
Tablo 39. Gerçek faktörler açısından nihai denklem	128
Tablo 40. Gerçek faktörler açısından nihai denklem(simgesel)	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Deney tasarımı süreci	15
Şekil 2.	Deney tasarım türleri	19
Şekil 3.	İki faktör için merkezi bileşik tasarımı	33
Şekil 4.	Üç tip merkezi kompozit tasarımı	35
Şekil 5.	Üç faktör için Bir Box-Behnken tasarımı	36
Şekil 6.	Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması	55
Şekil 7.	1-Oktadekanol/timol karışımına ait DSC taraması	99
Şekil 8.	1-Hegzadekanol/timol karışımına ait DSC taraması	99
Şekil 9.	<i>p</i> -kumarik asit/TBAB karışımına ait DSC taraması	100
Şekil 10.	Bitki örneklerine ait fenolik asitler ve bağıl bollukları	110
Şekil 11.	CUPRAC tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği	111
Şekil 12.	<i>Origanum</i> türlerine ait ekstrelerin CUPRAC tayini sonuçlarının karşılaştırılması	111
Şekil 13.	FRAP tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği	112
Şekil 14.	<i>Origanum</i> türlerine ait ekstrelerin FRAP tayini sonuçlarının karşılaştırılması	112
Şekil 15.	DPPH tayininde kullanılan BHT'ye ait kalibrasyon grafiği	113
Şekil 16.	OMK-MW DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	113
Şekil 17.	OMK-24 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	114
Şekil 18.	OMF-MW DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	114
Şekil 19.	OMK-24 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	114
Şekil 20.	OMK-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	115
Şekil 21.	OMF-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	115
Şekil 22.	OMK-Ö-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	115
Şekil 23.	OMF-Ö-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	116
Şekil 24.	OMK-d1 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	116
Şekil 25.	OMK-d2 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	116
Şekil 26.	OMK-d3 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	117
Şekil 27.	OMF-d1 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	117
Şekil 28.	OMF-d2 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	117

Şekil 29.	OMF-d3 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu	118
Şekil 30.	<i>Origanum</i> türlerine ait ekstrelerin DPPH tayini sonuç karşılaştırılması	118



RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	<i>O. minutiflorum</i> bitkisinin Türkiye’de dağılımı	6
Resim 2.	<i>O. micranthum</i> bitkisinin Türkiye’de dağılımı	7
Resim 3.	Farklı karışımların erime sıcaklıklarının şematik faz diyagramı	9
Resim 4.	Antioksidan çalışma mekanizmaları	41
Resim 5.	Antioksidan türleri	43
Resim 6.	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali	44
Resim 7.	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalının H transferi yapılmış hali	44
Resim.8.	2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ) molekülü	45
Resim 9.	Fe(III)-TPTZ’nin antioksidan varlığında Fe(II)-TPTZ’ne indirgenmesi	45
Resim 10.	2,9-dimetil- 1,10-fenantrolin (Neokuproin) molekülü	46
Resim 11.	Bakır(II)-neokuproin kompleksi	46
Resim 12.	Bakır (I)-neokuproin kompleksi	47
Resim 13.	Disk difüzyon test görseli ve inhibisyon çap ölçümü	51
Resim 14.	Kromatografinin tarihsel gelişimi	53
Resim 15.	Gaz kromatografisinin şematik gösterimi	56
Resim 16.	Split/Splitless injeksiyon bölmesi	57
Resim 17.	Dolgulu kolon piki ve kılcal kolon piki	58
Resim 18.	GC-MS analizlerinde kullanılan kapiler kolon ve kolon fırını	60
Resim 19.	Kuadrupole kütle filtresi	61
Resim 20.	Rezölüsyon ve kolon parametreleri	62
Resim 21.	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi şematik gösterimi	65
Resim 22.	Degazör gaz giderme ilkesi şematik gösterimi	67
Resim 23.	Tek pistonlu hplc pompası	68
Resim 24.	Işığın absorpsiyonu prensipli çalışan dedektörlerin şematik gösterimi	71
Resim 25.	HPLC’da analitik amaçlı kullanılan kolon	72
Resim 26.	<i>O. micranthum</i> bitkisi	74
Resim 27.	<i>O. minutiflorum</i> bitkisi	74
Resim 28.	Mikrodalga fırın ile kombine Clevenger düzeneği	79
Resim 29.	Design Expert 11.1.2 program ile elde edilen tasarım gücü	88

Resim 30.	1-Oktadekanol'e ait IR spektrumu	92
Resim 31.	1-Hegzadekanol'e ait IR spektrumu	92
Resim 32.	Sinnamik asit'e ait IR spektrumu	93
Resim 33.	<i>p</i> -Kumarik asit'e ait IR spektrumu	93
Resim 34.	Şiringik asit'e ait IR spektrumu	94
Resim 35.	Timol'e ait IR spektrumu	94
Resim 36.	Mentol'e ait IR spektrumu	95
Resim 37.	Gallik asit'e ait IR spektrumu	95
Resim 38.	TBAB'e ait IR spektrumu	96
Resim 39.	1-Oktadekanol-timol karışımına ait IR spektrumu	97
Resim 40.	<i>p</i> -Kumarik asit -TBAB karışımına ait IR spektrumu	97
Resim 41.	1-Hegzadekanol-timol karışımına ait IR spektrumu	97
Resim 42.	Faktörlerin Pareto Çizelgesi	120
Resim 43.	Shapiro-Wilk test grafiği	121
Resim 44.	Hacim minimum noktada <i>p</i> -OH model diyagramı	123
Resim 45.	Hacim merkez noktada <i>p</i> -OH model diyagramı	123
Resim 46.	Hacim maksimum noktada <i>p</i> -OH model diyagramı	124
Resim 47.	Süre faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	124
Resim 48.	Süre faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	125
Resim 49.	Hacim faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	125
Resim 50.	Hacim faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	126
Resim 51.	Sıcaklık faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	126
Resim 52.	Sıcaklık faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği	127

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

%BSS	Yüzde Bağlı Standart Sapma
%CV	Yüzde Varyasyon Katsayısı
ANOVA	Varyans Analizi
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Bütil Hidroksianisol
BHT	Bütil Hidroksitoluen
BSTFA	Bis-trimetilsililtrifloroasetamid
C₁₈	Oktadesil
CFU	Colony Forming Units
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DAD	Diode Array Dedektör
DDÖÇ	Doğal Derin Ötektik Çözücü
DES	Deep Eutectic Solvents
DLLME	Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DÖÇ	Derin Ötektik Çözücü
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil Serbest Radikal Süpürme Tayini
DSC	Differential Scanning Calorimeter
EGK	Ekstraksiyon Geri Kazanımı
FID	Flame İonization Dedector
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FSOT	Fused Silica Open Tubular
IR	İnfrared Spektroskopisi
GC-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometer
HBA	Hidrojen Bağ Alıcısı
HBD	Hidrojen Bağ Donörü
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC₅₀	Half Maximal İnhibitory Concentration
ICH	International Council for Harmonisation
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LOD	Limit of Dedection

LOQ	Limit of Quantification
MDE	Mikrodalga Ekstraksiyonu
MIC	Minimum İnhibitory Concentration
MWE	Microwave Extraction
NADES	Natural Deep Eutectic Solvents
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NMR	Nukleer Manyetik Rezonans
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasite
PTFE	Politetrafloroetilen
RBD	Rastgele Blok Tasarımı
RKT	Klor Kaynaklı Radikal
RNS	Azot Kaynaklı Radikal
ROS	Reactive Oxygen Species
RST	Kükürt Kaynaklı Radikal
SC₅₀	Yarı Maksimum Süpürücü Konsantrasyon
SCOT	Support Coated Open Tubular
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBVS	Türkiye Bitkileri Veri Servisi
TeAC	Troloks eşdeğeri antioksidan
TRAP	toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
vb	Ve Benzeri
WCOT	Wall Coated Open Tubular

Simgeler

&	Ve
k	Kapasite Faktörü
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
μ	Mikro
m	Mili
p	Para
$\pm$	Artı Eksi İşareti

$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
V	Hacim
W	Watt
tR	Alıkonma Zamanı
t_0	Ölü Zaman
m	Meta
γ	Gamma
μL	Mikrolite
$\geq$	Büyük eşittir
$\leq$	Küçük eşittir
α	Ayırma Faktörü
w	Pik zirve genişliği

Formüller

H₂O	Su
HCl	Hidroklorik asit
MeOH	Metil alkol
TPTZ	2,4,6-tripiryridil-S-triazin
TBAB	Tert- bütıl amonyum bromür
C₅H₁₄NO	Kolin klorür
COOH	Karboksilik asit
OH	Hidroksi
CO(NH₂)₂	Üre
FeCl₃	Demir(III) klorür
CuCl₂.2H₂O	Bakır(II)klorür dihidrat

ÖZET

Yeni Derin Ötektik Çözücülerin Sentezi ile Bazı *Origanum* Türlerinin Ekstraksiyonu, GC-MS Analizi ve Biyolojik Aktivite Uygulamaları

Bu tez çalışmasında, yeşil kimyanın önemli konularından biri olan derin ötektik çözücülerin sentezi ve çözücü özelliklerinin genel çözücülere kıyasla fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu ve uçucu yağ eldelerinde ön muamele reaktifi olarak kullanımı değerlendirilmiştir. Elde edilen uçucu bileşenler ve derin ötektik çözücülerle elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Sentezlenen derin ötektik çözücülerin infrared ve diferansiyel taramalı kalorimetrik analizleri karakterizasyon özellikleri aydınlatılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bitki türleri Labiatae (Lamiaceae) familyasından *Origanum micranthum* Vogel ve *Origanum minutiflorum* Schwarz Et P. H. Davis olarak seçilmiştir. Uçucu yağlar için *p*-kumarik asit-tert butil amonyum bromür kullanılmıştır. Ön muamele yapılmadan elde edilen uçucu bileşen sayısı sırasıyla 20 ve 27, döç ile edilen uçucu bileşen sayısı ise 52 ve 58 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen uçucu yağların antioksidan aktiviteleri FRAP, CUPRAC ve DPPH testleri ile analiz edildi. FRAP ve CUPRAC testleri troloks eş değeri olarak, DPPH testleri ise SC₅₀ değerleri olarak verilmiştir. Antimikrobiyal aktiviteler için patojen özellikli 1 mantar ve 4 bakteri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ön muamele yapılmadan elde edilen yağların daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ön muamele ile elde edilen uçucu yağların daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ekstraksiyon yöntemi Design Expert 11.1.2 kullanılarak optimize edildi. Ekstraksiyon sürecine en çok etki eden parametreler derin ötektik çözücü hacmi, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık olarak tespit edildi. Daha sonra Box-Behnken tasarımı ile merkez noktada 3 tekrarlı 3 parametre için çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Elde edilen model karesel ve anlamlı sonuç vermiştir. Yapılan ANOVA analizine göre R² 0.9727, CV % 5.08, Standart sapma 3.66, sinyal/gürültü oranı 14.47 olarak bulunmuştur. Derin ötektik çözücü olarak 1-hegzadekanol-timol ve 1-oktadekanol-timol çözücülerini kullanılmıştır. Fenolik bileşenlerin tespiti için kullanılan yöntem valide edilmiştir. Validasyon parametreleri sistem uygunluk, doğrusallık, LOD ve LOQ, geri kazanım ve seçicilik olarak belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Biyolojik aktivite, Derin ötektik çözücü, Kromatografi, Optimizasyon, Validasyon

ABSTRACT

Synthesis of New Deep Eutectic Solvents and Extraction of Some *Origanum* Species, GC-MS Analysis and Biological Activity Applications

In this thesis, the synthesis of deep eutectic solvents, which is one of the important topics of green chemistry, and their solvent properties compared to general solvents, the extraction of phenolic compounds and their use as a pretreatment reagent in essential oil extraction were evaluated. The antioxidant and antimicrobial activities of the extracts obtained with the volatile components and deep eutectic solvents were examined and compared. Infrared and differential scanning calorimetric analysis and characterization properties of synthesized deep eutectic solvents were elucidated. The plant species used in the thesis study were selected as *Origanum micranthum* Vogel and *Origanum minutiflorum* Schwarz Et P. H. Davis from the Labiatae family. *p*-coumaric acid- tert butyl amonium bromide was used for essential oils. The number of volatile components obtained without pretreatment was determined as 20 and 27, respectively, and the number of volatile components obtained with des was determined as 52 and 58. The antioxidant activities of the essential oils obtained were analyzed by FRAP, CUPRAC and DPPH tests. FRAP and CUPRAC tests are given as trolox equivalent, and DPPH tests are given as IC₅₀ values. For antimicrobial activities, studies were carried out on 1 fungus and 4 bacteria with pathogenic properties. It was observed that the oils obtained without pretreatment had higher antioxidant activity. Essential oils obtained by pretreatment were found to have higher antimicrobial activity. The extraction procedure was optimized using the Design Expert 11.1.2. The most influential parameters on the extraction process were determined as deep eutectic solvent volume, extraction time and temperature. Then, with the Box-Behnken design, multiple regression analysis was applied for 3 parameters with 3 repetitions at the central point. The obtained model gave square and significant results. According to the ANOVA analysis, the R² was 0.9727, the CV was 5.08%, the standard deviation was 3.66, and the signal/noise ratio was 14.4. 1-hexadecanol-thymol and 1-octadecanol-thymol solvents were used as deep eutectic solvents. The method used for the detection of phenolic compounds has been validated. Validation parameters were determined as system suitability, linearity, LOD and LOQ, recovery and selectivity.

Keywords: Biological activity, Chromatography, Deep eutectic solvent, Optimization Validation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Derin ötektik sıvılar, iyonik sıvılarla eş özelliklere sahip, yeşil kimyanın gözde alanlarından biri olmuştur. İyonik sıvılar yüksek termal kararlılığa sahip, geniş sıvı faz aralığı imkânı sağlayan çeşitli polaritelerde hazırlanabilen düşük buhar basıncına sahip sıvılardır. Derin ötektik sıvılar ise iki ya da daha fazla katının bir araya getirilerek karışımı oluşturan katılardan daha düşük erime noktasında sıvılaştıran karışımlardır (1). Ötektik dönüşümlerde karışımı oluşturan ana faz tamamen yok olur ve tamamen sıvı faza geçiş sağlanır. Tuzların katı oluşu farklı yüklü iyonların çekim gücünden kaynaklanmaktadır, yani birbiri üstüne istiflenmiş iyonlar sebebiyledir. Katı fazdan sıvı faza geçiş, bu istiflenmenin yani + ve – yüklerin arasındaki çekim kuvvetinin azaltılmasıyla sağlanmaktadır. Ötektik sıvıların oluşturulmasında bu çekim gücünün azaltılması, büyük veya simetrik olmayan maddelerin kullanımıyla istiflenmenin engellenmesi ile sağlanmaktadır. Elde edilen bu sıvılar buharlaşmaz, elektriği iyi iletir ve hemen hemen her şeyi çözebilir (1). Bu bağlamda yeni alternatif sıvıların oluşturulması yeşil kimya uygulamaları için büyük bir önem taşımaktadır.

Analitik çalışmalarda deney tasarımının yapılması çalışmaları daha etkin bir şekilde sonuçlandırmak için büyük bir önem taşımaktadır. Bir sisteme etki edecek tüm parametrelerin belirlenmesi, daha sonra bu parametrelerin sistem üzerine etkisinin ne kadar olduğunun ortaya koyulması çalışmaları daha kıymetli yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda genellikle her parametrenin sistem üzerine etkisi tek tek incelenir, daha sonra en iyi sonuç veren veriler temel alınarak çalışmalar tamamlanır. Ancak bu bakış açısıyla parametrelerin etkileşimleri incelenememekte dolayısıyla parametrelerin sistem üzerine etkileri tam olarak anlaşılamamaktadır. Deney tasarımı ile parametreler arası etkileşimlerin incelenmesi ve cevaba etkisinin nasıl yansıdığı belirlenebilir.

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkileri endemik olup antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteletleri yüksek olduğu bilinen bileşiklerdir (2). Yapılan çalışmalarda metanol ekstraktlarının yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu bildirilmiştir (2). Derin ötektik çözücüler ile muamele edilen bitkilerin uçucu bileşenlerinin ve uçucu türlerinin arttığı daha önceki çalışmalarda görülmüştür (3). Yeni sentezlenecek derin ötektik çözücülerin *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* türlerine uygulanması ile bu bitkilere ait uçucu yağ bileşimlerinin nasıl değişeceğini görmek, bu yağların endüstriyel kullanımını ile ilgili değerlendirme yapmamıza imkân tanıyacaktır.

Fenolik içeriğe sahip olduğu bilinen *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* türlerinin derin ötektik çözücüler ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin nasıl değişim göstereceği de ayrıca incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Labiatae (Lamiaceae) Familyası

Labiatae (Lamiaceae) familyası dünya üzerinde 4000 üzerinde türe sahip en büyük ve en özgün ailelerinden biridir. Bu aile dünya üzerinde kozmopolit bir dağılıma sahiptir. Labiatae (Lamiaceae) familyası en iyi uçucu yağlarıyla bilinmekte olup bu özellik ailenin birçok üyesi için ortaktır. Birçok biyolojik olarak aktif uçucu yağlar bu ailenin çeşitli üyelerinden izole edilmiştir. Labiatae (Lamiaceae) familyası yapılarında bulunan diterpenoidlerin varlığı ile de ünlüdür (4). Bu familyaya ait bitkiler tarih öncesi çağlardan beri insanlar tarafından kullanılmıştır. Arkeolojik kazılardan elde edilen kanıtlar, günümüzde sadece yabani bitkiler olarak bilinen bu familyaya ait bazı türlerin geçmişte yerel ölçekte yetiştirildiğini göstermektedir (5). Labiatae (Lamiaceae) familyası tüm dünyadaki mutfaklarda sebze ve şifalı bitkilerin ana kaynaklarından biridir. *Mentha*, *Thymus*, *Salvia*, *Coleus*, *Omicum* ve *Origanum* türleri gıda tatlandırıcıları olarak kullanılır. Ayrıca bu aileye ait çeşitli türler modern tıpta ve geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Labiatae (Lamiaceae) familyası çok çeşitli kimyasal içeriğe sahiptir. Ailenin üyelerinden terpenoidler, iridiodlar, fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi çok çeşitli bileşikler bildirilmiştir (6-9). Uçucu yağlardaki kısa zincirli terpenoidlerin bazıları bu bitkilerdeki tat ve kokudan sorumludur. Dünyanın farklı yerlerinden geleneksel yollarla aile üyelerinin farklı kullanımları da mevcuttur. *Mentha*, *Thymus*, *Lavandula*, *Ocimum*, *Origanum*, *Melissa* ve *Satureja* türleri de mutfak ve aroma bitkisi olarak kullanılmaktadır. Bu kullanımlar çoğunlukla ailede ortak olan uçucu yağların varlığından kaynaklanmaktadır. Akdeniz bölgesi, Labiatae'nin evcilleştirilmesi ve yetiştirilmesi için ana merkez olmuştur ve yetiştirilen birçok tür, bu bölgenin vahşi atalarından türetilmiştir (4).

2.1.2. *Origanum* Türleri

Origanum aynı zamanda mercanköşk ve merzengüş diye de adlandırılan türler çalimsı ya da otsu çok yıllık bitkilerden oluşur. Tüylü ve tüysüz türleri bulunmaktadır. Tüylü türleri genellikle soluk mavimsi-yeşil renkte bulunurlar. Yapraklar sapsız ya da çok az saplı eliptik, ovat, kordat veya suborbikular şekilde bulunurlar. Yaprak kenarları düz veya az çok dişlidir; uç kısmı obtus veya akuminattır. Timol ve karvakrol taşıyan türler baharat olarak kullanılmaktadır (2).

2.1.3. *Origanum* Türlerinin Morfolojik Özellikleri

Origanum türleri farklı lezzet ve koku içeriklerine sahip şifa ve beslenme amaçlı kullanılabilen, küçük yapraklı çalı gibi görünen bitki topluluklarından oluşur. Bu türler genellikle Akdeniz ikliminin yaygın görüldüğü sıcak havayı seven dünyada yayılımı ise Asya'nın güney kısımları ile Avrupa'nın güney ve orta batı kısımları olmakla birlikte, Afrika'nın kuzey alanlarına yayılmış şekildedir. Birçok *Origanum* türü az ya da orda derecede odunsu köklere sahipken özellikle Akdeniz bölgesinde yetişen türlerinde daha çok odunsu kök yapılarına sahip olduğu görülmüştür. Türlerin bir kaçı hariç çoğunun uzunluğu 30-60 cm aralığında görülmektedir. Büyüme sezonu bittikten sonra bitkiler tabana doğru kurumaya başlar. Bazı Akdeniz türlerinde 1-2 mevsim süresi boyunca yaşamını sürdürebilen türleri de bulunmaktadır (5).

Çok zengin çeşitliliğe sahip olan *Origanum* cinsi *Labiatae* familyası içinde yer almaktadır. Yaklaşık 4000 türle *Labiatae* familyası dünya üzerinde en geniş familyalardan birini oluşturmaktadır. Türkiye'de 46 cins ve 575 türle yayılım göstermektedir (10-14). *Labiatae* familyası içerdiği hoş kokulu yağlar, fenolik bileşikler ve sekonder metabolitler nedeniyle dünya genelinde yetiştiği birçok ülkede ekonomik öneme sahip bitkiler arasında yer alır.

Labiatae familyasına ait cinsleri belirlemede; stamen sayısı, korolla şekli, rengi, uzunluğu, tüy durumu, kaliks boyu, nutlet yapısıyla birlikte tek veya çok yıllık oluşu parametreleri değerlendirilir. Bu familyada bulunan bitkiler uçucu bileşimler bakımından özgün bir kokuya sahiptir. *Labiatae* tipi salgı tüylerinde ve diğer tüylerde salgılanmakta olup bitkinin toprak üstü kısmında bulunurlar (15). *Labiatae* familyasından uçucu yağ bileşimi bakımından timol ve karvakrol terpenleri içeren türler, kekik olarak sofralarda yer almaktadır. *Origanum* türlerinin Anadolu'da Milattan Önce 7.yy'dan beri kekik olarak kullanıldığı bilinmektedir (16).

Origanum cinsine ait türlerden bazıları monoik; yani erkek ve dişi organları aynı bitki üzerinde fakat ayrı çiçekler üzerinde bulunması hali, bazıları ise ginodioiktir; yani erkek ve dişi cinslerin ayrı bitkiler üzerinde bulunması halidir (9). Bu familyaya ait bitkilerde bulunan organların üzerinde salgı tüyleri bulunur. Yapraklar yüzeyinde bulunan salgı tüyleri uçucu yağları içerir, *Labiatae* tipi salgı tüylerinde de uçucu yağ bulunur (17).

Labiatae familyasında bulunan bitkilere ait uçucu yağlar genellikle sarı veya açık amber rengine benzeyen ve oldukça kuvvetli kokan oldukça akışkan sıvı şeklinde elde

edilir. Yoğun koku içerisinde kâfur benzeri hafif odunsu serinletici bir etki hissedilir. Bu sebeple sıklıkla parfümeri endüstrisinde kullanılır (18).

2.1.4. *Origanum* Türlerinin Takson Bilgileri

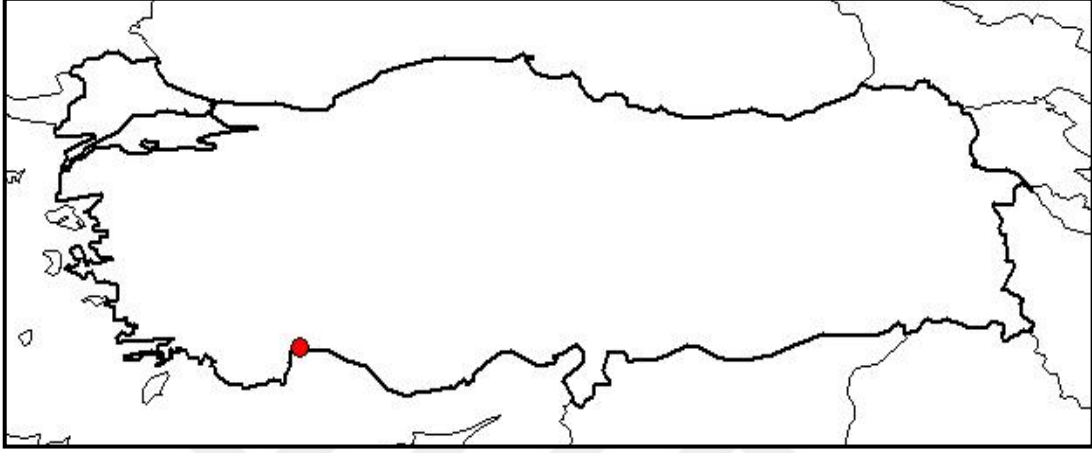
Türkiye Bitkileri Veri Servisi verilerine göre *Origanum* türleri 22 türe ait ve 4 alt tür (Tablo 1) ile 33 takson bulunmaktadır (19). Dünyada ise 278 adet takson bilgisine erişilmiştir (20).

Tablo 1. Türkiye’de yetişen *Origanum* türleri

No	Tür İsimleri
1	<i>Origanum boissieri</i> Ietswaart (E)
2	<i>Origanum munzurense</i> Kıt Tan et Sorger (E)
3	<i>Origanum saccatum</i> P. H. Davis (E)
4	<i>Origanum solymicum</i> P. H. Davis (E)
5	<i>Origanum hypericifolium</i> O. Schwarz et P. H. Davis (E)
6	<i>Origanum sipyleum</i> L. (E)
7	<i>Origanum rotundifolium</i> Boiss
8	<i>Origanum acutidens</i> (Hand.-Mazz.) Ietswaart
9	<i>Origanum haussknechtii</i> Boiss.
10	<i>Origanum bargyli</i> Mouterde
11	<i>Origanum brevidens</i> (Bornm.) DK.
12	<i>Origanum husnucanbaseri</i> H. Duman (E)
13	<i>Origanum leptocladum</i> Boiss. (E)
14	<i>Origanum amanum</i> Post (E)
15	<i>Origanum bilgeri</i> P. H. Davis
16	<i>Origanum. micranthum</i> Vogel (E)
17	<i>Origanum. minutiflorum</i> Schwarz Et P. H. Davis (E)
18	<i>Origanum majorana</i> L.
19	<i>Origanum onites</i> L.
20	<i>Origanum syriacum</i> L. Var. <i>Bevanii</i> (Holmes) Ietswaart
21	<i>Origanum laevigatum</i> Boiss. (E)
22	<i>Origanum x adanense</i> Başer Et H. Duman
23	<i>Origanum vulgare</i> L. Subsp. <i>Vulgare</i> L.
24	<i>Origanum vulgare</i> L. Subsp. <i>Hirtum</i> (Link) Ietswaart
25	<i>Origanum vulgare</i> L. Subsp. <i>Viride</i> (Boiss.) Hayek
26	<i>Origanum vulgare</i> L. Subsp. <i>Vulgare</i> L.

2.1.5. *O. minutiflorum*'un Türkiye'de dağılımı

Ömürleri çok yıllık olan, 1500-1800 m rakım seviyelerinde yetişen ve ülkemizin Doğu Akdeniz Bölgesinde yer alan endemik bir türdür. TBVS 'den alınan dağılımı Resim 1'de gösterilmiştir.

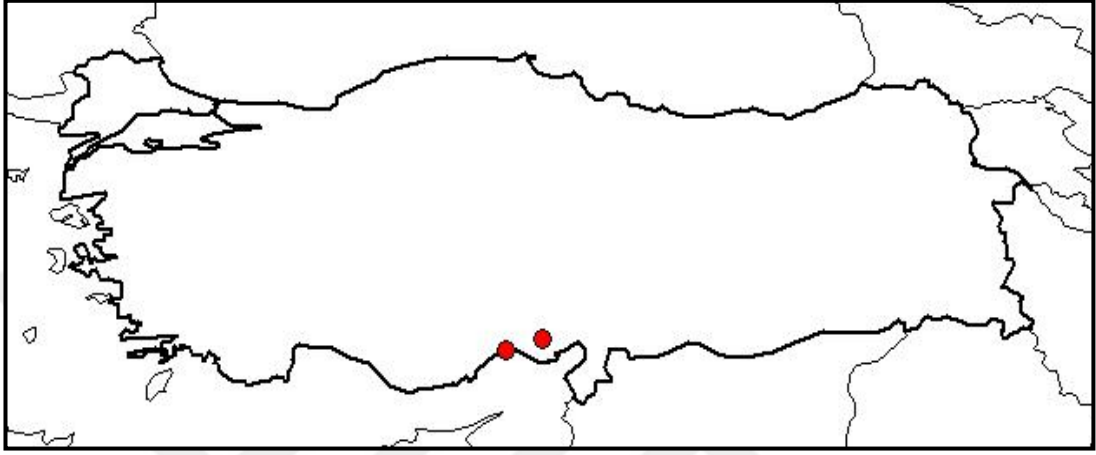


Resim 1. *O. minutiflorum* bitkisinin Türkiye'de dağılımı

35 cm'ye kadar uzanan boyuyla, çalimsı ve kısa- yumuşak tüye sahiptir. Her gövdede 10 çift ve dalları 4 cm'ye kadar uzanan boydadır. 2-8 x 3 mm spikulalara sahiptir. Ovat veya eliptik braketlere sahip olup, 1-3 x 0.5-1.5 mm ve hemen hemen obtusdur. Kaliks ise yaklaşık 2 mm'dir; üst dudak loblu veya yaklaşık 2/5'ine kadar genişçe üçgen dişlidir veya kenarları hemen hemen düzdür; alt dudak ve üst dudak neredeyse aynı uzunluktadır, ayrıca genişçe üçgen dişlidir. Beyaz renkli korollaya sahiptir ve 2.5-4 mm boyundadır. Temmuz ve Ağustos ayları arasında çiçeklidir. Ülkemizde yaklaşık 1500 - 1800 m'de kayalık alanlarda ve yamaçlarda yetişmektedir. Yapraklar ovattan eliptiğe kadar değişen şekilde; 2-14 x 1.5-12 mm boyutlarında, hemen hemen akut olup, saplıdan hemen hemen sapsıza kadar değişen şekilde (yaprak sapı 6 mm'ye kadar uzunlukta);dir. Ülkemiz için endemik bir türdür (2, 13).

2.1.6. *O. micranthum*'un Türkiye'de dağılımı

Çok yıllık bir tür olup, 1500 m rakımda yetişmektedir. Kaya ve yamaçlarda yetişip Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetişen endemik bir türdür. TBVS 'den alınan dağılımı Resim 2'de gösterilmiştir.



Resim 2. *O. micranthum* Bitkisinin Türkiye'de dağılımı

35 cm'ye kadar uzanan boyuyla, çalimsı ve tomentoz tüye sahiptir. Her gövdede 10 çift ve dalları 13 cm'ye kadar uzanan boydadır. 3-10 x 3 mm spikulalara sahiptir. Obovat veya eliptik braketlere sahip olup, 1.5-4 x 1.5-3 mm ve hemen hemen obtusdur. Kaliks ise yaklaşık 2 mm'dir; üst dudak loblu veya yaklaşık 2/5'ine kadar genişçe üçgen dişlidir veya kenarları hemen hemen düzdür; alt dudak ve üst dudak neredeyse aynı uzunluktadır, ayrıca genişçe üçgen dişlidir. Pembe renkli korollaya sahiptir ve 2.5-5 mm boyundadır. Temmuz ve Eylül ayları arasında çiçeklidir. Ülkemizde yaklaşık 1500 m'de kayalık alanlarda ve yamaçlarda, yetişmektedir. Yapraklar yuvarlağımsı ovattan eliptiğe kadar değişen şekilde; 2-14 x 1.5-12 mm boyutlarında, hemen hemen obtus olup, saplıdan hemen hemen sapsıza kadar değişen şekilde (yaprak sapı 5 mm'ye kadar uzunlukta)dir. Ülkemiz için endemik bir türdür (2, 13).

2.2. Derin Ötektik Çözücüler

Yeşil kimya terimi ilk olarak 1990 yılınca Cathcart tarafından kullanılmıştır (21). Sürdürülebilir teknoloji ve analizlerin yapılabileceği araştırmaları ve gelişmeleri kapsayan bir alan haline gelmiştir (22). Yeşil kimya çerçevesinde çözücüler stratejik bir yer tutar. Yeşil bir ortam olarak nitelendirilmek için, bu çözücülerin kullanılabilirlik, toksik olmama,

biyolojik olarak parçalanabilirlik, geri dönüştürülebilirlik, yanıcılık ve diğerlerinin yanı sıra düşük fiyat gibi farklı kriterleri karşılaması gerekir. Literatürde Deep Eutectic Solvents (DES) olarak adlandırılan derin ötektik çözücüler (DÖÇ) son yıllarda popüleritesi artan yeşil kimyanın uygulamalı alanlarından birisidir. 2 ya da daha fazla katının karıştırılmasıyla moleküler arası etkileşimlerden yararlanarak karışımı oluşturan maddelerin kendilerine özgü erime noktalarından daha düşük derecelerde sıvı form halde bulunmasıyla oluşur. İlk örneği Abbott ve arkadaşları tarafından 2003 yılında iyonik sıvılara bir alternatif olarak üretilmiştir. Kolin klorür ve çeşitli kuaterner amonyum tuzları kullanılarak yeni DÖÇ'ler sentezlenmiştir (23).

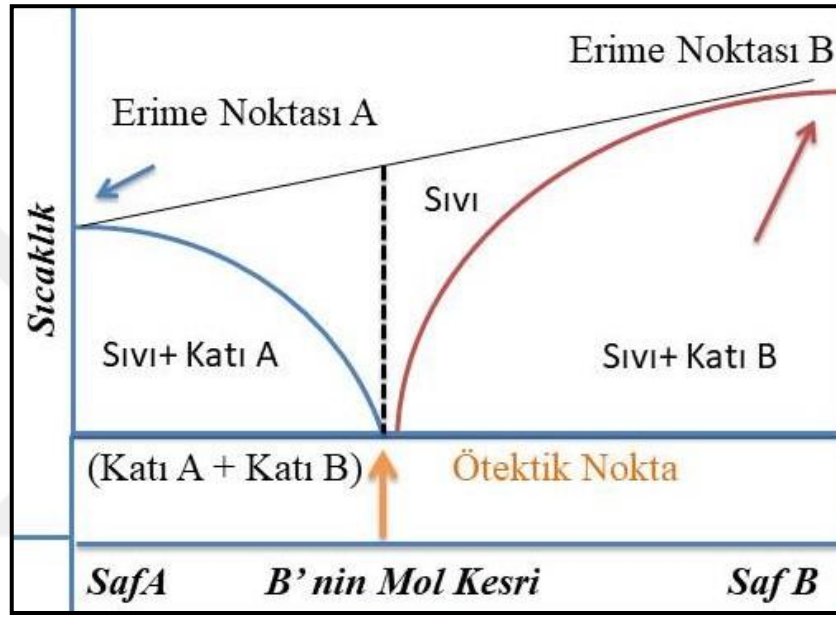
DÖÇ'ler iyonik sıvılara iyi birer alternatiftir. Ötektik karışımlar iki veya daha fazla katı karışımının hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri gibi moleküller arası etkileşimlerden yararlanılarak sıvı bir faz oluşumuna dayanır. Katı formda bulunan tuzlar iki farklı iyonun (+ ve – yüklü) çekim gücünden yararlanır ve istiflenmiş halde bulunurlar. Bu moleküller arası iyonik gücün azaltılması ile ötektik karışımlar kolaylıkla elde edilebilmektedir. İyonik gücün azaltılması için büyük ve simetrik olmayan moleküller bir araya getirilir. Ayrıca farklı erime noktasına sahip iki katı karıştırılarak elde edilir. Bu şekilde elde edilen iyonik sıvılar organik çözücülere ve asitlere alternatiftir. Buharlaşmayan, yüksek termal stabiliteye sahip, düşük buhar basıncına sahip, elektrik iletkenliği yüksek, çeşitli polariteye sahip ve hemen hemen her şeyi çözebilen çözücüler elde edilir. Yeşil kimya ile yeni ürünlerin tasarlanması, üretimi, bu maddelerin uygulanması sırasında tehlikeli maddelerin oluşumunu azaltan veya ortadan kaldıran özelliklerinin olması önceliktir.

Gelişen teknoloji ve uygulamaları içerdikleri kimyasallardan ötürü çevreyi olumsuz etkilemektedir. Gelecek nesillere miras bırakacağımız bu dünyada yaşanılabilirliği azaltmak yerine artırma girişimlerinde bulunmak birçok alan için büyük aciliyet gerektirmez. Sentez, yeni materyal tasarımları, ham madde kullanımları, oluşacak prosesler ve etkiler göz ardı edilmemelidir. Azaltılmış toksisite, geri dönüştürülebilirlik, atık kullanımı, yeni çözücüler bu konuda önemli başlıklardan bir kaçıdır. Yeşil kimyanın en büyük özelliği tek bir kimya disiplini olmayıp bütün disiplinlere uygulanabilir olmasıdır. Çevreyi korumadaki rolü ise daha ilk adımda müdahalesi ile oluşur. Kirlilik daha oluşmadan engellenir. Yeşil kimya, bertaraf edilmek istenen bir maddenin tutulması için

kullanılan kimyasalın daha tehlikesiz bir kimyasal ile değiştirilmesi, ya da tehlikeli olmayan bir madde kullanılmasıyla etkinlik gösterir (24).

Bu çözücüler ile matris çıkarma, analit zenginleştirme yapılmaktadır (25, 26). Son yıllarda iyonik sıvı elde edebilmek için farklı farklı yöntemler ortaya konmuştur (27, 28).

Aşağıdaki faz diyagramı ötektik sıvıların oluşum sıcaklıklarının seviyesinin nasıl değiştiğini göstermektedir.



Resim 3. Farklı karışımların erime sıcaklıklarının şematik faz diyagramı

En sık kullanılan DÖÇ'ler kolin klorür (ChCl), karboksilik asitler, terpenler, kuaterner amonyum tuzları, sitrik asit ve gliserole dayanır ve istenilen oranlarda hazırlanması mümkündür (27). Hammadde ucuzluğu sayesinde iyonik sıvılara göre üretimi daha uygundur.

DÖÇ'lerin sınıflandırması 4 kategoride yapılır. Smith ve arkadaşları tarafından yapılan kategorizasyon Tablo 2'de verilmiştir (29).

Tablo 2. Derin ötektik çözücülerin sınıflandırılması ve genel formülasyonları

Tip	Genel Formül	Koşullar
Tip1	$Kua^+ X^- zMCl_x$	$M=Zn, Sn, Al, Ga, In$
Tip2	$Kua^+ X^- zMCl_x \cdot YH_2O$	$M=Cr, Co, Cu, Ni, Fe$
Tip3	$Kua^+ X^- zRZ$	$Z=CONH_2, COOH, OH$
Tip4	$MCL_x + RZ = MCL_{x-1}^+ \cdot RZ + MCL_{x+1}^-$	$M= Al ve Zn ve Z= CONH_2, OH$

Kua^+ ile gösterilen genellikle bir kuaterner amonyum tuzunu, fosfonyum tuzunu ya da sülfonyum tuzunu temsil etmektedir. X^- ile gösterilen kısım anyonik kısmı, R ile gösterilen alkil gruplarını Z ise $CONH_2$, $COOH$, OH içeren grupları temsil etmektedir. Sentezlenen çoğu DÖÇ hidrofilik özelliğe sahipken, Tip 3 grubunda olan DÖÇ ler hidrofobik özelliklere sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Tip 3 gruba ait DÖÇ sayısının artırılmasına yönelik çalışmaların arttığı görülmüştür (28). Tip 3 grubu doğal DÖÇ sınıfı olup düşük geçiş sıcaklığı içeren karışımlar, karboksilik asit bazlı DÖÇ'leri ve terapatik DÖÇ'leri (TDÖÇ) içermektedir.

2.3. Doğal Derin Ötektik Çözücüler

Doğal maddeler kullanılarak oluşturulan DÖÇ'lere ise NADES (Natural Deep Eutectic Solvents) adı verilir. Bu çözücülerle polar matrislerde bulunan apolar bileşenlerin ekstraksiyonu kolaylıkla yapılır (28). Doğal derin ötektik çözücüler (DDÖÇ) zayıf hidrojen bağları oluştururlar. Bunun için iki ya da daha fazla bileşen kullanılabilir ve biyolojik olarak parçalanabilir toksik olmayan çözücüler elde edilmiş olur. Sulu matrislerde kullanılabilir oluşu DDÖÇ'leri DÖÇ'lere göre daha çevre dostu yapar.

İlk olarak 2011 yılında Choi ve arkadaşları tarafından su ve lipidlerden farklı olarak ara derecede polariteye sahip bir alternatif matris olarak önerilmiştir (28). Sonraki yıllarda ise bu 4. nesil sıvılar yeni bir iyonik sıvı sınıfı olarak kabul edilmiştir (30). Kimya açısından incelendiğinde, DDÖÇ'ler DÖÇ'lerin düşük geçiş sıcaklığı karışımları olarak sınıflandırılabilir. DDÖÇ'ler sürdürülebilir bileşenlerin sahip olduğu düşük toksisite nedeniyle akademide büyük ilgi görmektedir.

Sürdürülebilir bileşenlerin yanı sıra geniş sıcaklık aralığında sıvı fazda kalması, düşük toksisiteye sahip olması, yanmamazlık özelliği, termal ve kimyasal olarak kararlı yapıya sahip olmaları uygun fizikokimyasal özelliklerinden sayılmaktadır.

DDÖÇ'lerin kombinasyonları doğada bol miktarda ve kolayca bulunabilen, toksik olmayan maddeler olduğundan ve ilave saflaştırma işlemi gerektirmediğinden laboratuvarlarda kullandığımız geleneksel çözücülere karşı büyük bir avantaja sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı biyolojik olarak yenilenebilir aynı zamanda gıda formülasyonlarına dâhil edilebilir oldukları da bildirilmiştir (31-33).

Literatürde bildirildiğine göre DDÖÇ'lerin ekstraksiyon verimi, organik çözücülerden daha yüksek, bunu yanı sıra ekstraksiyon ve depolama sırasında ekstre edilen bileşiklerin stabilitesinin arttığının gözlemlenmiş olması büyük bir avantajını daha ortaya koymaktadır. Çözünürlüğü düşük olan biyolojik olarak aktif bileşikler için potansiyel ilaç salım sistemi uygulamaları çalışmalarına da ağırlık verilmiştir (34-39).

2.4. Derin Ötektik Çözücülerin Hazırlanması

DÖÇ'ler birkaç fiziksel yöntemin çeşitlendirilmesi ile oluşturulmaktadır. Aşağıdaki tabloda bu yöntemler ve uygulanma şekilleri açıklanmıştır. Isıtma ve karıştırma yöntemleri literatürde en sık rastlanan yöntemlerdendir. Ucuz oluşu hem ekonomik hem de sıcaklık kontrolüyle birlikte oluşumun kolaylıkla kontrolüne imkân tanır. Bazı durumlarda ısıtmadan kaynaklı safsızlıkların oluştuğu da bildirilmiştir. Bu safsızlıklardan kurtulabilmek için diğer yöntemlerin kullanılmasının daha uygun olacağı bildirilmiştir (40). Kullanılan yöntemlere bağlı olarak elde edilen DÖÇ lerin fizikokimyasal özellikleri incelenmektedir. Viskozite, polarite, öz kütle ve termodinamik özellikleri incelenmektedir. FTIR ve NMR verileri ile hidrojen bağı donör (HBD) ve hidrojen bağı akseptör (HBA) özellikleri de incelenmektedir.

2.5. Doğal Derin Ötektik Çözücülerin Fiziksel Özellikleri

Çözücülerin çözme etkisine etki eden parametreler donma noktası, viskozite, polarite, yoğunluk, iletkenlik vb. şeklinde sıralanabilir. Bu özellikler aynı şekilde DDÖÇ'leri de etkilemektedir. Fizikokimyasal özellikler ise karışımı oluşturan bileşenlerin yapısına ve moleküler arası etkileşimlerine göre değişmektedir. Bazı DDÖÇ'ler susuz hazırlanırken bazılarında su eklenmesi yapılmaktadır.

Yapısına su katılan DDÖÇ'lerin özellikleri korunurken hareket kabiliyetlerinin arttığı görülmüştür (41). Su katılması ile hazırlanan bu çözeltiler ile farklı ve çok sayıda DDÖÇ hazırlanabilir. Bazı durumlarda ise suyun varlığı DDÖÇ'lerin erime noktasını düşürmektedir buna bağlı olarak fizikokimyasal özellikleri de, çözünür kılma özellikleri de değişir (36, 42-43).

2.5.1. Donma Noktası

Yukarıda bahsedildiği gibi DÖÇ oluşumu iki katının hidrojen bağları yardımıyla yeni sıvı bir faz oluşturmasıyla oluşur. Bu faz genellikle kendini oluşturan katılardan daha düşük derecelerde donma noktasına sahiptir. Bir örnekle açıklamak gerekirse kolin klorür ve üre karışımının 1:2 oranındaki karışımı 12 °C de erirken kolin klorür 302 °C üre ise 133 °C'ye sahiptir. Genellikle oluşan DÖÇ'lerin donma noktalarının 150 °C altında olduğu bildirilmiştir. 50 °C ve altında bulunan DÖÇ'lerin ise ucuz ve güvenilir olmaları, birçok alanda onları daha çekici kılmaktadır (1).

2.5.2. Yoğunluk

Yoğunluk sıvıların ve çözücülerin en önemli fiziksel özelliklerinden biridir. Sentezlenen DÖÇ'lerin çoğunun yoğunluğu suyun yoğunluğundan fazladır.

Tablo 3. Derin ötektik çözücülerin hazırlanma yöntemleri

Yöntem Adı	Uygulama Şekli	Referans
Buharlaştırma	Bileşenler su içinde çözüldükten sonra, su döner evaporatör ile uzaklaştırılır	(41)
Öğütme	Karışım bir havanda homojen bir sıvı oluşuna kadar öğütülür.	(40)
Su Banyosunda Isıtma	Kapalı bir kaba koyulan bileşenler berrak bir sıvı faz oluşana kadar su banyosunda ısıtılır.	(1, 40-41)
Dondurarak Kurutma	Sulu çözeltiler saf halde DÖÇ elde etmek için su süblimasyonu oluşturmak amacıyla kurutulur.	(44)

Tablo 3. (Devam)

Ultrasona Maruz Bırakma	Bileşim homojen bir sıvı faz elde edilene kadar ultrasona maruz bırakılır gerekli durumlarda ısıtma işlemiyle entegre yürütülür.	(45)
Mikrodalga ısıması	Birkaç saniye boyunca düşük güçte mikrodalga ışınlarına maruz bırakılır	(46)

Aynı yöntemler kullanarak hazırlansa bile elde edilen DÖÇ'lerin fiziksel özelliklerinde farklılıklar görüldüğü de bildirilmiştir (47).

2.5.3. Polarite

Polarite, birçok maddenin ekstraksiyon kabiliyetini ve diğer çözücülerle karışabilme durumlarını inceleme açısından çok önemli fiziksel parametrelerden biridir. 2015 yılı itibariyle hidrofobik derin ötektik çözeltiler literatürde yerini almıştır. Bunların dışında olan DÖÇ'ler ise hidrofiliktir.

2.6. Derin Ötektik Çözücülerin Uygulamaları

DÖÇ'ler çoğunlukla organik sentez, kataliz ve biyoyakıt işleme gibi önemli uygulamalarda hidrojen bağı etkileşimleri ile bir sıvı oluşturan doğal ve yüksek erime noktasına sahip başlangıç maddelerinin karıştırılmasıyla sentezlenir (48-52). DÖÇ'lerin yeterince keşfedilmemiş alanları sıvı-sıvı ekstraksiyonları ve ekstraktif damıtmayı içerir (53). DÖÇ'lerin kapsamlı bir incelemesi ve elektrokimyasal algılama ve biyosensörler için elektrot yüzeylerinin modifiye edilmesindeki uygulamaları yayınlanmıştır (54,55). *Candida antarctica* B lipaz transesterifikasyon reaksiyonları için ortam olarak DÖÇ'ün kullanımı ayrıntılı olarak açıklanmıştır (56).

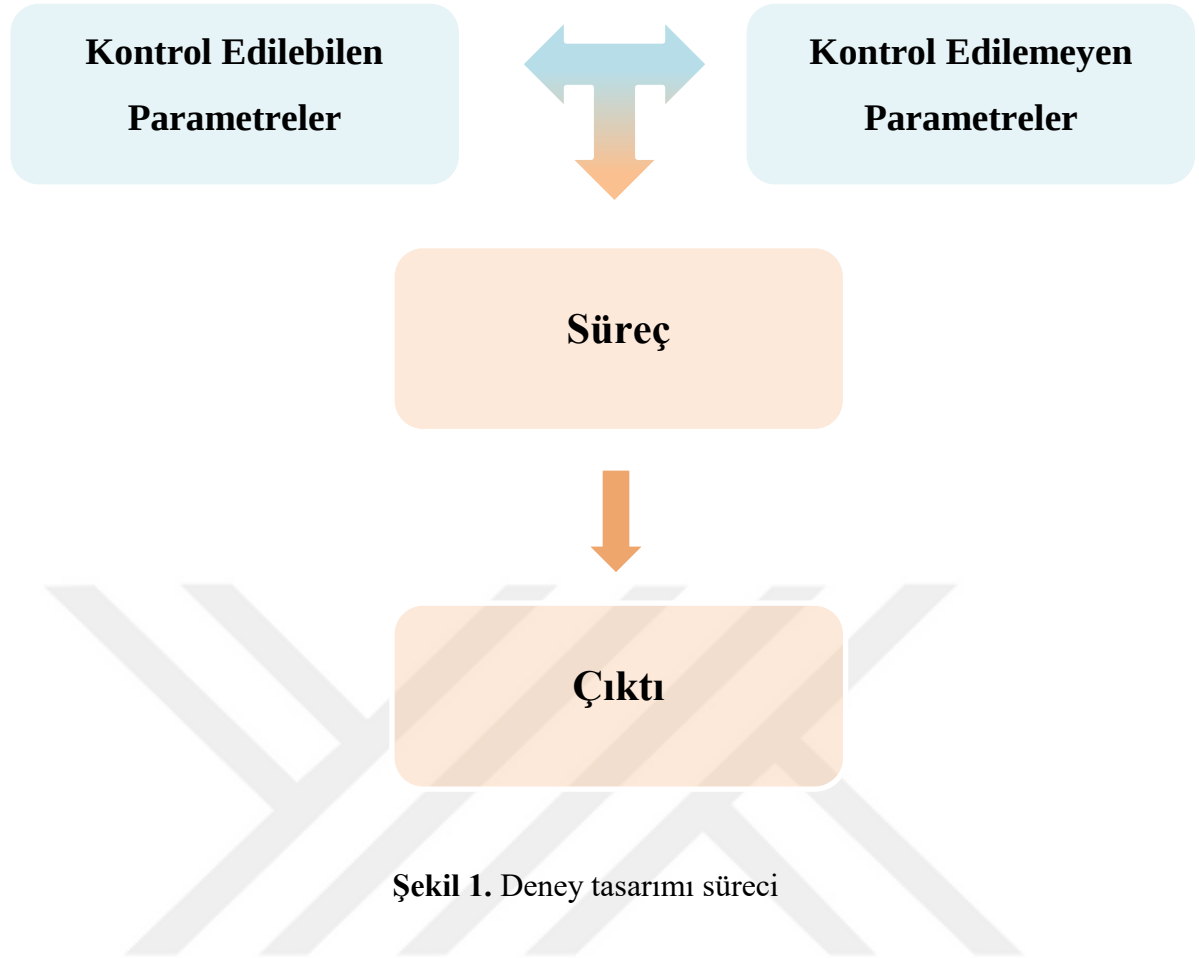
DDÖÇ, fruktoz, glukoz, sitrik asit, prolin ve diğer metabolitler gibi hücresel bileşenler, tanımlanmış molar oranlarda viskoz bir sıvı oluşturduğunda ortaya çıkmıştır (28). DDÖÇ sentezi, tipleri, karakterizasyonu ve ekstraksiyon ve lignoselülozik biyokütle ön işleminde kullanımları dâhil uygulamalar daha önce başka bir yerde gözden geçirilmiştir (57-63).

Vanda ve ark. (64) DDÖÇ'lerin iyonik sıvılardan ve DÖÇ'den evrimini incelemiş ve DDÖÇ'in farmasötik, kozmetik, gıda ve tarım ortamlarındaki uygulamalarını daha da genişletmiştir. DDÖÇ'ün, makromoleküller için çözündürme maddeleri ve enzimatik reaksiyonlar için ortam olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Bazı durumlarda, TDÖÇ hem aktif bileşenler hem de diğer hammaddeler doğal kaynaklardan olduğunda DDÖÇ olarak sınıflandırılabilir. İlaç dağıtımı için etkili olacak TDÖÇ'ün geliştirilmesi için geliştirme araştırmaları halen devam etmektedir. Suyla karşılaştırıldığında, kolin klorür-üre ve kolin klorür-malonik asit, benzoik asit, danazol, griseofulvin, AMG517 ve itrakonazol ile çözünürlüklerini 5 ila 22.000 kat artırdığı tespit edilmiştir (65). DÖÇ'ün bu dikkate değer özelliği, onları farmasötik uygulamalar ve ilaç dağıtımı için umut verici kılmaktadır. Bunun ışığında, DDÖÇ geliştirmek sadece sıvı-sıvı ekstraksiyonu için değil, aynı zamanda ilaç çözünürlüğü için araçlar olarak da öne çıkmaktadır.

2.7. Deney Tasarımı

Deney tasarımı bir süreci etkileyen tüm parametreleri tek tek inceleyen, çıktı üzerindeki etkileri ve birbirleri ile etkileşimlerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Elde edilecek çıktıya ulaşmak için prosesleri optimize etmek için bu süreçlere ait girdileri yönetmek için gerekli bilgileri erişmemizi sağlar. Deney tasarımı sırasında kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen girdilerin belirlenmesi, doğru uygulamayı belirlemek için temel deney tasarım kavramlarını belirlemek (Şekil 1) ve anlamak önemlidir.



2.7.1. Deneysel Tasarımın Tarihçesi

Deneysel tasarım sürecinin gelişimi 4 evreye ayrılmaktadır.

Bu evreler;

- Tarımsal köken dönemi (1918-1940)
- İlk endüstriyel dönem(1941-1970)
- İkinci endüstriyel dönem(1970 sonları-1990)
- Modern çağ (1990- günümüz) şeklinde ayrılabilir.

1920’li yılların başlarında A Ronald ve iş arkadaşları tarım ürünlerinin daha verimli üretilmesi amacıyla deneysel tasarımın temellerini atmıştır. Deneysel tasarım uygulamalarından faktöriyel tasarımların ve ANOVA (varyans analizi) testinin oluşmasını sağlamıştır. Deneysel tasarım tekniği yardımıyla, topraktaki nem miktarı gibi her bir faktörün etkisini ayırt edip ve gübre çeşidinin yanı sıra toprak altının durumu, mahsulün

son durumu üzerine yorumlar yapılabilir. Sonradan ise bu yöntem tarımsal ve biyolojik alanlarda kullanılan çok faydalı bir araç haline gelmiştir (66,67).

İkinci Dönem de ise Box ve Wilson, yüzey yanıt ile proseslere etkileri üzerinde çalışmalarını ilerletmiştir İkinci Dünya Savaşı'nın hemen ardından, ilk endüstriyel dönemde deney tasarımı kullanımında bir canlanma olmuştur. Box ve Wilson elde ettikleri çıktıyı bir yanıt fonksiyonu olarak düşünerek ve bu fonksiyon için en uygun koşulları bulmaya çalışarak yüzey yanıt tasarımında öncü çalışmalarını tamamlamışlardır.(68).

İstatiksel kalite kontrolün önemi, 1950'lerde W. Edward Deming tarafından Japonya'ya götürüldü ve Montgomery'nin İkinci bir sanayi çağı diye adlandırdığı dönemi başlattı. İkinci Dünya Savaşı sonrasında Japon ürünleri çok kötü bir kalitede, ucuza mal edilmişti. 1960 sonlarına doğru kalite artmaya başlamıştır. Özellikle otomobil endüstrisinde istatistiksel kalite kontrol prosedürleri benimsenmiş ve bu alanlara yönelik deneyler yapılmıştır. Dönem mühendislerinden Taguchi, ortogonal olarak adlandırdığı bağımsız dizileri kullanarak bir tasarım tekniği oluşturmuştur. Bunlara kesirli faktöriyel tasarımlar adı verilmiştir. Sağlam parametreler ve süreç sağlamlığı kavramlarını ortaya atmıştır (69, 70).

Modern Çağ'a gelindiğinde sürekli kalite geliştirmeyi temsil etmenin yeni bir yolu bulunmuştu. Artık bir şirket ve birçok büyük imalat şirketi tarafından benimsenmiş bir teknik kullanılmaya başlanmıştı. Bu şekilde, kalite ve geri bildirim döngülerine dayalı kararlar almak için istatistikleri kullanan bir teknik oluşmuştu ve bu yöntem, önceki birçok istatistik ve yöntem tekniğini de içermekteydi. 6 sigma (6 σ) diye adlandırılan bu yöntem aslında 6 basamaktan oluşmaktadır.

- Tanımla
- Ölç
- Analiz Et
- Geliştir
- Kontrol Et

Bu şekilde sistemin döngüsel olarak çalışması sağlanmaktadır.

2.7.2. Deney Tasarımında Kullanılan Değişkenler

Deney tasarımında kullanılan değişkenler kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen parametreler olarak ikiye ayrılır.

Kontrol Edilebilen Parametreler: Bu parametreler tasarımı uygulayan tarafından seçilir. Deneyde kullanılacak maddenin cinsi, miktarı, sisteme etki eden sıcaklık, basınç, uygulanan kuvvet, dalga boyu şiddeti, mikrodalga gücü gibi fiziki değişiklik uygulanabilecek değerlerden oluşur. Kontrol edilebilen parametreler varyansa ve ortalamaya etki eden, sadece ortalamaya etki eden ve ortalama ve varyansa etki etmeyenler şeklinde kendi içinde üçe ayrılır. Sırasıyla X_d , X_a , X_o şeklinde gösterilir. Kontrol edilebilen değişkenler birden fazla değer alabilir ve bu değerlere seviye adı verilir.

Kontrol Edilemeyen Parametreler: Bileşenler arası etkileşim, titreşim, gürültü, toz, nem, deneyin yapılacağı ortam sıcaklığı, kullanılan maddenin özelliğini yitirmesi gibi kontrol edilmesi zor değişkenlerdir. Sistem üzerinde olumsuz etkisi olduğu düşünülen bu parametreler üzerinde oynama yapılmazken, sistem üzerine etkisi olan parametreler kontrol edilebilen parametreler iyileştirilir. Bu şekilde olumsuz etkisi düşünülen parametrelere sistemin duyarsız olması sağlanmaya çalışılır (71).

2.7.3. Deneysel Tasarımın Temel İlkeleri

Deneysel tasarımlar oluşturulurken, denemelerin etkili uygulanabilmesi için bilimsel bir yaklaşım tarzı uygulanır. Geçerli ve nesnel sonuçlar elde etmek için en uygun veriler toplanıp istatistiksel analizi sağlanır. Tekrarlama, rassallık ve bloklama olarak deney tasarımının temel prensiplerini oluşturan Ronald A Fisher tarafından belirlenmiştir.

Rassallık tamamen tesadüfi olarak oluşmayı temsil eder. Bilimsel çalışmalar için yorumlanabilir ve geçerli sonuçlar üretecek bir yöntem seçmek çok önemlidir. Çeşitli gruplardaki konular sistematik bir farklılık göstermemelidir. Sistematik farklılıklar sonuçlarda da yanlış bir farklılığa sebep olacaktır bu nedenlerden dolayı rassallık önemli bir kriterdir. Yanlış olmayan sonuçlar elde etmek için analizdeki ortak değişkenlerin kontrolü büyük önem arz etmektedir (72).

Bloklama ile deneysel hatalar küçültülür, bunun için homojen gruplarla denemeler yapılır. İlgili faktörler arasındaki ilişkiyi kıyaslamak için kullanılan bir tasarım yöntemidir. Deneylerin hassas bir şekilde yürütülebilmesi amacıyla deney alanının bölümlere ayrıldığı

bir tekniktir. Buradaki temel düşünce benzer içerikteki deneysel birimin gruplara bölünmesidir.

Tekrarlama ile deneyler çok sayıda yapılır. Deneysel hataların belirlenmesinde tekrarlar yapılarak hata ölçümü yapılır. Hatalar genellikle, rastgele ve değişmeye katkıda bulunan diğer deneysel faktörler nedeniyle ortaya çıkar. Denemenin içine katılmayan ve kontrol edilemeyen bu faktörlerin etkisinin azaltılabilmesi için deneyin gerekli kısmının tekrarlanması gerekir. Tekrarlama ile elde edilen hata sonuçları ile olası dış etmenlerin etkisi ölçülmüş olur. Tekrarı yapılmayan deneyler için dış etkenlerin ne derece etkili olduğunun belirlenmesi mümkün değildir (73).

2.7.4. Deneysel Tasarımın Uygulanması

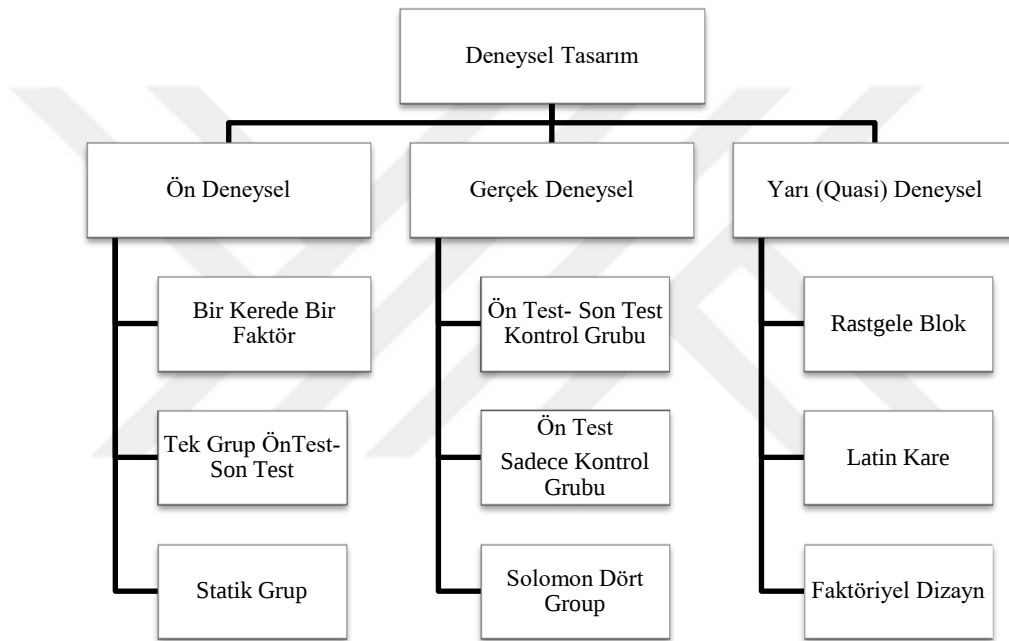
Bir deneysel tasarım uygulaması 7 aşamadan geçmektedir.

1. Spesifik araştırma sorusunun belirlenmesi; başlamak için belirli bir araştırma sorusu oluşturulmalı. Araştırma sorusu, hakkında daha fazla bilgi edinilmesi umulan bir konudur. Mümkün olan en iyi sonuçları elde etmek için konunun mümkün olduğunca özellikli hale getirilmesi gerekmektedir.
2. Değişkenlerin tanımlanması; deneyin doğru ve düzenli tutulması için, deneyde yer alan değişkenler tanımlanmalıdır. Ele alınması gereken üç değişken vardır (bağımlı, bağımsız ve kontrol)
3. Hipotez oluşumu; hipotez, deneyin beklenen sonucudur. Deneylerde, bir analistin hipotezi genellikle araştırma sorusuyla yakından örtüşür.
4. Uygulanacak tasarım tipinin seçilmesi; deneyler için seçilen deneysel tasarımın türü, deneyin nasıl yürütüleceğini etkileyebilir. Hangi tasarım türünün kullanılacağına karar verirken, denemeye ayırabilecek süre dâhil olmak üzere mevcut kaynaklarınızı göz önünde bulundurulmalıdır.
5. Test grubunun oluşturulması; hangi deney tasarım tipini kullanılacağını bilmek, test gruplarının nasıl bir araya getirileceğini belirlemeye yardımcı olur. Bir test grubu oluştururken dikkate alınacak bazı hususlar deney boyutu, grup sıralaması ve hedef kitledir.
6. Verilerin toplanması; veri toplamak, deneyi yürütmeyi ve gözlemleri kaydetmeyi içerir. Tüm gözlemler, alakasız olduğunu düşünülenler bile, belgelenmelidir. Bu, daha sonra analiz etmek için bol miktarda veri sağlamaya yardımcı olur.

7. Deneylerin tekrarlanması; deneyi tekrarlamak, toplanan verilerin doğru olduğundan emin olmak için en önemli adımlardan biridir. Bu, deneydeki küçük bir insan hatası veya deneyi uygulayan analistin kişisel tercihleri gibi bilinmeyen girişimleri açıklayabilir (74).

2.8. Deney Tasarım Türleri

Deneyel çalışma tasarımlarının türleri ön deneysel, yarı deneysel ve gerçek deneysel olarak üç türe ayrılır (Şekil 2).



Şekil 2. Deney tasarım türleri

Ön deneysel araştırmalar üç kategoriye ayrılabilir:

Tek oturumda vaka çalışması araştırma tasarımı; deneysel çalışmada yalnızca bir bağımlı grup veya değişken araştırılır. Test sonrası araştırmadır.

Araştırmada tek gruplu ön ve son testler kullanılırsa; öncesi ve sonrası tek bir gruba test uygulanarak, bu araştırma tasarımı son test ve ön test çalışmalarını içermektedir. Birinci ölçüm başlangıçta, ikincisi ise sonunda alınır.

Statik grupların karşılaştırılması; statik grup karşılaştırma çalışmasında, iki veya daha fazla grup gözlemlenir, gruplardan yalnızca biri ölçülmesi gerekeni içerirken diğer

gruplar değişmeden kalır. Ölçümden sonra tüm gruplar tekrar test edilir ve aralarında gözlenen farklılıkların uygulamadan kaynaklandığı varsayılır.

Quasi, kısmi, yarım veya yanlış anlamına gelir. Sonuç olarak, yarı-deneysel araştırmalar, gerçek deneysel araştırmalara benzemekle birlikte, aynı değildir. Yarı deneylerdeki katılımcılar rastgele atanmaz ve sonuç olarak, rastgeleleştirmenin sorunlu veya imkânsız olduğu durumlarda çalıştırılırlar. Bu, yöneticilerin öğrencilerin deneysel örneklemeler için rastgele seçilmesine izin vermediği eğitim araştırmalarında tipik bir olaydır. Zaman serisi, karşılık gelen kontrol grubu tasarımı ve karşı dengeli tasarım, yarı deneysel araştırma tasarımlarıdır.

Gerçek deneysel araştırma, bir kavramı kanıtlamak veya reddetmek için biyoistatistiksel analize bağlı olduğundan, maksimum doğruluğa sahip çalışma türüdür. Tüm deneysel tasarım türlerinden yalnızca basit bir tasarım, bir grup içinde neden-sonuç bağlantısını gösterebilir (75).

2.8.1. Faktöriyel Tasarımlar

Faktöriyel deneyler aynı anda birden fazla faktör içerir ve her faktör iki veya daha fazla düzeydedir. Faktöriyel deneylerde çalışılan özelliği aynı anda birkaç faktör etkiler ve deneyi yapan kişi, ana etkiler ve farklı faktörler arasındaki etkileşim etkileri ile ilgilenir.

Bir örnekle açıklamak gerekirse:

Tarımsal bir deneyde farklı arazilerden elde edilen verimin şunlara bağlı olduğunu varsayalım:

- Mahsul çeşitliliği
- Gübre türü.

Her iki faktör de deneyi yapanın kontrolündedir.

- Toprak verimliliği.

Bu faktör deneyi yapanın kontrolünde değildir.

Farklı mahsul çeşitlerini karşılaştırmak için;

- Sulama, gübre vb. diğer faktörleri sabit ve tüm parseller için aynı tutarak farklı parsellere atayın.
- Buna ilişkin çıkarımlar, gübreleme, sulama vb. faktörler açısından sadece benzer koşullarda yetiştirilen ürünler için geçerli olacaktır.

Farklı gübreleri (veya farklı gübre dozlarını) karşılaştırmak için

- Tüm arazilere tek ürün ekin ve araziden araziye gübre miktarını değiştirin.
- Ürünün farklı çeşitleri ekilirse sonuçlar geçersiz olacaktır.
- Belirli bir gübre türüne bir çeşidin diğerinden farklı tepki vermesi oldukça olasıdır.

Diyelim ki karşılaştırmak istiyoruz

- İki ürün çeşidi – a ve b, gübreyi sabit tutar ve
- Üç çeşit gübre – A, B ve C.

Bu, iki rastgele blok tasarımı (RBD) ile herhangi bir bloktaki üç araziye ve rastgele iki ürün çeşidine rastgele uygulamalar atanarak gerçekleştirilebilir. Görünebilecek muamelelerin olası düzenlemesi aşağıdaki gibi olabilir.

bC	bA	bB		bC	aA	aB
bA	bB	bC	ve	aA	aB	aC
bB	bC	bA		aB	aC	aA

Bu iki RBD ile iki gübre arasındaki fark tahmin edilebilir ancak ürün çeşitleri arasındaki fark tahmin edilememektedir. Mahsul çeşitleri arasındaki fark, bloklardaki farkla iç içedir.

Öte yandan, her biri üç bloktan oluşan üç set kullanırsak ve her blok iki parselle sahipse, o zaman

- Her bloğun içindeki çeşitleri rastgele sıralayın ve
- Muameleyi rastgele üç sete atayın.

Görünebilecek uygulamaların olası düzenlemesi aşağıdaki gibi olabilir.

bB	aB	aC	bC	aA	bA
aB	bB	bC	aC	bA	aA
bB	aB	aC	bC	bA	aA

Burada ekin çeşitleri arasındaki fark tahmin edilebilir, ancak gübre uygulaması arasındaki fark tahmin edilemez.

Faktöriyel deneyler bu zorluğun üstesinden gelir ve her ürünü her gübre uygulamasıyla birleştirir.

aA, aB, aC, bA, bB, bC olmak üzere altı uygulama kombinasyonu vardır.

Toplam gözlem sayısını 18 olarak tutarak (önceki gibi), RBD'yi her biri altı çizimden oluşan üç blokla kullanabiliriz,

bA	aC	aB	bB	aA	bC
aA	aC	bC	aB	bB	bA
bB	aB	bA	aC	aA	bC

Şimdi mahsul çeşitleri arasındaki fark ve gübre uygulamaları arasındaki farkı tahmin edebiliriz. Faktöriyel deneyler, her biri iki veya daha fazla seviyede aynı anda birden fazla faktör içerir.

Her faktörün seviye sayısı aynı ise buna simetrik faktöriyel deney denir. Her faktörün seviye sayısı aynı değilse buna simetrik veya karışık faktöriyel deney denir.

Sadece simetrik faktöriyel deneyleri dikkate alarak faktöriyel deneyler yoluyla inceleyebiliriz

- Her faktörün bireysel etkisi ve
- Etkileşim etkisi.

Şimdi 2^2 faktöriyel bir deneyi bir örnek ele alalım ve bu örnek üzerinden teoriyi geliştirmeye ve anlamaya çalışalım.

Faktörleri temsil etmek için genel gösterim büyük harfler kullanmaktır, örneğin A, B, C vb. ve bir faktörün seviyeleri küçük harflerle temsil edilir. Örneğin, A'nın iki seviyesi varsa, bunlar a_0 ve a_1 olarak gösterilir. Benzer şekilde, B'nin iki düzeyi b_0 ve b_1 olarak temsil edilir A'nın iki düzeyini belirtmek için başka bir alternatif gösterim 0 (a_0 için) ve 1'dir (a_1 için). O halde B'nin çarpanları 0 (b_0 için) ve 1'dir (b_1 için) (76).

2.8.1.1. İki Seviyedeki Faktörlerle Faktöriyel Deneyler (2^2 Faktöriyel Deney)

Bir deneydeki akım ve potansiyel değerlerinin potansiyostat /galvanostat cihazından elde edilen voltamogramın büyüklüğünü etkilediğini varsayalım. İki akım seviyesi olduğunu varsayalım.

- 5 Amper, seviye 1 (C_1) olarak adlandırın ve a_0 olarak gösterin
- 10 Amper, seviye 2 (C_2) olarak adlandırın ve a_1 olarak gösterin.

Benzer şekilde, iki voltaj seviyesi

- 200 volt, seviye 1 (V_1) olarak adlandırın ve b_0 olarak gösterin
- 220 volt, seviye 2 (V_2) olarak adlandırın ve b_1 olarak gösterin.

İki faktör, akım için A ve voltaj için B olarak gösterilir.

Bir deney yapabilmek için akım ve potansiyel değerlerinin 4 farklı kombinasyonu vardır.

- Akım = 5 Amper ve Voltaj = 200 Volt
 $C_0V_0 \equiv a_0b_0$ (Eşitlik 1)
- Akım = 5 Amper ve Potansiyel = 220 Volt
 $C_0V_1 \equiv a_0b_1$ (Eşitlik 2)
- Akım = 10 Amper ve Voltaj = 200 Volt
 $C_1V_0 \equiv a_1b_0$ (Eşitlik 3)
- Akım = 10 Amper ve Potansiyel = 220 Volt
 $C_1V_1 \equiv a_1b_1$ (Eşitlik 4)

Bu kombinasyonlardan alınan yanıtlar şu şekilde temsil edilir:

$$a_0b_0 \equiv (1) \quad (\text{Eşitlik 5})$$

$$a_0b_1 \equiv (b) \quad (\text{Eşitlik 6})$$

$$a_1b_0 \equiv (a) \quad (\text{Eşitlik 7})$$

$$a_1b_1 \equiv (ab) \quad (\text{Eşitlik 8})$$

şeklinde sıralanır.

Şimdi aşağıdakileri inceleyelim;

$$\text{Akım seviyesi } C_0 \text{ için voltajın ortalama etkisi} = \frac{(C_0 V_0) + (C_0 V_1)}{2} \quad (\text{Eşitlik 9})$$

$$= \frac{(C_0 V_0) + (C_0 V_1)}{2} \equiv \frac{(a_0 b_0) + (a_0 b_1)}{2} \equiv \frac{(1) + (b)}{2} \quad (\text{Eşitlik 10})$$

şeklinde hesaplanır.

$$\text{Akım seviyesi } C_1 \text{ için voltajın ortalama etkisi} = \frac{(C_1 V_0) + (C_1 V_1)}{2} \quad (\text{Eşitlik 11})$$

$$= \frac{(C_1 V_0) + (C_1 V_1)}{2} \equiv \frac{(a_1 b_0) + (a_1 b_1)}{2} \equiv \frac{(a) + (ab)}{2} \quad (\text{Eşitlik 12})$$

şeklinde hesaplanır.

Bu iki grup ortalamasını (veya toplamını) aşağıdaki gibi karşılaştırsak,

$$\begin{aligned} & [V_1 \text{ seviyesinin ortalama etkisi}] - [V_0 \text{ seviyesindeki ortalama etkisi}] \\ & \quad \frac{(b) + (ab)}{2} - \frac{(1) + (a)}{2} \end{aligned} \quad (\text{Eşitlik 13})$$

Eşitlik 13 voltajın ana etkisi= B'nin ana etkisini gösterir.

$$(C_0 V_1) - (C_0 V_0) \equiv (a) - (1) \quad (\text{Eşitlik 14})$$

Eşitlik 14 C_0 seviyesindeki akımın voltaja etkisini gösterir.

$$(C_1 V_1) - (C_1 V_0) \equiv (a) - (1) \quad (\text{Eşitlik 15})$$

Eşitlik 15 C_1 seviyesindeki akımın voltaja etkisini gösterir.

Potansiyel ve akımın ortalama etkileşim etkisi şu şekilde elde edilebilir:

[I_0 akım seviyesinde voltajın ortalama etkisi- I_1 akım seviyesinde voltajın ortalama etkisi] farklı akım seviyelerinde voltajın ortalama etkisini gösterir.

$$\frac{(C_1 V_1) - (C_1 V_0)}{2} - \frac{(C_0 V_1) - (C_0 V_0)}{2} \quad (\text{Eşitlik 16})$$

$$\frac{(ab) - (b)}{2} - \frac{(a) - (1)}{2} \quad (\text{Eşitlik 17})$$

Eşitlik 16 ve Eşitlik 17 ortalama etkileşim etkisini gösterir.

Aynı şekilde;

$$\frac{(C_0 V_0) + (C_1 V_0)}{2} = \frac{(1) + (b)}{2} \quad (\text{Eşitlik 18})$$

Eşitlik 18 Voltajın V_0 seviyesinde akımın ortalama etkisini göstermektedir.

$$\frac{(C_0 V_1) + (C_1 V_1)}{2} = \frac{(a) + (ab)}{2} \quad (\text{Eşitlik 19})$$

Eşitlik 19 Voltajın V_1 seviyesinde akımın ortalama etkisini göstermektedir.

Bu ikisinin karşılaştırılması;

$$[V_0 \text{ voltaj seviyesinde akımın ort. etkisi}] - [V_1 \text{ voltaj seviyesinde akımın ort. etkisi}]$$

$$= \frac{(C_0 V_1) + (C_1 V_1)}{2} - \frac{(C_0 V_0) + (C_1 V_0)}{2} \quad (\text{Eşitlik 20})$$

$$= \frac{(a) + (ab)}{2} - \frac{(1) + (b)}{2} \quad (\text{Eşitlik 21})$$

Eşitlik 21 akımın ana etkisi= A'nın ana etkisini gösterir.

$$(C_1 V_0) - (C_0 V_0) \equiv (b) - (1) \quad (\text{Eşitlik 22})$$

Eşitlik 22 V_0 seviyesindeki voltajın akıma etkisini gösterir.

$$(C_1 V_1) - (C_0 V_1) \equiv (ab) - (a) \quad (\text{Eşitlik 23})$$

Eşitlik 23 V_1 seviyesindeki voltajın akıma etkisini gösterir.

Akım ve voltajın ortalama etkileşim etkisi şu şekilde elde edilebilir:

Akımın farklı voltaj seviyelerinde ortalama etkisi

$$= \frac{(C_1 V_1) - (C_0 V_1)}{2} - \frac{(C_1 V_0) - (C_0 V_0)}{2} \quad (\text{Eşitlik 24})$$

$$= \frac{(ab) - (a)}{2} - \frac{(b) - (1)}{2} \quad (\text{Eşitlik 25})$$

Eşitlik 25 ortalama etkileşim etkisini gösterir. Farklı akım seviyelerinde voltajın ortalama etkileri ile aynıdır. Akım ve voltajın etkileşim etkisinin, voltaj ve akımın etkileşim etkisi ile aynı olması beklenir.

$$= \frac{(C_0V_0)+(C_1V_0)+(C_0V_1)+(C_1V_1)}{4} = \frac{(1)+(a)+(b)+(ab)}{4} \quad (\text{Eşitlik 26})$$

Eşitlik 26 uygulanan tüm kombinasyonların genel ortalama etkisini verir.

(ab) ögesini sembolik olarak (a)(b) şeklinde ele alırsak (matematiksel ve kavramsal olarak yanlıştır), tüm ana etkileri, etkileşim etkisini ve genel ortalama etkisini aşağıdaki gibi ifade edemeyiz:

A'nın ana etkisi;

$$= \frac{(a)+(ab)}{2} - \frac{(1)+(b)}{2} = \frac{1}{2}[(ab) - (b) - 1 + (a)] = \frac{(a-1)(b+1)}{2} \quad (\text{Eşitlik 27})$$

B'nin ana etkisi;

$$= \frac{(b)+(ab)}{2} - \frac{(1)+(a)}{2} = \frac{1}{2}[(ab) - (a) - 1 + (b)] = \frac{(a+1)(b-1)}{2} \quad (\text{Eşitlik 28})$$

A ve B'nin etkileşim etkisi;

$$= \frac{(ab)-(b)}{2} - \frac{(a)-(1)}{2} = \frac{1}{2}[(ab) - (a) + 1 - (b)] = \frac{(a-1)(b-1)}{2} \quad (\text{Eşitlik 29})$$

Genel Ortalama Etkisi (M);

$$= \frac{(1)+(a)+(b)+(ab)}{4} = \frac{1}{4}[(1) + (a) + (b) + (ab)] = \frac{(a+1)(b+1)}{4} \quad (\text{Eşitlik 30})$$

Bölenlerin yanı sıra + ve – işaretlerinin rollerine dikkat edin.

A ve B ile ilgili iki etki vardır.

Bir çarpanın etkisini elde etmek için ilgili çarpanı – işaretiyle, diğerlerini + işaretiyle yazılmalıdır. Örneğin, A'nın ana etkisinde, (a-1)'deki gibi - işaretiyle a, (b + 1)'deki gibi + işaretiyle b oluşur. AB'de her iki etki de mevcuttur, yani (a + 1)(b + 1)'deki gibi a ve b'nin her ikisi de + işaretlerle oluşur. Ayrıca, ana ve etkileşim etkilerinin, ortalamaların tipik farkları dikkate alınarak elde edildiğine dikkat edin, bu nedenle bölen 2'ye sahipken, genel ortalama etkisi tüm işlem kombinasyonlarına dayalıdır ve bu nedenle

bölen 4'e sahiptir. Bu mantığın arkasında iyi tanımlanmış bir istatistiksel teori vardır, ancak bu mantık nihai işlem kombinasyonunun kolayca yazılmasına yardımcı olur.

Uygulama kombinasyonlarının diğer popüler gösterimleri aşağıdaki gibidir;

$$a_0b_0 \equiv 0, 0 \equiv I \quad (\text{Eşitlik 5})$$

$$a_0b_1 \equiv 0, 1 \equiv a \quad (\text{Eşitlik 6})$$

$$a_1b_0 \equiv 1, 0 \equiv b \quad (\text{Eşitlik 7})$$

$$a_1b_1 \equiv 1, 1 \equiv ab \quad (\text{Eşitlik 8})$$

Bazen 0, 'düşük seviye' olarak adlandırılır ve 1, 'yüksek seviye' olarak adlandırılır. Burada I , her iki faktörün de daha düşük seviyelerde (a_0b_0 ya da $0,0$) olduğunu göstermektedir. Bu kontrol uygulaması olarak adlandırılır.

Tablo 4. İki faktörlü deney tasarımı matrisi

Faktöriyel etki	Uygulama Kombinasyonları				Bölen
	(1)	(a)	(b)	(ab)	
M	+	+	+	+	4
A	-	+	-	+	2
B	-	-	+	+	2
AB	+	-	-	+	2

2^2 faktöriyel deneyine ait matris Tablo 4'de verilmiştir ve karşılık gelen model aşağıdaki gibidir;

$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}, i=1,2, j=1,2, k=1,2,\dots,n \quad (\text{Eşitlik 31})$$

Burada her uygulama kombinasyonu için n sayıda sonuç elde edilir. Deneyler bir seferde bir faktör olarak yapıldığında, faktöriyel deneye kıyasla çok daha fazla kaynak gerekir. Hata varyansında 10 serbestlik derecesine sahip olmak için voltajda 6 akımda 10 tekrar gerekir. Toplam 40 ölçüm ile deney tamamlanmak zorundadır. Fakat RBD kullanılarak bu sayı 18 deneye de elde edilebilir (76). 2^2 faktörlü deneyin ANOVA tablosu Tablo 5'de verilmiştir.

Şimdiye kadarki durumu, her bir uygulama kombinasyonu için sadece bir cevap varsayarak, yani tekrarlama olmadan değerlendirildi. Uygulama kombinasyonlarının her biri için r kadar tekrarlanan sonuçlar elde edilirse, ana ve etkileşim etkileri için ifadeler şu şekilde ifade edilebilir;

A'nın ana etkisi;

$$= \frac{1}{2r} [(ab) - (b) - 1 + (a)] \quad (\text{Eşitlik 32})$$

B'nin ana etkisi;

$$= \frac{1}{2r} [(ab) - (a) - 1 + (b)] \quad (\text{Eşitlik 33})$$

A ve B'nin etkileşim etkisi;

$$= \frac{1}{2r} [(ab) - (a) + 1 - (b)] \quad (\text{Eşitlik 34})$$

Genel Ortalama Etkisi (M);

$$= \frac{1}{4r} [(1) + (a) + (b) + (ab)] \quad (\text{Eşitlik 35})$$

Tablo 5. 2^2 faktörlü deneyin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F
A	KT_A	1	$OK_A = \frac{KT_A}{1}$	$F_A = \frac{OK_A}{OK_E}$
B	KT_B	1	$OK_B = \frac{KT_B}{1}$	$F_B = \frac{OK_B}{OK_E}$
AB	KT_{AB}	1	$OK_{AB} = \frac{KT_{AB}}{1}$	$F_{AB} = \frac{OK_{AB}}{OK_E}$
$Hata$	KT_E	$4(r-1)$	$OK_A = \frac{KT_H}{4(r-1)}$	
Toplam	Total Kareler Toplamı (TK_T)	$4r-1$		

Hata nedeniyle karelerin toplamı aşağıdaki gibi hesaplanır;

$$KT_E = KT_T - KT_A - KT_B - KT_{AB} \quad (\text{Eşitlik 36})$$

A B ve AB'ye karşılık gelen F istatistiği;

$$F_A = \frac{OK_A}{OK_E} \sim F(1,4(r-1) \text{ } H_0 \text{ altında})$$

$$F_B = \frac{OK_B}{OK_E} \sim F(1,4(r-1) \text{ } H_0 \text{ altında})$$

$$F_{AB} = \frac{OK_{AB}}{OK_E} \sim F(1,4(r-1) \text{ } H_0 \text{ altında})$$

Karar kuralı, ilgili F istatistiğinin değeri, ilgili sıfır hipotezini reddetmektir.

$$F_{Etki} > F_{1-\alpha}(1,4(r-1)) \quad (\text{Eşitlik 37})$$

2.8.1.2. Üç Seviyedeki Faktörlerle Faktöriyel Deneyler (2^3 Faktöriyel Deney)

Tam bir faktöriyel deneyinde üç faktör olduğunu varsayalım - A, B ve C her biri iki düzeyde, yani sırasıyla a_0, a_1 ; b_0, b_1 ve c_0, c_1 . Toplam sekiz kombinasyon vardır ve kombinasyonlar aşağıdaki gibi sıralanır.

$$a_0b_0c_0, a_0b_0c_1, a_0b_1c_0, a_0b_1c_1; a_1b_0c_0, a_1b_0c_1, a_1b_1c_0, a_1b_1c_1$$

Her uygulama kombinasyonunun r tekrarı vardır, bu nedenle yanıt üzerindeki etkileri açısından analiz edilecek toplam gözlem sayısı $N = 2^3r = 8r$ 'dir.

Toplam yanıt değerlerini $Y_* = [(1), a, b, ab, c, ac, bc, abc]$ şeklinde simgelersek. Cevap değerleri üç olasılık tablosunda düzenlenir. Üç faktörlü deney tasarımı matrisi Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Üç faktörlü deney tasarımı matrisi

Faktöriyel etki	Uygulama Kombinasyonları							
	(1)	(a)	(b)	(ab)	(c)	(ac)	(bc)	(abc)
<i>M</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A</i>	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>B</i>	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>AB</i>	+	-	-	+	+	-	-	+
<i>C</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>AC</i>	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>BC</i>	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>ABC</i>	-	+	+	-	+	-	-	+

Tablo 6’da birkaç satır belirlendikten sonra, geri kalanın sembolleri basit bir şekilde çarpılmasıyla elde edilebilir. Örneğin, a’ya karşılık gelen sütunu için, A’nın + işaretine, B’nin - işaretine, yani AB’nin - işaretine (A işareti * B işareti) sahip olduğunu not ediyoruz. AB - işaretine, C’ye - işaretine sahip olduğunda, ABC’nin (AB’nin işareti * C’nin işareti) + işareti vb. Her satır kendisiyle çarpılırsa, M (ilk satır) elde ederiz. Herhangi iki satırın çarpımı, tabloda farklı bir satıra götürür. 2^3 sayıda deneyin ANOVA Tablo 7’de verilmiştir.

$$A.B=AB$$

$$AB.B=AB^2=A$$

$$AC.BC=AC^2BB=AB$$

Tablodaki yapı, ortalama etkinin tahmin edilmesine yardımcı olur. Örneğin, A’nın ortalama etkisi

$$A = \frac{1}{4r} [(a) + (ab) + (ac) + (abc) - (1) - (b) - (c) - (bc)] \quad (\text{Eşitlik 38})$$

Diğerleri de sırasıyla

$$B = \frac{1}{4r} [(b) + (bc) + (ab) + (abc) - (1) - (a) - (c) - (ac)] \quad (\text{Eşitlik 39})$$

$$C = \frac{1}{4r} [(c) + (ac) + (bc) + (abc) - (1) - (a) - (b) - (ab)] \quad (\text{Eşitlik 40})$$

$$AB = \frac{1}{4r} [(1) + (ab) + (c) + (abc) - (a) - (b) - (ac) - (bc)] \quad (\text{Eşitlik 41})$$

$$AC = \frac{1}{4r} [(1) + (b) + (ac) + (abc) - (a) - (ab) - (c) - (bc)] \quad (\text{Eşitlik 42})$$

$$BC = \frac{1}{4r} [(1) + (a) + (bc) + (abc) - (b) - (ab) - (c) - (ac)] \quad (\text{Eşitlik 43})$$

$$ABC = \frac{1}{4r} [(c) + (b) + (ab) + (abc) - (1) - (ac) - (bc) - (ab)] \quad (\text{Eşitlik 44})$$

Tablo 7. 2³ faktörlü deneyin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F
A	KT _A	1	$OK_A = \frac{KT_A}{1}$	$F_A = \frac{OK_A}{OK_E}$
B	KT _B	1	$OK_B = \frac{KT_B}{1}$	$F_B = \frac{OK_B}{OK_E}$
AB	KT _{AB}	1	$OK_{AB} = \frac{KT_{AB}}{1}$	$F_{AB} = \frac{OK_{AB}}{OK_E}$
C	KT _C	1	$OK_C = \frac{KT_C}{1}$	$F_C = \frac{OK_C}{OK_E}$
AC	KT _{AC}	1	$OK_{AC} = \frac{KT_{AC}}{1}$	$F_{AC} = \frac{OK_{AC}}{OK_E}$
BC	KT _{BC}	1	$OK_{BC} = \frac{KT_{BC}}{1}$	$F_{BC} = \frac{OK_{BC}}{OK_E}$
ABC	KT _{ABC}	1	$OK_{ABC} = \frac{KT_{ABC}}{1}$	$F_{ABC} = \frac{OK_{ABC}}{OK_E}$
Hata	KT _E	8(r-1)	$OK_E = \frac{KT_H}{8(r-1)}$	
Toplam	Total Kareler Toplamı (TK _T)	8r-1		

Karşılık gelen F-istatistikleri şu şekilde elde edilir;

$$F_{Etki} = \frac{OK_{Etki}}{OK_{Hata}} \quad (\text{Eşitlik 45})$$

İlgili sıfır hipotezi altında serbestlik dereceleri 1 ve hata serbestlik dereceleri ile bir F-dağılımı izler. Karar kuralı, $F_{Etki} > F_{1-\alpha}(1, df_{hata})$ olduğunda alfa anlamlılık düzeyinde karşılık gelen boş hipotezi reddetmektir.

2.8.2. Yüzey Yanıt Metodolojisi

Çoğu durumda, bazı kontrol edilebilir değişkenleri (faktörleri) bir yanıtla ilişkilendiren teorik model ya mevcut değildir ya da çok karmaşıktır. Bu durumda, faktörler ve tepki arasındaki ilişki hakkında bilgi deneye dayalı olarak elde edilmelidir (77). Box ve Wilson tarafından tanıtilen yanıt yüzeyi metodolojisi (YYM) amacı deneye dayalı bir modelle sorunları ortaya konduğu gibi analiz etmek olan, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir koleksiyonudur (68). Daha somut olarak amaçları şunlardır:

- Deneyel ilgi alanında bilgi üretmek.
- Deneyel değişkenliği güvenilir bir şekilde tahmin etmek (saf hata).
- Önerilen model ile deneyel veriler arasındaki yeterliliği garanti etmek (uyum eksikliğini tespit etmeyi kolaylaştırmak için).
- Gözlemlenen yanıtı, deney alanı içinde hiçbir deneyin yapılmadığı noktalarda mümkün olduğunca kesin olarak tahmin etmek.
- Elde edilen sonuçlara göre farklı alternatiflerle deney yapmak için sıralı stratejiler önermek.
- Ekonomik maliyet, zaman ve diğer pratik kısıtlamalar açısından yüksek bir verimliliği sürdürmek.
- Aykırı verilerin tanımlanmasını kolaylaştırmak için.
- Belirsizlik koşullarında karar vermeyi mümkün kılmak, belirsizliği azaltmak (77).

YYM, deneye dayalı model oluşturma ve modelin kullanımı için bir dizi matematiksel/istatistiksel tekniği kapsar. Deneylerin uygun tasarımı ve analizi yoluyla, YYM bir yanıtı onu etkileyen bir dizi girdi değişkeni veya faktörün düzeyleriyle ilişkilendirmeye çalışır.

İki seviyeli faktöriyel tasarımlar doğrusal olarak modellenir ve bu nedenle üç boyutlu uzayda ortaya çıkan yanıt yüzeyleri düz düzlemlerdir veya etkileşim durumunda bükülmüş düzlemlerdir. Bir yanıt yüzeyindeki eğrilik, iki faktörlü kuruluma bir merkez noktası eklenerek izlenebilir. Önemli bir eğrilik tespit edilirse, bir sonraki adım, mevcut

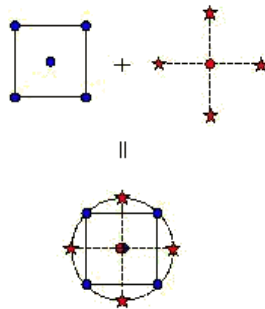
seviyeler içinde daha küçük tasarımların çalıştırılması veya YYM'nin kullanılması olabilir (77).

Burada, iki seviyeli faktöriyel tasarımların, belirli bir projede önemli girdi değişkenlerini sıralamak için kullanılan tarama yöntemleri olduğu tekrar edilmektedir. Çoğu durumda bu, optimizasyon amaçları için de yeterli olabilir. Bununla birlikte, yanıt yüzeyleri sıklıkla önemli bir eğrilik sergiler. Bu durumlarda YYM uygulaması en iyi yaklaşım olabilir.

Günümüzde, uygulayıcının hem tarama hem de optimizasyon için yanıt yüzey deneyleri oluşturmasına izin veren birçok tasarım aracı vardır. Düzenli faktöriyel ve kesirli faktöriyel planlar, Plackett-Burman, merkezi bileşik, küçük bileşik, Box-Behnken ve hibrit tasarımlar dâhil olmak üzere birçok yazılım paketi standart tasarımları oluşturur. Öncelikle D (test et ve değerlendir) kriterine dayanan bilgisayar tarafından oluşturulan tasarımların uygulanması önemli ölçüde artmıştır (78). Yanıt yüzeyi tasarımı, optimize edilmesi amaçlanan bir sürecin yanıtını birkaç faktörün etkilediği durumlarda hem modelleme hem de analiz için kullanılır. Yanıt yüzeyi analizi, merkezi kompozit tasarım ve Box Behnken tasarımı olarak adlandırılan iki türe sahiptir.

2.8.2.1. Merkezi Kompozit Tasarım

Yaygın olarak ‘Merkezi Kompozit Tasarım’ olarak adlandırılan bu tasarım çeşidi aslında bir Box-Wilson Merkezi Bileşik tasarımıdır. Eğrilme tahminine izin veren bir grup yıldız noktası ile merkezi noktalar içeren faktöriyel veya kesirli faktöriyel tasarımları içerir. Merkezden her faktöriyel noktaya ± 1 birim uzaklığa sahiptir. Aynı şekilde yıldız noktaların merkeze uzaklığı ise $|a| > 1$ şeklindedir (79). İki faktör için merkezi bileşik tasarımı Şekil 3’de gösterilmiştir.

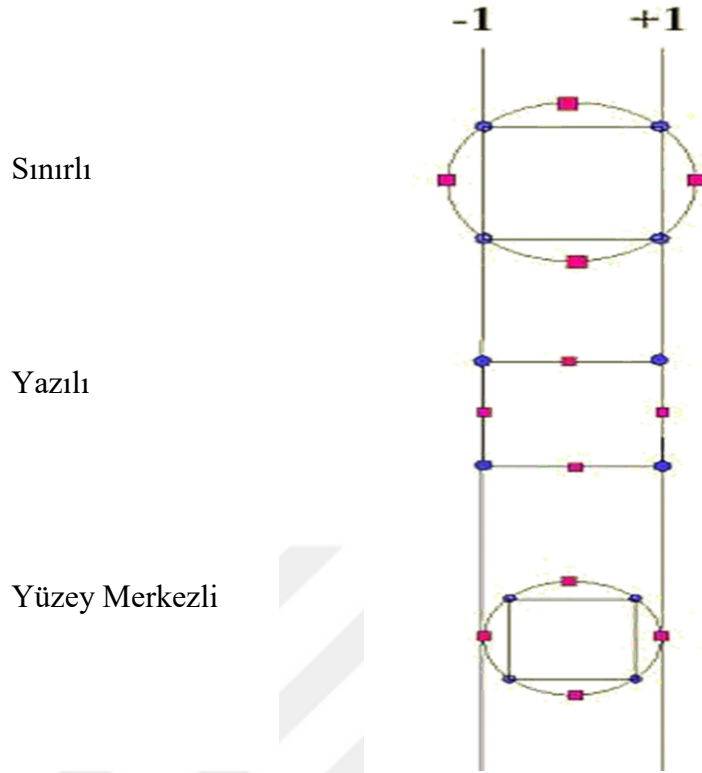


Şekil 3. İki faktör için merkezi bileşik tasarımı

3 çeşit merkezi kompozit tasarım tipi vardır. Bunlar; sınırlı, yazılı ve yüzey merkezlidir (Şekil 4). Sınırlı tasarımlar merkezi bileşik tasarımın orijinal şeklidir. ' α ' tasarımında istenen özelliklere ve tasarımdaki faktör sayısına bağlı olarak yıldız noktaları merkezden belli bir uzaklıkta bulunmaktadır. Yıldız noktaları, tüm faktörler için düşük ve yüksek ayarlar için yeni uç noktalar oluşturur. Bu tasarımlar dairesel, küresel veya hiper küresel simetriye sahiptir ve her faktör için 5 seviye gerektirir. Mevcut bir faktöriyel veya çözünürlüklü V kesirli faktöriyel tasarımın yıldız noktalarıyla genişletilmesi bu tasarımı üretebilir. Sınırlı tasarımlar, tüm tasarım alanı üzerinde yüksek kaliteli tahminler sağlar, ancak faktöriyel kısımdaki faktörlerin aralığı dışında faktör ayarları gerektirir (79).

Yazılı tasarımı, faktör ayarları için belirtilen limitlerin gerçekten limit olduğu durumlar için faktör ayarlarını yıldız noktaları olarak kullanır ve bu limitler dâhilinde bir faktöriyel veya kesirli faktöriyel tasarım oluşturur. Başka bir deyişle, bir yazılı tasarımı, yazılı tasarımı oluşturmak için sınırlı tasarımının her faktör seviyesinin α 'ya bölüldüğü küçültülmüş bir sınırlı tasarımıdır Bu tasarım ayrıca her faktörün 5 seviyesini gerektirir. Yazılı tasarımlar, yalnızca başlangıçta belirtilen faktör aralıkları içindeki noktaları kullanır, ancak sınırlı ile karşılaştırıldığında tüm alan üzerinde aynı yüksek kaliteli tahmini sağlamaz (79).

Yüzey merkezli ise yıldız noktaları faktör uzayının her yüzünün merkezindedir, yani $\alpha = \pm 1$. Bu çeşitlilik, her faktörün 3 seviyesini gerektirir. Mevcut bir faktöriyel veya çözünürlüklü V tasarımını uygun yıldız noktalarıyla zenginleştirmek de bu tasarımı üretebilir. Yüzey merkezli tasarımlar, tüm tasarım alanı üzerinde nispeten yüksek kaliteli tahminler sağlar ve orijinal faktör aralığının dışındaki noktaların kullanılmasını gerektirmez. Ancak, saf ikinci dereceden katsayıları tahmin etmek için zayıf kesinliğe sahiptir.



Şekil 4. Üç tip merkezi kompozit tasarımı

Şekil 4’de, iki faktör için üç tür merkezi bileşik tasarımı gösterilmektedir (80). Sınırlının en büyük işlem alanını ve Yazılının en küçük işlem alanını araştırdığını görmekteyiz. Hem Sınırlı hem de Yazılı dönebilir tasarımlardır, ancak Yüzey Merkezli değildir. Sınırlı tasarım da tasarım noktaları, faktör karesi etrafında çevrelenmiş bir daireyi tanımlar. Üç faktör için, Sınırlı tasarım noktaları, faktöriyel küpün etrafındaki bir küreyi tanımlar. α değeri dönebilirliği korumak için seçilir. Dönebilirliği korumak için α ’nın değeri, merkezi bileşik tasarımın faktöriyel kısmındaki deneysel çalışmaların sayısına bağlıdır. Dönebilirlik, herhangi bir x noktasında tahmin edilen tepkinin varyansı yalnızca x ’in tasarım merkez noktasından olan uzaklığına bağlıysa tasarım dönebilir. Bu özelliğe sahip bir tasarım, x ’teki tahmin varyansını değiştirmeden merkez noktası etrafında döndürülebilir (81).

$$\alpha = [\text{faktöriyel çalışma sayısı}]^{1/4}$$

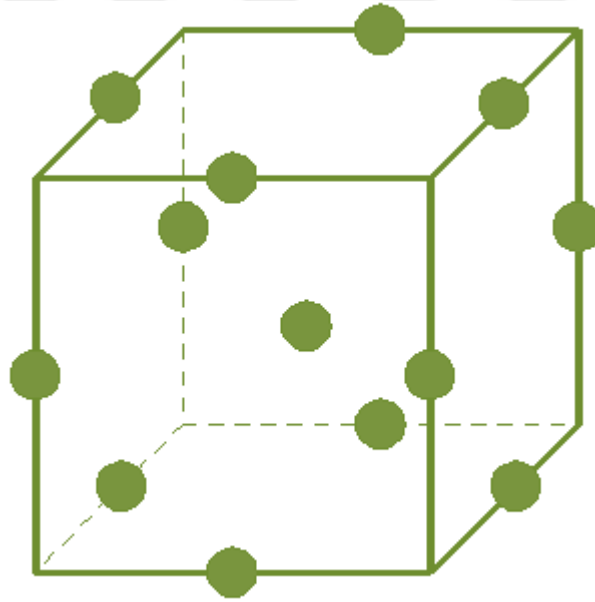
Faktöriyel tasarım tam faktöriyel ise, o zaman aşağıdaki şekilde olur

$$\alpha=[2^k]^{1/4}$$

Bununla birlikte, faktöriyel kısım aynı zamanda bir V çözümünün kesirli faktöriyel tasarımı da olabilir.

2.8.2.2. Box- Behnken Tasarım

Box-Behnken tasarımı, gömülü faktöriyel veya kesirli faktöriyel tasarımı içermediği için bağımsız bir ikinci dereceden tasarımıdır. Bu tasarımda işlem kombinasyonları işlem alanının kenarlarının orta noktalarında ve merkezdedir (Şekil 5). Bu tasarımlar dönebilir (veya neredeyse dönebilir) ve her faktörün 3 seviyesini gerektirir. Tasarımlar, merkezi bileşik tasarımlara kıyasla ortogonal engelleme için sınırlı kapasiteye sahiptir (82).



Şekil 5. Üç faktör için Bir Box-Behnken tasarımı

Bu tasarımın geometrisi, kürenin yüzeyi, alanın her bir kenarının orta noktasına teğet olacak şekilde her yüzden çıkıntı yapacak şekilde, işlem alanı içinde bir küre önerir. Üç faktörü araştırırken kullanılabilecek dört ortak ikinci dereceden tasarımın yapılarını karşılaştırsak, yapısal olarak aynı oldukları için Sınırlı ve Yazılı tasarımlarını birleştirmek gerekir.

Üç faktör için Box-Behnken tasarımı, daha az sayıda çalıştırma gerektirme konusunda bazı avantajlar sunar. 4 veya daha fazla faktör için ise bu avantaj ortadan kalkar (82).

Tablo 8. Merkezi Kompozit Türleri ve Box-Behnken tasarımlarının üç faktör için yapısal karşılaştırmaları

Sınırlı ve Yazılı				Yüzey Merkezli				Box- Behnken			
Sayı	X ₁	X ₂	X ₃	Sayı	X ₁	X ₂	X ₃	Sayı	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	0
1	+1	-1	-1	1	+1	-1	-1	1	+1	-1	0
1	-1	+1	-1	1	-1	+1	-1	1	-1	+1	0
1	+	+1	-1	1	+	+1	-1	1	+1	+1	0
1	-1	-1	+1	1	-1	-1	+1	1	-1	0	-1
1	+1	-1	+1	1	+1	-1	+1	1	+1	0	-1
1	-1	+1	+1	1	-1	+1	+1	1	-1	0	+1
1	+1	+1	+1	1	+1	+1	+1	1	+1	0	+1
1	-1.682	0	0	1	-1	0	0	1	0	-1	-1
1	+1.682	0	0	1	+1	0	0	1	0	+1	-1
1	0	-1.682	0	1	0	-1	0	1	0	-1	+1
1	0	+1.682	0	1	0	+1	0	1	0	+1	+1
1	0	0	-1.682	1	0	0	-1	3	0	0	0
1	0	0	+1.682	1	0	0	+1				
6	0	0	0	6	0	0	0				
Toplam Deneme Sayısı = 20				Toplam Deneme Sayısı = 20				Toplam Deneme Sayısı = 15			

Tablo 8’de durumda 1’den 8’e kadar olan işlemler tasarımdaki faktöriyel noktalardır, 9 ila 14 arasındaki uygulamalar yıldız noktalarıdır ve 15 ila 20, sistem tarafından önerilen merkez noktalarıdır. Sınırlı tasarımında her bir faktörün düşük ve yüksek değerlerinin yıldız noktalarını oluşturmak için nasıl genişletildiğini görmekteyiz. Yazılı tasarımda, belirtilen alt ve üst değerler yıldız noktaları haline gelir ve sistem, tasarımın bu sınırlar içindeki faktöriyel kısmı için uygun ayarları hesaplar. Box- Behnken tasarımı 3 veya 4 faktörü içeren durumlarda, merkezi bir bileşik tasarıma göre daha az işlem kombinasyonu gerektirir. Box-Behnken tasarımı dönebilir (ya da neredeyse dönebilir), ancak yazılı gibi düşük tahmin kalitesine sahip bölgeleri içerir. "Eksik köşeleri", deneyi yapan kişinin birleşik faktör aşırılıklarından kaçınması gerektiğinde yararlı olabilir. Bu özellik, bu durumlarda olası bir veri kaybını önler.

Tek tekrarlı bir Box-Behnken tasarımı için gerekli deney sayısı Eşitlik 46’da verilen formülle hesaplanır ve işlem sayısı Tablo 9’daki gibidir.

$$\text{Uygulama Sayısı} = 2[k(k-1)]+1$$

(Eşitlik 46)

Tablo 9. Merkezi Kompozit ve Box-Behnken tasarımlarına gereken işlem sayısı

Faktör Sayısı	Merkezi Kompozit	Box-Behnken
2	13 (5 merkez noktası)	-
3	20 (6 merkez noktası denemesi)	15
4	30 (6 merkez noktası denemesi)	27
5	33 (kesirli faktöriyel) veya 52 (tam fakt.)	46
6	54 (kesirli faktöriyel) veya 91 (tam fakt.)	54

Merkezi Kompozit ve Box-Behnken arasındaki fark nedir diye sormamız gerekirse: Merkezi kompozit tasarımlar gibi, Box-Behnken tasarımları da tam bir ikinci dereceden modele uyabilen yanıt yüzeyi tasarımlarıdır. Çoğu merkezi bileşik tasarımın aksine, Box-Behnken tasarımları her faktörün yalnızca üç seviyesini kullanır. Bu, faktörler nicel olduğunda ancak ulaşılabilir değerler kümesi küçük olduğunda onları çekici kılar.

2.9.Biyolojik Aktivite

Canlı hücrelerde ve insan vücudunda oluşan tepkiler biyolojik olarak adlandırılır. Biyolojik aktivite metabolik veya fizyolojik bir yanıt olarak ortaya çıkan, bir moleküle maruz kalmanın belli bir etkisi olan ölçüm sonucu olarak tanımlanabilir. Çok basit sistemlerden çok karmaşık sistemlere kadar birçok sisteme uygulanabilir. Bu uygulamalar in vivo ve in vitro olarak incelenebilir. Absorbsiyon, taşınma, metabolize olma boşaltım gibi sistemler ile biyolojik aktivite ölçümleri gerçekleştirilir. Biyolojik aktivitenin diğer bir tanımı ise; bir çözünenin termodinamik aktivitesini, bir aktivite katsayısı aracılığıyla konsantrasyonuna bağlayan denkleme yüzeysel olarak benzemesi şeklindedir (83). Burada anlatılmak istenen; moleküler bir varlığın biyolojik aktivitesi $A=cf$ olarak tanımlanır; burada A aktivitedir, c madde miktarı konsantrasyonudur ve f ‘doğal aktivite’ olarak belirtilen bir parametredir. Birimler ve aktivite tipi, katalitik (katal) veya bağlanma (mol^{-1} L) ile belirlenir. Ölçülen, bir etkinliğin izlendiği varlığı tanımlayan kimyasal bir denklemlerle tanımlanır.

Biyolojik süreçlerin çok önemli olması, biyolojik aktiviteler ile onları ifade eden kimyasal maddeler arasındaki işlevsel ilişkilerin tanımına parça parça yaklaşımları teşvik etmiştir (83). Biyolojik aktivite bir cevaptır. Özellikle biyolojik fonksiyon bozukluğu belirteçlerinin sınır değerlerine dayanarak hayat kurtaran veya hayatı tehdit eden kararlar veren araştırmacılar için bir bilgi iletme kanalı olarak da adlandırılabilir.

Biyolojik aktivite çalışmaları canlı üzerindeki etkileri yönünden birçok alanında in vivo ve in vitro çalışılmaktadır. Literatüre bakıldığında en sık rastlanan çalışmalar ise antioksidan ve antimikrobiyal çalışmalardan oluşmaktadır.

2.9.1. Serbest Radikal Türleri

Valens elektron orbitallerinde bir tane eşleşmemiş elektronu bulunan atom ya da moleküllere radikal adı verilir. Kararlı ve kararsız formları mevcuttur ancak yapılarındaki eşleşmemiş bu elektron aşırı bazen olduğundan çevresinde bulunan diğer moleküllere atak yapar. Bu ataklar sonucu ise bazen zincir reaksiyonlar oluşur. Saldırgan doğaları gereği biyolojik sistemlerde bulunan DNA, protein ve lipitlere saldırısı ise bilinmektedir (84). Daha önce de bahsedildiği gibi kalp hastalıkları, kanser ve diğer hastalıkların oluşmasında öncü oldukları bilinmektedir (85-87). Serbest radikaller 4 ana grupta toplanır. Bunlar oksijen atomlu, azot atomlu, kükürt atomlu ve klor atomlu temellidir. Literatürde kalıplaşmış kullanımları ROS (reactive oxygen species) reaktif oksijen türleri, RNS (reactive nitrogen species) ise, reaktif azot türleri olarak yer alır. Kükürt kaynaklı olanlar RST ve klor kaynaklı olanlar RKT olarak isimlendirilir. Biyolojik sistemlerde sıkça yer alan radikaller Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Biyolojik sistemlerde yer alan bazı radikaller

Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Azot Türleri	
Radikal İsmi	Radikal Formülü	Radikal İsmi	Radikal Formülü
Hidroksil	(OH•)	Nitrik oksit	(NO•)
Süperoksit	(O ₂ •)	Azot di oksit	(NO ₂ •)
Lipit peroksil	(LOO•)		
Peroksil	(ROO•)		
Alkoksil	(RO•)		
Hidroperoksil	(HO ₂ •)		

Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerine ait radikallerin bir kısmı serbest radikallerden oluşurken, bir kısmı da canlılar tarafından üretilen ve canlı organizmada kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilen nonradikalik molekül türlerine dönüştüğü ve bu dönüşümün patolojik ve fizyolojik durumlar altında gerçekleştiği bilinmektedir. Valens orbitallerinde eşlenmemiş elektron olmadığı için bu türler radikalik özellik göstermezler (85-88).

2.9.2. Antioksidanlar ve Antioksidan Aktivite

Öncelikle oksidan madde ve oksidan maddelerin canlı organizma üzerine etkisinin ne olduğunu bilirsek, antioksidan maddelerin neden önemli olduğunu daha iyi anlayabiliriz. Oksidan madde, karşısında bulunan molekülü ya da elementi yükseltgeyen madde olarak tanımlanabilir. Kendisi elektron alarak indirgenirken karşıdaki molekülü yükseltgeyen bir mekanizma ile çalışır.

Oldukça reaktif olan bu moleküller insan vücudunda bulunan ve çevrede bulunan diğer maddelerle etkileşerek yapılarında değişime neden olurlar. İnsan vücudu yapısını oluşturan protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve lipidlerin yapısına yapılacak moleküler atak ile değişme oluşması insan sağlığı açısından kritik bir önem taşımaktadır. Bu yapılarda oluşacak hasara bağlı olarak hastalıklar ve inflamasyon gözlenebilmektedir. Bir maddenin oksijen ya da oksitlenmeye neden olan başka bir madde ile gerçekleştirdiği bu kimyasal tepkimelerin giderilebilir olması insan sağlığı açısından aşırı önemlidir.

Reaktif özellik gösteren bu moleküllerin sistemde birikmesi sonucu oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres ile birlikte vücut yapısında bulundurduğu eşleşmiş oksijen elektronları ikiye ayrılır. Tek başına ve eksik elektronuyla ortamda bulunan bu moleküller serbest radikal adını alır. Reaktif oksijen türleri tüm radikalleri temsil eder. Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin varlığı yaklaşık 70 yıl önce keşfedilmiştir (89). Canlı vücudunda serbestçe bulunan bu radikaller kalp hastalıkları, kanser ve diğer hastalıkların oluşmasında öncü olurlar. Vücutta oluşan bu serbest radikaller aslında doğal bir sürecin sonunda oluşur.

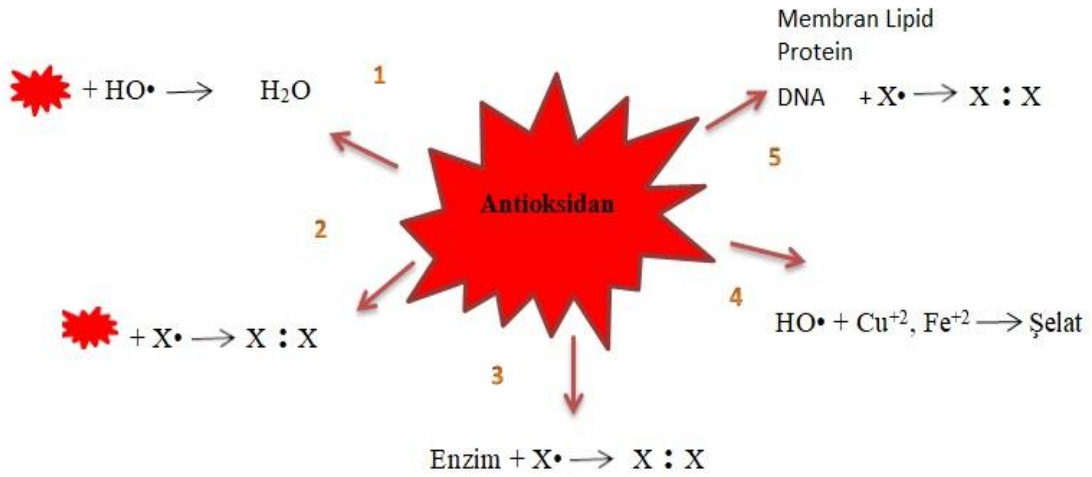
Serbest radikallerin oluşumunda öncü olan dış etmenler, çok yoğun yağ asidi içeriği olan besinlerin tüketilmesi, alkol ve sigara, aşırı güneşlenmeden kaynaklı radyasyon, bazı minerallerin aşırı tüketimi, yoğun ve aşırı yapılan egzersizler, antioksidan içeriği yüksek besinlerin çok aşırı tüketimidir, bu sebeplerle oksidatif stres düzeyi artabilir.

Bir insan ne kadar sağlıklı beslenip, sağlıklı yaşamaya çalışsa da vücudunda oluşacak olan serbest radikallerin oluşumunu engelleyemez. Serbest radikaller çok zararlı etkiye sahip olsa da vücutta üretiliyor olmasının bir amacı da bağışıklık sistemindeki enfeksiyona neden olan mikropları ortadan kaldırmak için kullanılmasıdır (90,91). Nefes almamızla vücudumuza aldığımız oksijen ile başlayan bu süreci enerji üretiminin gerçekleştiği mitokondri de radikal oluşumu ile sonuçlanır. Besin olarak aldığımız yağ asitleri ve şekerin sindirilmesiyle yan ürün olarak radikaller de vücuda salınır.

Antioksidan maddeler oksitlenmeye, buna bağlı radikallerin oluşmasını yavaşlatan ve azaltan maddeler olarak tanımlanabilir. Doğal olarak ortaya çıkmalarının yanı sıra çevresel faktörler ve basınçla ortaya çıkan bu dengesiz radikal moleküllerinin neden olduğu hasarı gidermede antioksidan maddeler büyük rol oynar. Antioksidan kaynakları hem diyetle alınan gıdalardan hem de vücudun doğal olarak ürettiği hali hazırda vücudumuzda bulunan moleküllerden oluşur.

Antioksidan aktivite, aktif radikallerden kaynaklı oksidasyon ile lipid ve proteinlerin yapısında oluşan zincir reaksiyona bağlı bozunmaların azaltılması ve durdurulması olarak tanımlanabilir.

Antioksidan aktivite için çalışma mekanizması 5 adettir (Resim 4). Radikal temizleme mekanması ile reaktif oksijen türlerinin doğrudan söndürülmesi, $H\bullet$ türlerinin bağışı, oksidatif enzimlerin inhibisyonu, O_2^- ve H_2O_2 'yi $HO\bullet$ 'ye dönüştüren geçiş metallerinin şelasyonu ve hasarlı hücre bileşenlerinin onarımıdır.



Resim 4. Antioksidan çalışma mekanizmaları

Özetle bahsetmek gerekirse; birinci yol reaktif oksijen türlerinin söndürülmesiyle, bunun için radikal yakalama mekanizması aracılığıyla doğrudan zincir reaksiyonlarının kesilmesi sağlanır ve böylece oksidasyon reaksiyonları inhibe edilir.

2. mekanizma, oluşan kararsız serbest radikale bir $H\bullet$ türü bağışlayarak kararlı molekülün geri kazanılmasıyla sağlanır, böylece pratik olarak reaktif olmayan ve var olan

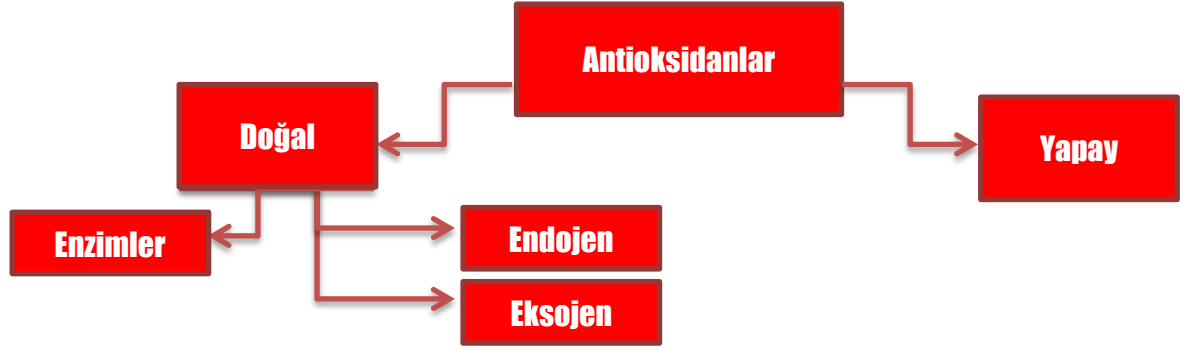
zincir reaksiyonun daha fazla yayılmasına izin vermeyen daha kararlı bir radikal elde edilir.

Antioksidan etki için başka bir yol ksantin oksidaz, protein kinaz C ve benzerleri gibi oksidatif enzimlerin inhibisyonuna karşılık gelir ve reaktif oksijen türleri üretiminin azalmasına neden olur.

4. olası mekanizma O_2^- ve H_2O_2 'nin oldukça saldırgan $HO\bullet$ radikaline dönüştürülmesinde yer alan Fe^{+2} ve Cu^+ gibi metal kaynaklı serbest radikal oluşumunu önleyen şelatlaştırma reaksiyonu sağlayan geçiş metalleriyle sağlanır.

Son olarak, sonuncusu zar lipitleri, proteinler ve DNA gibi önemli hücre bileşenlerinde hâlihazırda meydana gelen hasarın onarılmasından oluşur. Antioksidan aktivitenin görülebilmesi için yukarıda sıralanan mekanizmaların tek başına veya koordine bir şekilde çoklu olarak gerçekleşmesi gerekir. Ek olarak, belirli bir antioksidan, a-tokoferol gibi diğer güçlü antioksidanların rejenerasyonu yoluyla antioksidan savunmayı yukarı doğru düzenleyerek veya koruyarak sinerjistik olarak da hareket edebilir (92-95).

Antioksidan türleri doğal türler ve doğal olmayan türler olarak 2'ye ayrılır (Şekil 5). Doğal türler, enzimatik olan ve enzimatik olmayan olarak kendi içinde 2'ye ayrılmaktadır. Doğal olmayan antioksidanlar ise ayrıca yapay antioksidanlar olarak adlandırılmaktadır. Yapay antioksidanlar bütil hidroksitoluen (BHT), Ter-butilhidrokinon, bütil hidroksianisol (BHA) ve Troloks gibi maddelerden oluşur (96). Enzim antioksidanlar Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz, Katalaz, Glutasyon S-Transferazlar, Sitokrom oksidaz, Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz (84) gibi enzimlerinden oluşurken, enzimatik olmayanlar da endojen ve eksojen olmak üzere kendi içinde 2'ye ayrılır. Endojen türler; bilirubin, ferritin, ürik asit, glutasyon, albümin, haptoglobinlerden oluşan antioksidanları içerirken, eksojen türler, e vitamini, alkaloidler β -karotenoitler, askorbik asit, flavonoidler, polifenollerden oluşur. Reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türlerinin vücutta patolojik sonuçlara neden olduğu bilinmektedir. Bu türlerin aktivasyonunu çeşitli mekanizmalarla söndüren antioksidan türlerini içeren özet şekil aşağıda gösterilmiştir



Resim 5. Antioksidan türleri

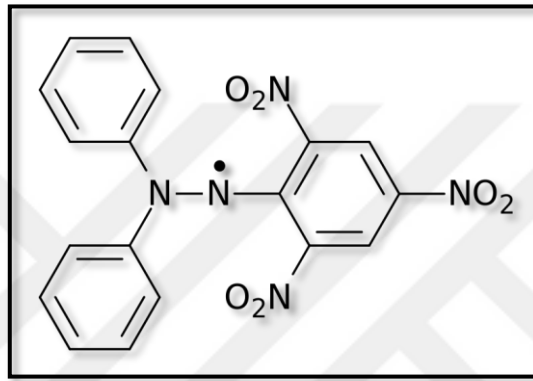
2.9.3. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

Bitkisel ürünlerin, sentezlenen yeni molekül ve olası etken maddelerin, gıdaların antioksidan kapasitesini değerlendirmek için birçok farklı metot kullanılmaktadır. Bu metotlar elektron ve hidrojen atomunun transferine bağlı olmak üzere iki gruba ayrılır. Oksijen radikal absorban kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemleri çözücü ve pH etkisinden kısmi bağımsız çalışır ve analizler çok kısa sürelerde tamamlanır. Bu yöntemlerin temeli hidrojen atomunun transferine dayanır, peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat arasındaki rekabeti ölçülür.

Literatürde sıkça rastlanan toplam fenolik madde yöntemi, Troloks eşdeğeri antioksidan (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan yöntemi (CUPRAC) ve (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü antioksidan (DPPH) yöntemi elektron transfer yöntemlerini oluşturmaktadır. Yöntemler, antioksidan aktivite daha yavaş gerçekleşen çözücü ve pH'a bağımlı olması yanında ölçümler kolorimetrik olarak yapılır. Bu yöntemler antioksidanın indirgeyici yeteneğini ölçerken, hidrojen atomunun transferine bağlı yöntemler substratın hidrojen verme kapasitesini ölçer. Literatüre bakıldığında elektron transferini ölçen yöntemler, hidrojen atomu transferini ölçen yöntemlere göre daha az tercih edilmektedir (97).

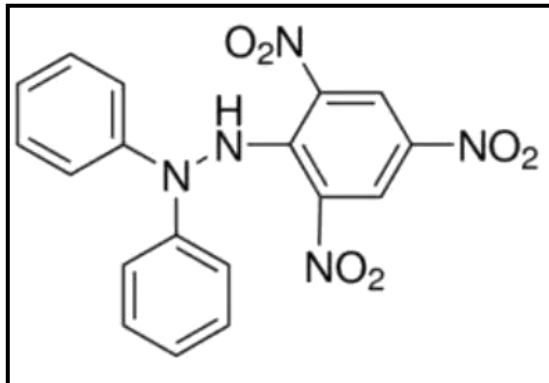
2.9.3.1. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürme Tayini

1995 yılında geliştirilen metodun, 1998 yılında modifiye edildiği literatürde mevcuttur (98,99). Bu yöntemin temelini 517 nm’de absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi oluşturur. DPPH kararlı bir radikaldir (Resim 6). DPPH radikaline bir protonun antioksidan madde tarafından aktarılması ile radikalik etki söndürülür. Ne kadar az antioksidan maddesi ile radikal söndürülmesi gerçekleşirse maddenin antioksidan aktivitesinin o kadar çok yüksek olduğu söylenebilir.



Resim 6. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali

AH ile gösterilen antioksidan radikal süpürülmesi sonucu $A^\bullet$ şekline dönüşür. Radikal ise valens orbitalindeki eksik elektronu $H^\bullet$ ile tamamlamış olur (Resim 7).

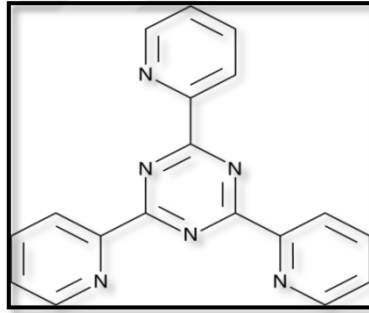


Resim 7. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin H transferi yapılmış hali

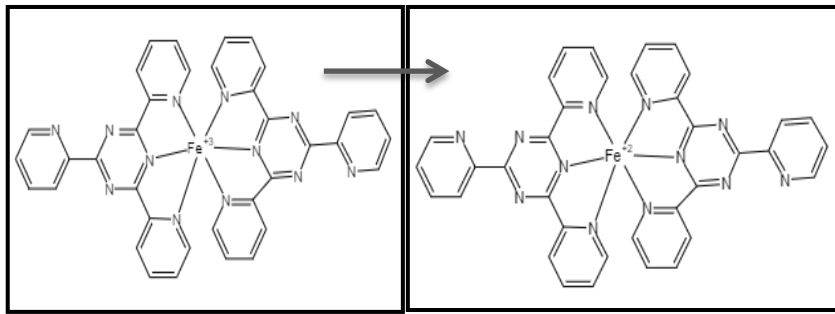
2.9.3.2. (FRAP) Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç Tayini

FRAP tayini, Benzie ve Strain tarafından 1999 yılında geliştirilmiş doğrudan bir "toplam antioksidan güç" testidir. FRAP testi sağlam, hassas, basit ve hızlıdır. Deneysel ve klinik çalışmaları kolaylaştırır. Kan plazması gibi taze biyolojik sıvıların toplam antioksidan gücünün ölçümü doğrudan ölçülebilir; çeşitli diyet maddelerinin antioksidan içeriği objektif ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçülebilir ve vücudun antioksidan durumunu iyileştirme potansiyelleri araştırılabilir (100).

Spektrofotometrik ölçüm 593 nm’de koyu mavi renkli son ürün olan Fe(II)-TPTZ kompleksinin absorbansının ölçülmesi ile tamamlanır. Ön hazırlık aşamasında Fe^{+3} ’ün TPTZ molekülü (Resim8) ile tepkimesi sonucu Fe(III)-TPTZ kompleksi oluşturulur daha sonra antioksidan varlığında Fe^{+3} ’ün Fe^{+2} ’ye indirgenmesiyle son ürün Fe(II)-TPTZ kompleksini (Resim 9) oluşturması ve bu molekülün konsantrasyonuna bağlı absorbans ölçümü esasına dayanır. Hassas, basit, hızlı ve ucuz olması nedeniyle araştırmacılar tarafından sıkça tercih edilen bir yöntemdir. Sonuçlar antioksidan standart bir madde olan Trolox eşdeğeri şeklinde verilir.



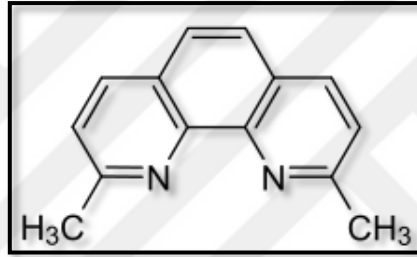
Resim 8. 2,4,6-Tripyridyl-S-triazine (TPTZ) molekülü



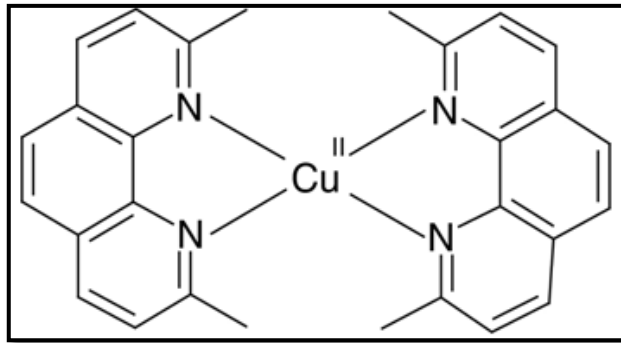
Resim 9. Fe(III)-TPTZ’nin antioksidan varlığında Fe(II)-TPTZ’ne indirgenmesi

2.9.3.3. (CUPRAC) Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini

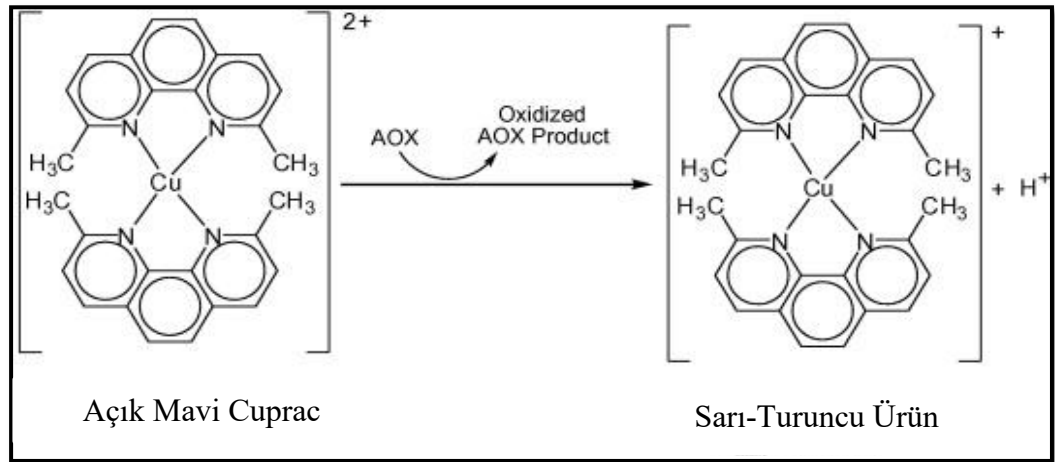
Apak ve arkadaşları tarafından FRAP yöntemine bir alternatif olarak 2004 yılında geliştirilmiştir (101). Cu^{+2} iyonunun kinetiğinin, Fe^{+3} iyonuna göre daha hızlı olmasından dolayı yeni bir alternatif olarak düşünüldü. 450nm’de spektroskopik bir yöntemle analizler tamamlanır. Stabilitesi yüksek, ucuz, tekrar edilebilirliği yüksek, pH değişimlerine uygun olması ve lipofil moleküllere uygulanabilirliği ile tercih edilen bir yöntemdir. Yöntemin temeli, heterosiklik bir molekül ve şelatlayıcı olan 2,9-dimetil- 1,10-fenantrolin (Neokuproin) (Resim 10) bileşiği ile Cu^{+2} molekülünün redoks reaksiyonu sonucu bakır(I)-neokuproin kompleksinin (Resim 11) oluşmasıdır (102). Antioksidan madde ile etkileşimi ile mavi renkli bakır(I)-neokuproin kompleksi (Resim 12) sarı-turuncu renge dönüşür



Resim 10. 2,9-dimetil- 1,10-fenantrolin (Neokuproin) molekülü



Resim 11. Bakır(II)-neokuproin kompleksi



Resim 12. Bakır (I)-neokuproin kompleksi (Özyürek'den, 101)

2.9.4. *Origanum* Türlerinin Üzerinde Yapılan Antioksidan Çalışmalar

2011 yılında *O. micranthum*, *O. minutiflorum* ve *O. rotundifolium* üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar ile metanollü ekstraktlar elde edilip bu ekstraktlardan alt ekstraktlar hazırlanıp izolasyona devam edilmiştir (2).

O. micranthum bitkisinden, 1-tetradekanol, ursolik asit ve oleanolik asitten oluşan bir karışım, rosmarinik asit, [4(3,4- dihidroksibenzoiloksimetil)fenil-β-D-glukopiranozit], Salvianic asit A bileşikler izole edilmiştir. Bileşik türleri triterpen, doymuş yağ alkolü ve fenolik bileşiklerden oluşmaktadır. *O. minutiflorum* bitkisinden, 1-tetradekanol, rosmarinik asit, apigenin, visenin-2 izole edilmiştir. Bileşik türleri doymuş yağ alkolü, flavonoid ve fenolik bileşiklerden oluşmaktadır. *O. rotundifolium* bitkisinden ise 1-tetradekanol, rosmarinik asit, litospermik asit izole edilmiştir. Bileşik türleri fenolik asit ve doymuş asit alkolünden oluşmaktadır. Biyolojik aktivite kısmında nöroprotektif etkiler incelenmiş, bunun için hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar sonucu bazı *O. micranthum* bitkisine ait metanol ekstraktların aktif olduğu görülmüştür. İzole edilen rosmarinik asitin de aynı şekilde yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre uygun dozda kullanıldıklarında Parkinson, Alzheimer, Epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklardan korunmada kullanılabilecekleri ön görülmüştür (2). Diğer *Origanum* türlerine yapılan çalışmalarda; 1999 yılında *O. compactum* bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada uçucu yağ bileşenleri saptanmış ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Karvakrol, *p*-simen, *γ*-terpinen major uçucu bileşikler oluştururken

antioksidan aktivite çalışmaları asit değeri ve peroksit değeri ile tayin edilmiş ve antioksidan aktivitesinin olduğu gözlemlenmiştir (103).

Origanum vulgare L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart üzerine yapılan çalışmada, 3 ayrı lokasyondan elde edilen türün uçucu yağ analizleri ayrı ayrı gerçekleştirilmiş ve DPPH ile antioksidan tayini yapılmıştır. Çalışmada elde edilen bulgulara iyi bir antioksidan aktivite gösterdiği ve uçucu bileşenlerinin farklı içeriğe sahip olduğu görülmüştür (104).

O. onites and *O. vulgare* ssp. *Hirtum* üzerine yapılan çalışmada uçucu yağları elde edilmiş ve β -karoten ağartma testi antioksidan aktivite tayini için kullanılmış olup, antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Uçucu yağ olarak major bileşenler karvakrol (%79.32, %68.19) *p*-simen (%4.32, %6.81) ve γ -terpinene (%3.94, %4.63) oranlarında görülmüştür (105).

2004 yılında yürütülen başka bir çalışmada ise *O. onites*, *O. syriacum*, *O. minutiflorum* bitkilerinin sulu ekstrelerinin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu aktiviteye sebep olan şeyin ise bitkilerin içeriğinde bulunan fenolik bileşenler olduğu iddia edilmiştir (106).

2.9.5.Antimikrobiyal Aktivite

Organizma, canlı sistemde varlığını sürdürebilmek için gerekli sistemlerin bir araya gelmesi ile oluşan karmaşık yapı diye tanımlanabilir. Yeni Latince'de 'Mikro' kelimesi eski Latince'de ise 'mikros', küçük anlamını karşılayan sözcüktür. Bu iki kelimeden türeyen mikroorganizma kelimesi gözle görülemeyecek kadar küçük canlı sistemlerini tanımlamak amacıyla kullanılır. Bu mikroorganizmalardan bir kısmı mikropları oluşturur.

Mikroorganizmalar bulaşıcı hastalıkların öncüleri prion ve virüsler de dâhil olmak üzere, bakteri, protozoa (tek hücreli bakteri), algler ve mantarları da içeren bir gruptan oluşur. Robert Hooke ve Antoni van Leeuwenhoek 1665-1683 yılları arasında mikroskobik organizmaların keşfini yapmıştır (107). 1665 yılında Hooke, bir mikroorganizma olan mikrofungus *Mucor*'un yayınlanan ilk betimlemelerini sunmuş, Leeuwenhoek daha sonra, mikroskobik protozoa ve bakterileri gözlemlemiş ve tanımlamıştır (108,109).

Mikroorganizmaların sınıflandırılması yapılarına, morfolojik özelliklerine, fizyolojik özelliklerine, antijenik yapılarına göre, sayısal ve genetik olarak yapılır.

Yapılarına göre;

- Ökaryotlar
- Prokaryotlar
- Virüsler
- Prionlar
- Mantarlar

Morfolojik özelliklerine göre;

- Boyanma özelliklerine göre; (Gram + ve Gram -). Mikroskopta mor görünenler + pembe görünenler ise – olarak sınıflandırılır.
- Mikroskopik morfolojilerine göre; gerçek bakteriler ve filamentöz bakteriler. Gerçek bakteriler (KOK, Çomak, Spiroketler) yuvarlak, çomak şekilli ve sarmal şekillere sahiptir.

Fizyolojik özelliklerine göre;

- Aerob Bakteriler
- Anaerob Bakteriler

Antijenik yapılarına göre;

- Belli bir antijene özel antikorların kullanıldığı serolojik yöntemler ile sınıflandırılırlar.

Sayısal sınıflandırma;

- Birçok özelliği incelenen bakterilere ait veriler bilgisayar programları ile gruplandırılır ve karakterlerine ait uyuşma ve ayrılma durumlarına karşılık +1 ve -1 değerleri alırlar. Bu puanların toplamıyla %0 ile %100 arasında sıralanır.

Genetik Sınıflandırma;

- Her türe ait G+S (guanin ve sitozin) oranı tüm DNA oranına göre sabittir. Bu oran farklı türler için farklı bir değere sahiptir. Orana göre yapılan bu sınıflandırma genetik sınıflandırmadır.

Günlük hayatımızda kullandığımız pek çok ürün birçok insan bilmedikçe mikroorganizmalar yardımıyla elde edilir. Sirke, boza, yoğurt, alkollü içecekler, mayalı ekmekler gibi. Mikroorganizmalar, biyoatıkların sudan arıtılmasında, alkol, aseton ve

bütanol gibi kimyasalların üretiminde endüstriyel amaçlı da kullanılırlar. Diğer yandan mikroorganizmalar canlı varlıkları hastalandırırlar. Bitki, hayvan ve insan topluluklarının düzenini bozalar. En büyük örneklerinden biri de daha yeni atlattığımız COVID-19 virüsü salgınıdır. Salgın başladığından bu güne yaklaşık 650 milyon vaka görülmüş ve bunların 7.5 milyonu ise hayatını kaybetmiştir. Can kaybının yanı sıra dünyamız da derin ekonomik değişimlere de sebep olmuştur (110).

İnsan sağlığında hastalığa sebebiyet veren bu mikro organizmalar patojen olarak adlandırılır. Hastalıkların durdurulmasında büyük görev alan mikroorganizmaların üremesini durduran maddelere antimikrobiyal – antibiyotik adı verilir.

Gözle görünmeyen mikroorganizmalar da bile tüm canlılarda var olan hayatta kalma güdüsü bulunur. Bu sebeple kendilerine zarar veren maddelere karşı direnç oluştururlar. Dirençli mikroorganizmalar olan bakteriler tıp biliminde insan sağlığı için kritik önem taşımaktadır. Vücutta oluşacak enfeksiyon giderilemezse en nihayetinde hastanın ölümü kaçınılmaz olur. Bu sebeple yeni antibiyotikler ve yeni antimikrobiyal özellik gösteren türlerin arayışı süreklilik gösterir.

Son yıllarda yoğun bir şekilde antibiyotik kullanımı bakteriler üzerinde seçici bir baskıya ve sonunda çoklu ilaca dirençli suşların gelişmesine yol açmıştır (111).

Antimikrobiyal testleri aşağıdaki gibi sıralanır.

1. Dilüsyon yöntemi
 - Buyyon dilüsyon
 - Makrodilüsyon
 - Mikrodilüsyon
 - Agar dilüsyon
2. Difüzyon yöntemi
3. E Test
4. Otomatize Yöntemler
5. Moleküler Yöntemler

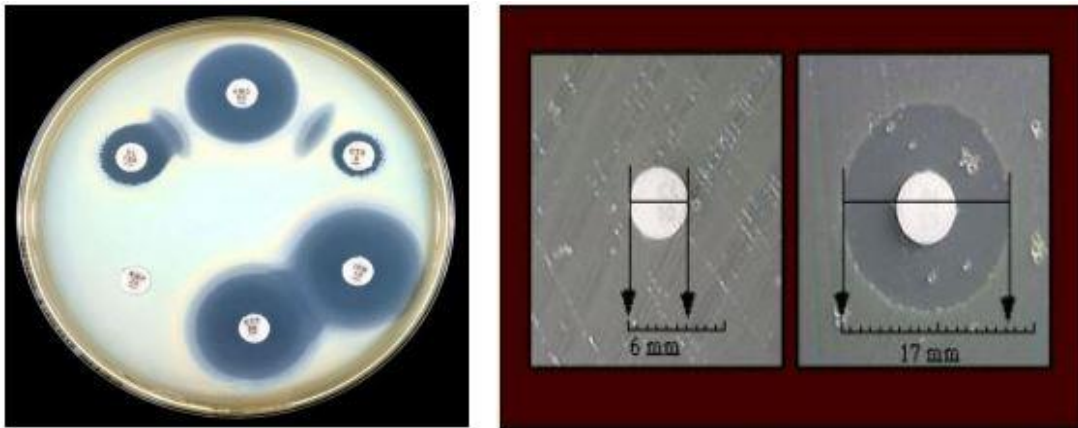
2.9.5.1. Dilüsyon Yöntemi

Mikrobiyolojide, bir bakteri konsantrasyonunu belirli bir test yöntemi için gerekli bir konsantrasyona veya bir agar plakasına kaplandığında sayması daha kolay olan bir konsantrasyona düşürmek için seri dilüsyonlar (log dilüsyonlar) kullanılır.

Bir log seyreltme, on kat seyreltmedir, yani konsantrasyon on katı kadar azaltılır. On katını tamamlamak için seyreltme oranı 1:10 olmalıdır. 1, eklenen numune miktarını temsil eder. 10, nihai numunenin toplam boyutunu temsil eder. Örneğin, 9 ml seyrelticiye 1 ml'lik bir numune toplam 10 ml'ye eşit olacak şekilde eklenir. 1:10 seyreltme - konsantrasyon 1.000 CFU ise, bir günlük seyreltme, konsantrasyonu 100 CFU'ya düşürür (112).

2.9.5.2. Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemlerde test edilecek mikroorganizmaların besiyerine doğru difüzenmesi temel alınmaktadır. Basitçe kağıt disklerle emdirilen antimikrobiyal maddenin ve inoküle edilen mikroorganizmaların katı besiyerine yerleştirilmesiyle başlar. Daha sonra kağıt diskler çözülür ve ağara doğru difüzenir. Bu sırada inoküle edilen mikroorganizmalar da çoğalmaya başlar ancak bir süre sonra antimikrobiyal maddenin inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı disk çevresinde genişleme görülmez (113). Mikroorganizmalar antimikrobiyal maddelere ne kadar duyarlı ise kağıt disk etrafında görülen bölge o kadar geniş olacaktır (Resim 13). Değerlendirmeler disk etrafında görülen alanın çapının mm cinsinden ölçülmesiyle tanımlanır. Bu amaçla kullanılan standart maddelerle karşılaştırılarak aktiviteleri ve duyarlılıkları hakkında yorum yapılır.



Resim 13. Disk difüzyon test görseli (Solda) ve İnhibisyon çap ölçümü (Sağda)

2.9.6. *Origanum* Türlerinin Üzerinde Yapılan Antimikrobiyal Çalışmalar

O. minutiflorum bitkisinden elden edilen esansiyel yağın;

Escherichia coli ATCC 25922

Bacillus subtilis ATCC 6633

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Streptococcus faecalis ATCC 19433

bakterilerine karşı yüksek antibakteriyal aktivitesi gözlenmiştir (114).

O. minutiflorum bitkisinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için broth mikrodilüsyon ve agar well-difüzyon metodlarıyla in vitro olarak çalışılmıştır. Siprofloksasin direnci bulunan 21 tür *Campylobacter* sp.'ye karşı ve hepsine karşı yüksek aktivite (MİK değeri 7.8-800 µg/ml) gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmayla *O. minutiflorum* uçucu yağının gıda kaynaklı hastalıklara karşı doğal koruyucu olabileceği savunulmuştur (115).

Bir başka çalışmada yiyeceklerden bulaşan bir patojen olan *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* ve *S. aureus* üzerine antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Oke ve Aslim tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise agar well difüzyon ve mikrodilüsyon broth metodu kullanılmış, *O. minutiflorum* n-hekzan ekstresinin antibakteriyal aktivite gösterdiği bulunmuş ve gıda endüstrisi için doğal bir kaynak alternatifi olacağı iddia edilmiştir (116,117).

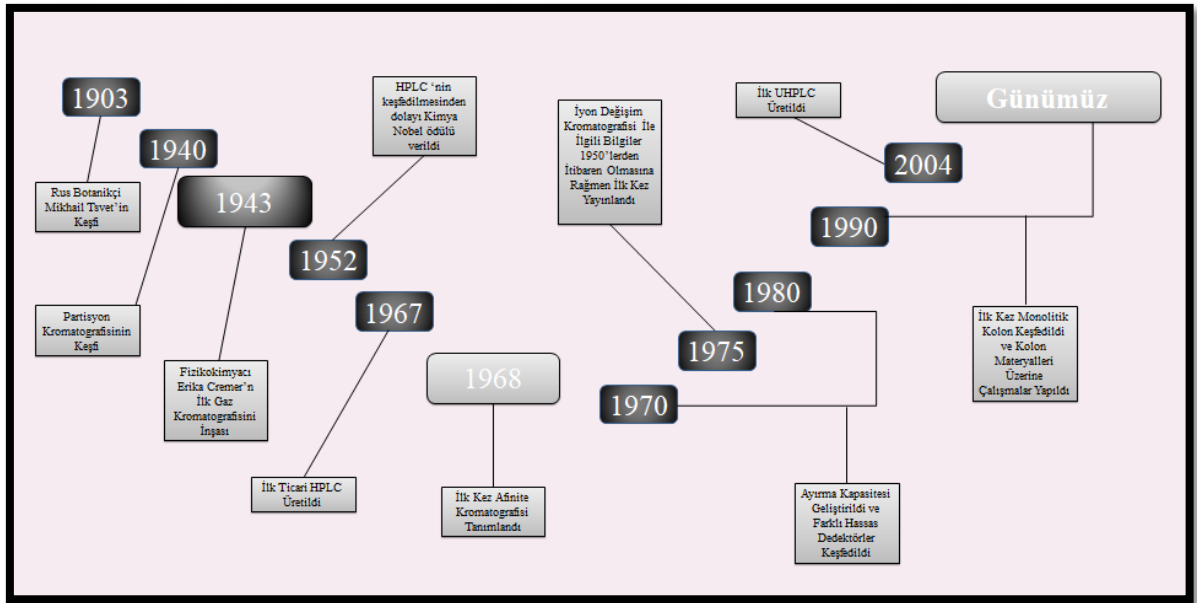
Penalver ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *O. vulgare*, *O. majorana* ve *Thymus vulgaris* esansiyel yağları, *O. vulgare* (test edilen tüm mikroorganizmalarda MİK $\leq$ %2), *O. majorana* (%0,25 ile $\geq$ %2 arasında MİK) için en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. Bununla birlikte, agar seyreltme yöntemiyle, *O. vulgare* esansiyel yağının MİK'i (%0,12 h/h), hem *E. coli* hem de *S. typhimurium*'a karşı çalışmada elde edilenden (%4,0 ve %1,0 h/h) belirgin şekilde daha düşük olduğu gözlemlendi (118).

Çeşitli oranlarda seyreltilerek antimikrobiyal aktivite için gerekli miktarın belirlenmesine yönelik yapılan başka bir çalışmada elde edilen yağların 1/50-1/100-1/200 ve 1/300 oranında seyreltilmesi ile aktiviteye ne oranda etki edildiği araştırılmıştır. 1/50 oranda tatbik edilen tüm örneklerin 15 tür organizma üzerinde aktiviteye sahip olduğu görülmüş fakat seyreltmeyle bu etkinin gittikçe azaldığı belirlenmiştir (119).

2.10. Kromatografik Yöntemler

Kelime kökeni yunan temellere dayanan ‘Kromatografi’ herkesin bildiği gibi 1903 yılında geliştirilmiştir. Kalsiyum karbonattan oluşturulan bir kolon içerisinde pigment ayrımı yapmaya çalışan Rus Botanist Mikhail Tswett bu yöntemi hayata geçirmiştir. Daha sonrasında birçok çeşiti de türemiştir. Geliştirildiği günden bugüne kadar ayırma ve saflaştırma amacıyla kullanılmıştır.

1903 yılından günümüze kadar çeşitli tekniklerin geliştirilmesi ile yüzyıldır bilim insanlarının ilgilisi kromatografik teknikler üzerinde toplanmıştır (120).



Resim 14. Kromatografinin tarihsel gelişimi

1903 yılında başlayan kromatografi keşfi (Resim 14), 1930-1940 yılları arasında daha da gelişti fakat teknolojiyi daha yaygın kullanacak bir seviyeye getirecek kadar gelişmedi. Archer Martin ve Richard Laurence Millington Synge partisyon kromatografisini keşfettikleri için Kimya alanında Nobel Ödülünü kazanmışlardır. Bu kadar büyük bir tanınma ile bilim insanları arasında popülaritesi artan kromatografi gaz kromatografisi (GK) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisinin(HPLC) daha hızlı benimsenmesine ve bu alanlarda önemli ilerleme sağlanmasına vesile olmuştur. Öncelikle

basit küçük molekül ve kimyasal maddeleri ayırmak için kullanılan bu yöntem en nihayetinde biyolojik sıvılar için de kullanılır bir hale gelmiştir.

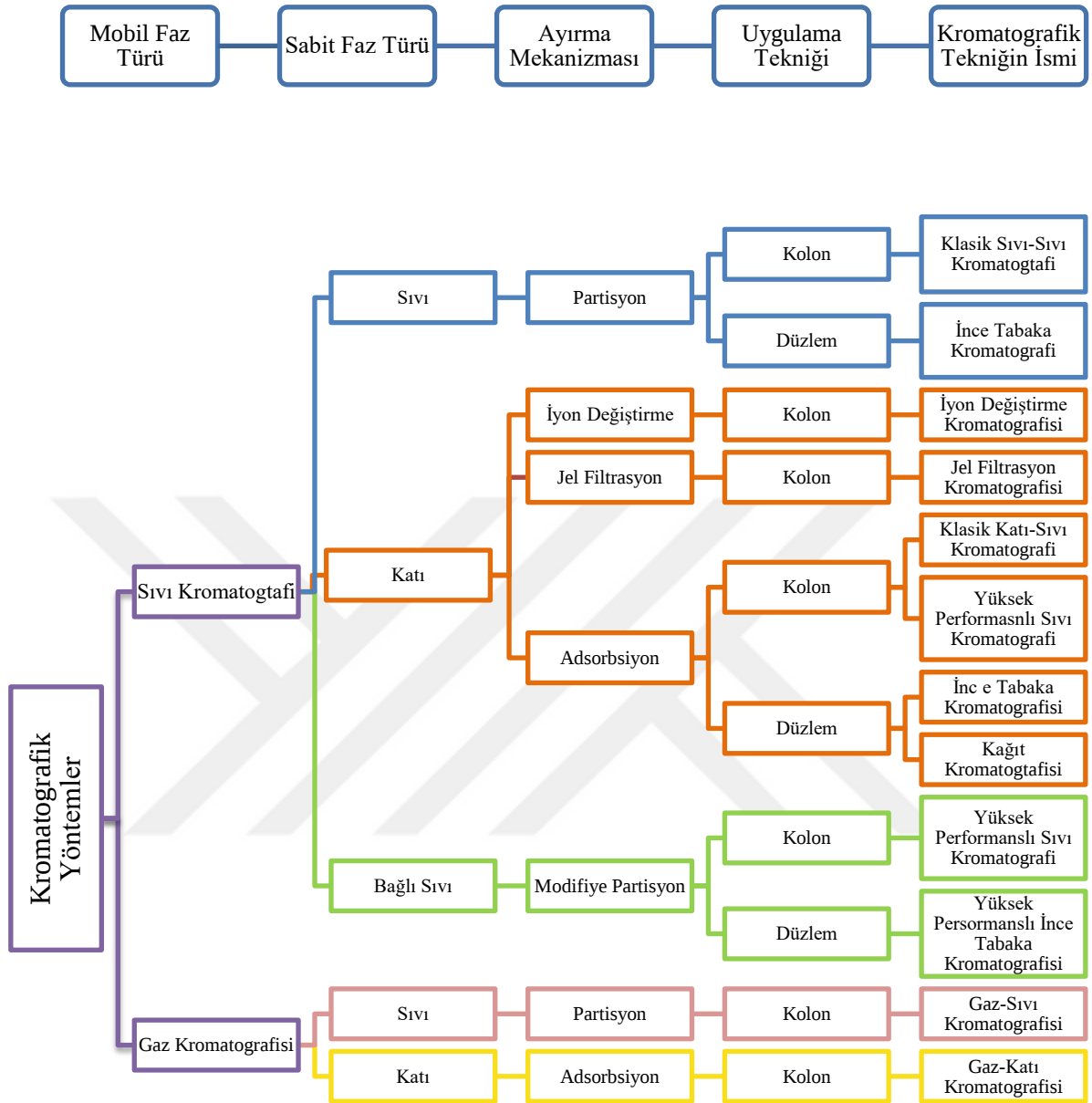
İlk ticari HPLC 1967 yılında üretilmiştir. Bunun ardından afinite kromatografisi, ters faz yöntemler gibi hidrofobik etkileşimlerin kullanıldığı teknolojiler gelişti. Yüksek performanslı sıvı kromatografi ile duyarlı, hızlı erişilebilir yenilikçi çalışmalar ve sürekli iyileştirmeler yapılmaya halen daha devam ediliyor.

Bir yüzyıl boyunca gelişen tekniklere günümüz şartları ve ihtiyaçları şekil vermektedir. Dünya çapındaki birçok laboratuvar ve biyoproses kullanan tesislerde kullanılan kromatografi teknikleri biyolojik terapilerin geliştirilmesinde öncü olmaktadır. Hücre ve gen terapileri gibi yeni modellerin saflaştırılmasında, yeni ilaç ve tedavilerin piyasaya sürülmesinde HPLC teknikleri yeni çağın alanı olarak görülmektedir (120-121).

2.10.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografik yöntemler temelde 3 ana başlık altında sınıflandırılmaya (Şekil 6) tabi tutulur.

1. Uygulama şekline göre
2. Hareketli ve sabit faz tipine göre
3. Ayrılma mekanizmasına göre



Şekil 6.Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

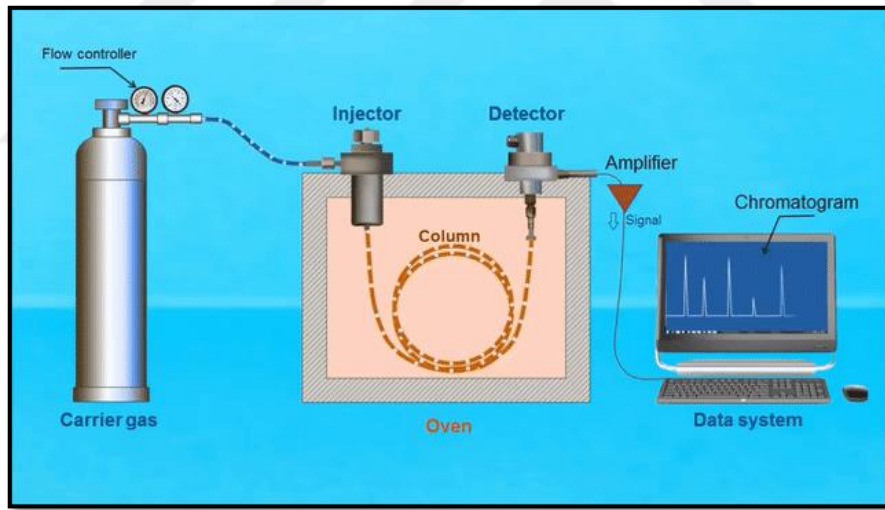
Kolon içindeki dolgu materyali ve kullanılan çözücü türüne göre Jel filtrasyonu (büyüklük), İyon çifti (yük) ve Affinite(ilgi) tipleri kullanılmaktadır.

2.10.2. Gaz Kromatografisi

İki tür sabit faz sistemi bulunur bunlar katı ve sıvıdır. Hareketli faz olarak gazlar kullanıldığı için genel olarak GK olarak adlandırılır. Ancak kullanılan sabit faz türü de göz önünden bulundurulduğunda Gaz-Katı ve Gaz-Sıvı kromatografi olarak da rastlamak

mümkündür. Gaz-Sıvı sistemler partisyon özelliğinden yararlanılarak ayrılırken Gaz- Katı sistemler adsorbsiyon özelliğinden faydalanarak ayırma işlemini gerçekleştirir. Gaz-Katı sistemler daha çok düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerin ayrılması için kullanılır.

GK ile ayırım, gaz halindeki bir numunenin GK şırıngası yardımıyla injeksiyon bölmesine enjekte edildiği, burada buharlaşma işlemine tabi tutulduğu ve daha sonra sabit faz üzerinden inert gazlar tarafından dedektöre kadar taşındığı bir işlemdir. Kullanılan gazlar Helyum, Argon gibi soygazlar, Nitrojen ve hidrojenidir. Bir kolon fırını yardımı ile kademeli olarak sıcaklık yükseltilmesiyle buhar fazına geçişi sağlanan moleküller kolon üzerinde sürüklenerek detektörlere kadar ulaşır. Hareketi sağlanan moleküllerin ayırımı genellikle düşük molekül ağırlıklı olandan yüksek molekül ağırlığına sahip olana doğru gerçekleşir. Bu sürecin tamamlanması sonucunda bilgisayarlar yardımıyla elde edilen kayıtlar pikler şeklinde elde edilirler. Zamana karşı pik yüksekliği elde edilen veri çıktılarına ise kromatogram adı verilir (Resim 15).



Resim 15.Gaz kromatografisinin şematik gösterimi (StudioGuy'dan (122))

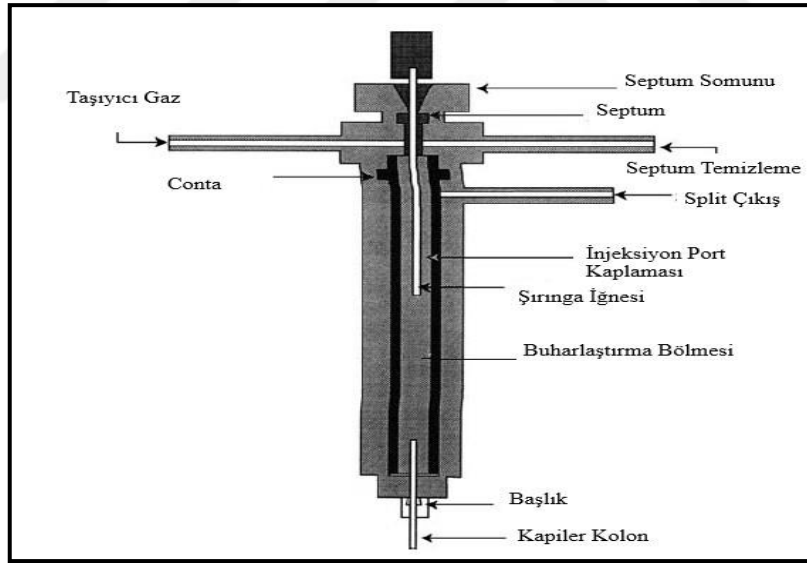
2.10.2.1. Taşıyıcı Gaz

Oksijensiz inert gazlardan oluşurlar ve ayrılmak istenen molekülleri injeksiyon bölgesinden dedektöre kadar taşıma görevini üstlenirler. Moleküllerle herhangi bir etkileşime girmemeleri en büyük özellikleridir. İstenilen performansa göre taşıyıcı gaz türleri değişkenlik gösterir. En iyi taşıyıcılardan biri olan Hidrojen gazı çok iyi ayırım

yapmasının yanı sıra bazı durumlarda moleküllerle reaksiyona girdiğinden dolayı tercih edilmemektedir. Sıklıkla Helyum ve Azot gazları taşıyıcı olarak kullanılır.

2.10.2.2.İnjektasyon Bölmesi

Yapılacak analiz türüne göre kullanılan pekçok türü mevcuttur. Split/ splitless, termal buharlaştırma, kolonda soğutma bunlardan birkaçıdır. Analizi gerçekleştirecek örneğin sistemle ilk buluşma noktası injeksiyon bölgesidir. Örnekler bir mikrosırınga kullanılarak sisteme verilir ve daha sonra uçucu hale getirilen örnek kolonda ayrılır. Örnekler sıvı olacağı gibi gaz olarakta sisteme verilebilir. İnjektasyon bölgesinin sıcaklığı maddeleri bozmayacak kadar yüksek olmalıdır. Yüksek sıcaklıklara çıkmaması gaz kromatografinin verimsiz kullanımına sebebiyet verir. 250°C ve üzerinde genelde büyük molekül yapıları bileşikler bozulur bu sebeple maksimum 250 °C'ye kadar bozulmadan uçucu hale geçen bileşiklerin analizi kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Split mod ile örneğin bir kısmı analize verilip kalan kısmı dışarı atılır. Splitless modda ise injeksiyon portuna yüklenen tüm örnek kolon içerisine verilir. Sıvı örnek analizlerinde çoğunlukla split mod kullanılırken, gaz örnekleri ile çalışırken splitless mod kullanılır (Resim 16).



Resim 16. Split/Splitless injeksiyon bölgesi (McHammer'dan, 123)

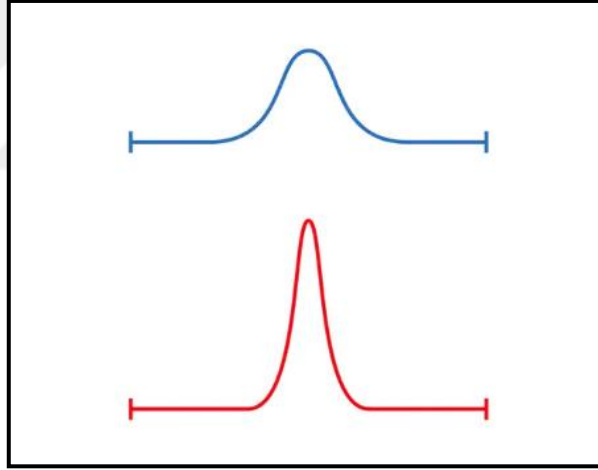
Günde birden fazla numuneyi analiz etmek için, gece gündüz çalışmak veya numune injeksiyonunu otomatikleştirmek gerekir.

2.10.2.3. Ayırma Portu (Kolon)

Kılcal ve dolgulu olmak üzere iki çeşit kolon sıklıkla kullanılır. İnjektasyon bölmesine yüklenen karışım burada birbirinden ayrılır. İki ucu açık şekilde bulunan dolgulu ve kılcal kolonları mevcuttur. Dolgulu kolonlar adsorban bir malzeme veya katı bir fazla kaplanmış paslanmaz tüplerden veya cam malzemeden oluşurlar. İç çapları 2-4 mm arasında değişen uzunlukları ise 0.5-5 m arasında değişir, ancak en sık 2m'lik olanlar ile çalışılır.

Kılcal kolonlar ise sıvı faz veya adsorban bir malzeme ile kimyasal olarak bağlanmış ince bir tabakaya sahip erimiş silika cam tüplerden oluşur. Dolgulu kolonlara göre daha az çeşide sahip ancak çok daha yüksek ayırma gücüne sahiptirler.

Kılcal kolonlar daha uzun daha sivri pikler üretirken dolgulu kolonlarda geniş pikler görülür. Ayrıca kılcal kolonların çok düşük konsantrasyonların saptanmasını sağlayacak hassasiyete sahip olduğu da bilinir. Kılcal kolonların en büyük avantajı budur.



Resim 17. Dolgulu kolon (mavi) piki ve kılcal (kırmızı) kolon piki (Shimadzu'dan, 124).

Kolon seçimi yapılırken çalışılacak madde türü önemlidir. Polar olmayan bileşiklerin analizi için polar olmayan kolon, polar bileşiklerin analizi için ise güçlü polar kolonlar kullanılır. Yüksek çözünürlüklü ayırma için iç çapı ince ancak uzun kolonlar tercih edilmelidir. Daha kısa analiz süreleri ile etkin ayırma istenmesi durumunda ise iç çapı kalın ve kısa kolonlarla kaplama kalınlığı ince kolonlar tercih edilmelidir. Düşük kaynama noktalı bileşiklerin tayini için uzun ve kaplaması kalın kolonlar tercih edilirken, yüksek kaynama noktasına sahip moleküller ayırmak istenirse uzun ve iç kaplaması ince kolonlar tercih edilmelidir (124).

WCOT, SCOT ve FSOT türlerinde kolonlar mevcuttur. Bunlar;

- Wall Coated Open Tubular Duvar Kaplamalı Açık Boru
- Support Coated Open Tubular Destek Kaplamalı Açık Boru
- Fused Silica Open Tubular Kaynaşmış Silika Açık Boru

Yekpare ve mikro duvar kaplamalı açık boru kolonlar 2000’li yılların başlarında GK teknolojisinin en uç noktası olarak görülmekteydi. Bunlar dolgulu olmayıp açık boru ve kılcal kolonlarda in situ hazırlanır. Birbirine bağlı gözeneklere sahip polimerik maddeler veya silika köpükle tamamen doldurulur. Gözenekli köpük yapısı sayesinde viskoz sıvılarla kaplanabilir veya sıvı fazlar ile kalıcı reaksiyonları sağlanabilir. 1990’larda çapraz bağlı bir monomerin gözenekli bir sıvı varlığında polimerleştirilmesiyle organik polimer monolitleri hazırlanmış daha sonra 2002 yıllarında silika monolit kolonlar yerini almıştır.

Destek kaplamalı açık boru kılcal kolonlarında, kılcalın iç duvarı diatomlu toprak gibi ince bir parçacıklı destek tabakasıyla kaplanır, daha sonra bu destek malzemesinin üzerine ince bir sıvı sabit faz tabakası kaplanır. Bu durum destek kaplamalı açık boru kolonlarına, duvar kaplamalı açık boru kolonlarından daha geniş yüzey alanı ve daha kalın sabit faz tabakası sağladığı için ek bir avantaj oluşturmaktadır.

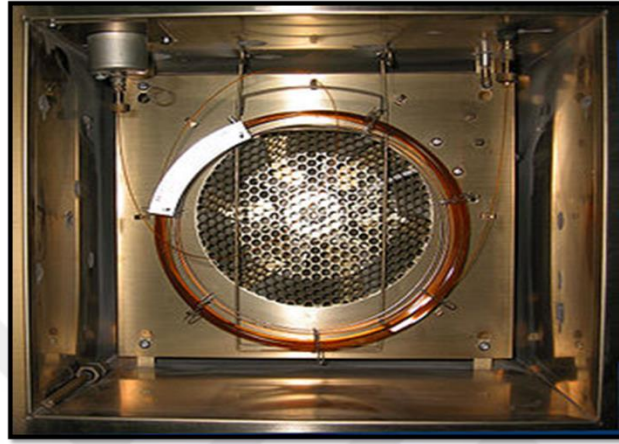
Kaynaşmış silika açık borular cam kapiler kolonlara göre daha ince iç kaplamaya sahiptirler. Poliamid kaplamaya sahip olmaları nedeniyle güçlü bir mukavemete sahiptir. Esnekler, böylelikler bobin şeklinde sarılmaları mümkündür. Fiziksel sağlamlık, esneklik ve düşük reaktiviteye sahip olmaları en cazip kılıcı özelliklerindendir.

2.10.2.4. Kolon Fırını

Gaz kromatografisinde ayırmanın gerçekleştiği kolonlar bir kolon fırını içerisinde bulunur (Resim 18). Kademeli olarak sıcaklık artırılarak ve taşıyıcı gazın kolon içerisinde akması suretiyle bileşenler birbirinden ayrılarak detektörlere ulaşır.

Fırın sıcaklık kontrolörleri genellikle en az beş programlanabilir doğrusal rampa segmentine sahiptir. Bir sıcaklık profili programı oluştururken, farklı eğim oranlarına sahip doğrusal rampalar, kromatografi çalışmasının farklı noktalarında ayırma elde etmek için birbirine bağlanır. Taşıyıcı gaz akış hızı ve yardımcı valf anahtarlama, sıcaklık rampaları boyunca zaman noktalarında ayarlanabilir ve değiştirilebilir

Fırın programı genellikle bir injeksiyon sinyali ile başlatılır, ancak ön panelden veya kütle spektrometresinin bilgisayar kontrol panelinden de başlatılabilir. İdeal olan, sistemi bir çalıştırma sinyalinin tüm çalıştırma bileşenlerini başlatacağı şekilde düzenlemektir.



Resim 18. GC-MS analizlerinde kullanılan kapiler kolon ve kolon fırını

Dahili olarak, GK üç bölmeden yapılmıştır. Elektronik mahfaza, dış yüzünde ekran ve klavye bulunan mikroişlemci kartları için alan sağlar. Isıtılmamış bir alan enjektör bağlantı noktası başlığını, enjektör tetiğini, boşaltma gazı hatlarını, valfleri ve kabloları tutar. Fırının büyük, yalıtımlı küpü, ön yüzünü oluşturan bir kapı ile enjektör gövdesini ve kolonu tutar ve kolonun ucuna bağlı kütle spektrometre arayüzü için bir çıkış portu sağlar.

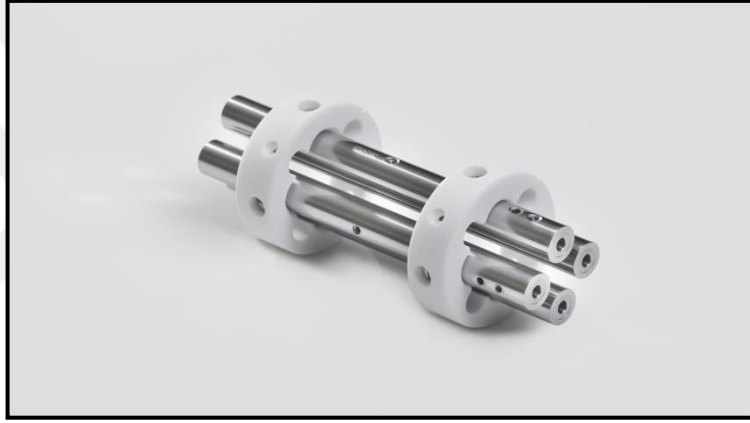
2.10.2.5. Dedektörler

Kütle Spektrometresi: GK analizlerinde en sık kullanılan detektörlerden biridir. Çok geniş bir yelpazeye sahip kütüphane desteği ile analizlerin pahalı standartlar alınmadan tamamlanmasını sağlaması en büyük artılarından. Kütle spektrometresinin temel bileşenleri pompalama, kromatografi arayüzü, iyonizasyon odası ve elektron kaynağı, odaklama merceği, dört kutuplu analizör, kendi içindeki dedektörü ve veri kontrol sistemlerinden oluşur. Yüksek vakum altında çalışması kütle spektrometreler için en önemli parametreyi oluşturur. Elektron bombardımanına tutulmuş moleküller varlıklarını sürdürebilmeleri için hava molekülleri ile çarpışmadan dedektöre varabilmeli ve bu nedenle yüksek vakum altında çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

Kombine olarak kullanılan bu sistemde arayüz sistemin performansı için çok önemlidir. Numuneyi kolondan kütle spektrometresi kaynağına aktarır ve bu aktarma sırasında numuneyi taşıyıcı gazdan arındırarak dedektöre iletir.

Sisteme verilen numune kolondan ayrıldıktan sonra iyonize edilir ve bu iyonizasyon sırasında oluşan tüm fragmentler analizöre iletilir ve sayılar dedektörde sayılır. Bir plakaya doğru çekilen iyonlar dört kutuplu analiz cihazına girerken yoğun bir akış halinde sıkıştırılır.

Dört kutuplu kütle analizörü (quadrupole) kütle spektrometresinin olmazsa olmazıdır. 4 adet silindirik kuvars çubuktan oluşur (Resim 19).



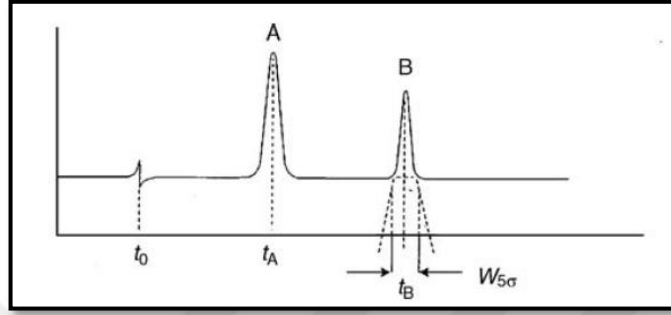
Resim 19. Kuadrupole kütle filtresi (Reliance Presicion'dan, 125)

Kütle spektrometrelerinin parmak izi gibi her bileşiğe özgü verdikleri spektrumlardan yararlanılarak oluşturulan kütüphaneler sayesinde, kesin olarak kalitatif tayin yapılabilmesi pahalı bir sistem olmasına rağmen yoğun talep oluşmasına sebep olmaktadır. Ancak analizlerde kalitatif tayin yapıldığı gibi aynı zamanda kantitatif sonuç almak araştırmacılar için çok önemlidir. Bu amaçla GC-MS sistemlerinde araştırmacının amacına bağlı başka dedektörler de bağlanarak kantitatif analizler de gerçekleştirilir. En sık kullanılan detektörlerden biri de Alev iyonlaştırmalı (FID, flame ionization detector) detektörlerdir.

Alev İyonlaştırmalı Dedektör: Alev iyonlaştırmalı dedektörlerin tarihi 1958 yılında Harley ve ark. (126), McWilliam ve ark (127)'a dayanmaktadır. O günden günümüze kadar alev iyonlaştırmalı dedektör, GK'de en yaygın kullanıma sahip detektörlerden biri olmuştur.

2.10.2.6. Rezolüsyon ve Bileşenlerin Ayrılması

Optimum kromatografik ayırma, makul bir çalışma süresi içinde tüm bitişik pikler arasında temel rezolüsyona sahip olduğunuzda elde edilir. Rezolüsyon ve kolon parametreleri Resim 20’de gösterilmiştir.



Resim 20. Rezolüsyon ve kolon parametreleri

Bu tür bir ayırmayı başarmak için, bir ayırmayı etkilemek için kullanılabilecek değişkenleri anlamak gerekir. Bunun için iki parametre ölçülür, alıkonma süresi t_r ve her bir zirvenin tepe genişliği w . Ayrıca sütunun boşluk hacmi süresini, $t_{r,0}$, tutulmayan bir çözücünün alıkonma süresinin de ölçülmesi veya bilinmesi gerekir. Bu verilerden hareketle, bir tutma faktörü k (kapasite faktörü olarak da adlandırılır), bir ayırma faktörü α ve bir verimlilik faktörü n hesaplanır. Son olarak, bu değerleri kullanarak, tüm bu faktörleri birleştiren bir çözünürlük denklemi üretilir. Bu verilerin gerçek değeri teorisyen için önemlidir, ancak asıl önemli olan bu verileri esas olarak yöntem geliştirme sırasında bir ayırmada yapılabilecek değişiklikleri tahmin etmek için veya zaman içinde kolon deformasyonuna bağlı olarak ayırma değişikliklerini takip etmede teşhis yardımcıları olarak kullanılırsa yararlı olur (128).

$$\text{Alıkonma Faktörü: } K_A = \frac{(t_A) - (t_0)}{t_0} \quad (\text{Eşitlik 47})$$

$$\text{Ayrırma Faktörü: } \alpha = \frac{(t_B) - (t_0)}{(t_A) - (t_0)} = \frac{(K_B)}{(K_A)} \quad (\text{Eşitlik 48})$$

$$\text{Verimlilik Faktörü: } n = 5.4 \left(\frac{(t_B)}{(w_{\frac{1}{2}} h)} \right)^2 \text{ yada } 16 \left(\frac{(t_B)}{(W_{5\sigma})} \right)^2 \quad (\text{Eşitlik 49})$$

Çalışma süresinin çok uzun olduğu zamanlarda uygun bir ayırma elde edilemeyebilir. Burada, tüm tepe noktalarının kullanılabilir bir ayırma temel çözünürlüğe sahip olması gerekmediğine dikkat etmek gerekir. Belirli bir analiz için bir ayırmanın ne kadar mükemmel olması gerektiğine birinin karar vermesi gerekir. Tekrar üretilebilirlik, gerçek dünyada ayırma mükemmelliğinden genellikle daha önemlidir.

Verimlilik faktörü n , tepe noktalarının ne kadar keskin olduğunu ve bitişik tepe noktaları arasında ne kadar örtüşme olduğunu gösterir. Pikler ne kadar keskin olursa, birbirine o kadar yakın çalıştırılabilirler ve o kadar hızlı ayrılırlar. Ayrıca, toplam çalışma süresi de o kadar kısa olur.

Verimliliği ölçmek için, belirli bir alıkonma süresinde tepe genişliği ölçülmelidir. Pik sütunda ne kadar uzunsa, pik genişliği difüzyon kaynaklı bantlı yayılma nedeniyle o kadar daha geniş olacaktır. GK tepe noktaları çok simetrik, bu yüzden GK’de ölçülen en yaygın genişlik, yarı tepe yüksekliğindeki genişliktir. Eğer pikler simetrik HPLC’de olduğu gibi arka tarafta kuyruklanmış ise, beş sigma genişliği adı verilen tepe genişliğini yaklaşık olarak tepe yüksekliğinin $1/10$ ’unda ölçen ikinci verimlilik hesaplamasının kullanılması önerilir (123). Bu yöntem kolon değişikliklerine ve kirlenmeye karşı yarı tepe ölçümünden daha hassas cevap verir. Tepe eğiminin her bir tarafı taban çizgisiyle buluşana kadar uzatılarak ölçülür, ardından oluşan taban çizgisi segmenti ölçülür. İki verimlilik hesaplama yöntemi, simetrik tepe noktaları için aynıdır.

Verimlilik teorik plaka/metre cinsinden gösterilir Tabaka sayısı ne kadar büyük olursa, verimlilik o kadar yüksek olur ve ayırma tepe noktaları o kadar keskin olmalıdır. Tabaka sayısını bulmak için Eşitlik 50 kullanılır, kolon uzunluğu verimliliğe bölünür.

$$\text{Teorik Tabaka Sayısı: } h = \frac{L}{n} \quad (\text{Eşitlik 50})$$

Farklı dolgu parçacık çaplarından yapılmış kolonlar için en uygun akış hızını seçmek için akış hızına karşı h grafikleri kullanılır (123).

Son olarak, verimlilik, tutma ve ayırma faktörleri, rezolüsyon denklemi R_s ’de birleştirilir (Eşitlik 51). Bu, denklemin alıkonma faktörü teriminin yakınsak bir terim olduğunu gösterir. Burda denklem sonucunun bir sayısal değer olduğu ve her zaman sayısal olacağı anlaşılmaktadır.

$$\text{Rezolüsyon Eşitliği: } R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) (\sqrt{n}) \left(\frac{k+1}{k} \right) \quad (\text{Eşitlik 51})$$

Alıkonma faktörü terimini çözünürlük üzerinde büyük bir ilk etkiye sahiptir, ancak faktör büyüdükçe bu etki düşer. Verimlilik faktörü terimi bir karekök fonksiyonudur. Verimli değişiklikler, rezolüsyonda doğrusal bir yanıt üretmez. Rezolüsyon denkleminin ayırma faktörü terimindeki değişiklikler, çözünürlük üzerinde neredeyse doğrusal bir etkiye sahiptir. Öyleyse, denklemin tutma faktörü terimi olan alıkonma, ayırma ve verimliliği etkileyen değişkenler tam olarak nedir sorusu sorulabilir.

Kolon ve taşıyıcı gaz seçildikten sonra kontrol değişkeni olarak yalnızca birkaç değişken kullanılabilir. Çalıştırmaya başlamadan önce aşağıdaki ilk beş değişken seçilmelidir.

1. Sabit faz kimyası
2. Sabit faz kalınlığı
3. Sütun iç çapı
4. Sütun uzunluğu
5. Taşıyıcı gaz kimyası
6. Taşıyıcı gaz basıncı
7. Sıcaklık

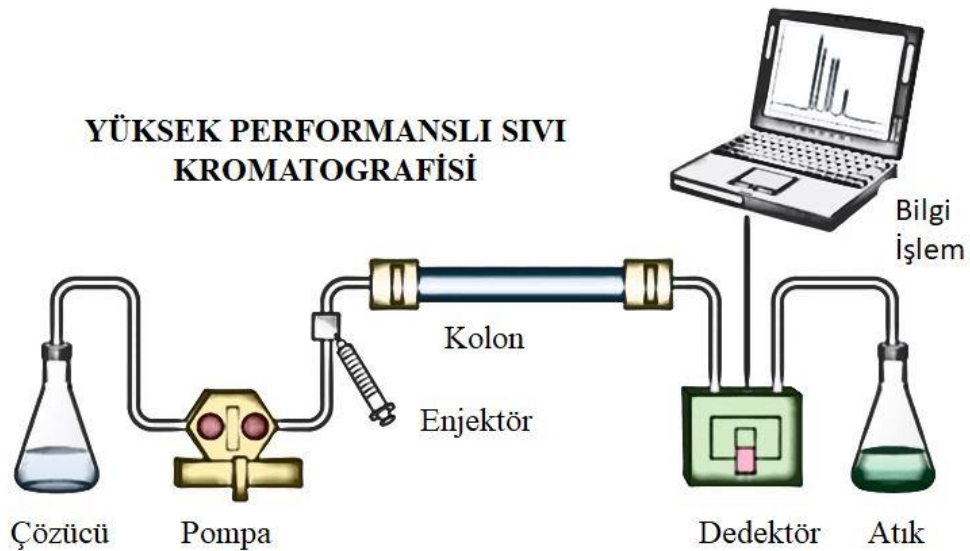
2.10.2.7. Gaz Kromatografisinde Türevlendiriciler

Başarılı bir gaz kromatografisi analizinin gerçekleştirilebilmesi için bileşiğin uçucu olması en arzu edilen özelliğidir. Sadece uçucu olan bileşikler için analiz yapılması bu yöntemin kapsamını dar tutacaktır. Uçucu olmayan bileşiklerin uçucu hale getirilebilmesi ile analizleri gerçekleştirilir. Bunun için türevlendirici adı verilen bileşikler kullanılarak analizi gerçekleştirilecek maddeler türevlendirilir ve uçucu olmayan yapıları kolaylıkla uçucu hale getirilebilir. Molekül ağırlığı arttıkça uçucu özelliğinin azalması beklenir ancak türevlendirme ile molekül ağırlığı artar ve uçucu özellikler de eklenir. Bu işlemin mekanizması şu şekilde açıklanır: Fonksiyonel gruplar içeren bistrimetil-sililasetamid (BSA) ya da bis-trimetilsililtrifloroasetamid (BSTFA) molekülleri trimetilsilil veya triflorometilsilil gruplarını aminler, alkoller veya karboksilik asit gruplarındaki aktif hidrojen bölgelerine yerleştirir. Alkil ester türevleri, karboksilik asit gruplarından

oluşturulur bu esterler oksimler, ketonlardan ve aldehitlerden yapılır. Herhangi bir türevlendirme işlemine maruz bırakılmadığında, tüm bu grupların ortak bir noktası vardır. Ortak noktaları, hidrojen bağları oluşturmaları ve bulundukları ortamda kümece birikmeleridir. Doğal olarak birbirine hidrojen bağı etkileşimi ile bağlı olan bu bileşiklerin uçuculuğu azalır. Hidrojen bağı önleyen veya hidrojen bağı fonksiyonel grubunu ortadan kaldıran türevler, bir bileşiğin uçuculuğunu artırır.

2.10.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Gaz kromatografisinin çok yaygın olarak kullanıldığı bilinmekle birlikte, kullanım alanının termal kararlılığı sağlayan gazlaşabilen maddelerle sınırlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte uçucu olmayan karbonhidratlar belli türevlendiriciler ile analiz edilebilir. Sıvı kromatografinin gelişiminden itibaren, en yaygın kullanılan tekniği olan HPLC ile çok geniş yelpazede ayırmalar ve araştırmaların yapılması mümkündür. Uygun çözücüde çözülmüş katı karışımları, ayarlanan çözücü sistemleri ve hassas dedektörler sayesinde kolaylıkla ayrılır. Ayırma, partiyon, adsorbsiyon, boyut eleme ve iyon dışlama gibi yöntemler yardımıyla yapılır. Yöntemler farklılık gösterse de temelde aynı hat üzerinde kurulmuş bir sistemle ayırma sağlanır. Gaz kromatografisinden farklı olarak, kolon uzunluğu başta olmak üzere hareketli faz türü en büyük sistemsel farklılığı oluşturur.



Resim 21. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi şematik gösterimi

HPLC sistemleri (Resim 21) hemen hemen her alanda uygulanabilirliği ile evrensel bir üne sahiptir. Dünya üzerinde birçok şehirde eğitim kurumlarında, üretim tesislerinde ve araştırma merkezlerinde sıkça kullanılan kolaylıkla ulaşılabilir bir cihazdır. Yüksek yöntem kesinliğiyle en geniş ölçüde kullanılan yöntemler arasında öncüdür.

2.10.3.1. Hareketli Faz, Hareketli Faz Gaz Giderim Sistemi ve Çözücü Filtrasyonu

HPLC’da kullanılan hareketli fazlar cam şişelerde saklanmaktadır. İzokratik sistemle yürütülen yöntemlerde tek cam hazne kullanılır. Bilindiği gibi gradiyent sistemlerde 1’den çok hareketli faz kullanılmaktadır. Bu sebeple kullanılan çözücü türü de değişmektedir. Kullanılan cam şişelerin temizliği çalışmaların hassasiyeti için büyük önem taşımaktadır. Çalışmalara herhangi bir girişim olmaması için içerisinde parçacık olmamasına özen gösterilmeli dolayısı ile çözücü şişelerinin temizlenmesi ve kuru bir şekilde saklanması gereklidir. Kullanılacak kromatografi türüne göre cam harici malzemelerde hareketli faz şişesi olarak kullanılmaktadır (129).

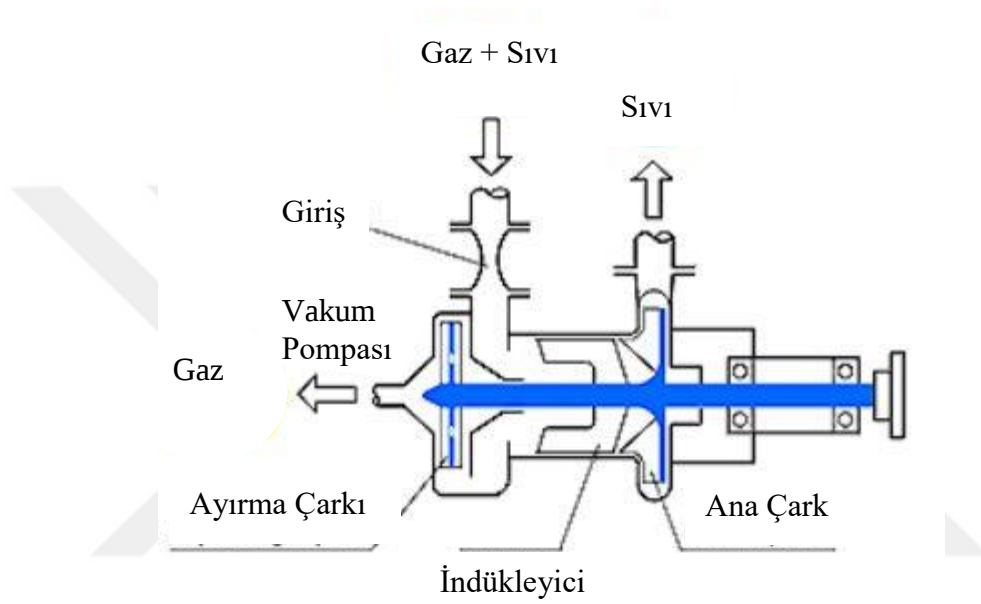
Analizler sırasında hareketli fazın kirlenmemesi için bulundukları şişelerin kapalı olması gereklidir ancak, kolon içerisinde akışından kaynaklı vakum oluşmaması için şişelerin ağzının çok sıkı kapatılmaması gereklidir. Şişenin içindeki çözücünün tekrar filtrelenmesi için hareketli faz kablosunun dibinde seramik, polimer veya paslanmaz çelikten oluşan filtreler bulunur. Bu filtreler aynı zamanda kabloyu şişenin dibinde tutmak için ağırlık görevi de görür.

Hareketli faza karışan parçacıklar HPLC sistemine girerse tıkanıklığa yol açar. Bu tıkanıklık sadece kolon içerisinde olmamakla beraber sistemin birçok önemli parçasını bozabilir. HPLC saflıktaki çözücüler şişelenmeden önce 1µm’den düşük por çapına sahip filtrelerden çözülür. HPLC sistemlerinde kullanılan çözücülerin kromatografik saflıkta olması analizlerin en sorunsuz yapılmasını sağlar ancak her zaman bu saflıktaki maddelere erişilemediği durumlarda çözücüler filtrelerden geçirilmelidir.

Kullanılacak hareketli faza göre filtre seçimi yapılmalıdır. Hidrofobik karakterde maddeleri içeren filtreler sulu çözeltilerin filtrasyonunda kullanılmaz. PTFE filtreler metanol ve asetonitril gibi saf organik çözücülerini filtrelemek için uygundur. Sulu çözeltileri filtrelemek için selüloz asetat tercih edilmektedir.

Çözücü tankı içinde bulunan ve ağırlık yapan filtrelerin bir amacı çözücüyü filtrelemek diğeri ise bağlantı kablosunu tankın dibine yakın tutmaktır. Bu şekilde bağlantı

kablosu mutlak surette hareketli faz içinde durur ve sisteme herhangi bir hava kaçmasını da engeller. Her ne kadar bu şekilde hava kabarcıkları engellenmeye çalışılsa da bazı durumlarda yetersiz olur. Bu amaçla HPLC cihazlarına injeksiyon yapılmadan önce hava kabarcıklarını azaltacak ve pompa hatalarını engelleyecek ayrıca dedekör hataları sebebiyle olmayan piklerin görülmemesini sağlayacak sistemler (Resim 22) bütünleşmiştir (130,131).



Resim 22. Degazör gaz giderme ilkesi şematik gösterimi (AquaDevice'den, 132)

Pompalanan hareketli faz, giriş kısmından pompanın giriş kısmına akarken, hareketli fazdaki çözünmüş gaz dekompresyon ile sıvıdan ayrılır ve üretilen gaz-sıvı karışımı indükleyiciye sürüklenir. Gaz-sıvı karışımındaki sıvı, çevreye doğru itilir ve indükleyicinin dönmesiyle tabakalaşır ve birikir. Sıvıda kalan gaz, sıvıdan ayrıca ayrılır, çünkü bu sıvı tabakası geniş ölçüde yüksek vakuma maruz kalır. Gaz daha sonra pervane aracılığıyla vakum pompası tarafından çekilir. Vakum pompası tarafından çekilen gazda kalan sıvı, çark tarafından ayrılır ve indükleyicinin giriş tarafına geri döndürülür.

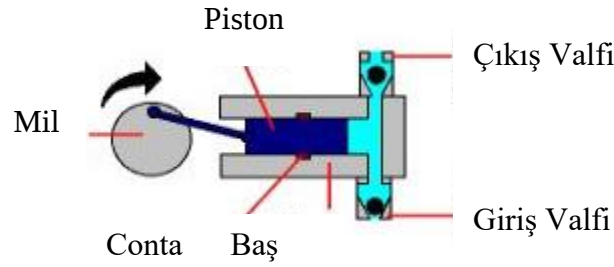
2.10.3.2. Pompalama Sistemleri

Piyasada kullanılan hemen hemen tüm HPLC sistemlerindeki pompalama sistemleri piston pompalardan oluşur. Piston pompalar yüzlerce saat kullanılabilirliği ve

bakım gerektirmemeleri nedeniyle en sağlam parçalar olarak HPLC sistemlerindeki yerini almıştır.

Analitik ayırmalarda kullanılan HPLC pompaları, 400 bar basınca kadar çalışabilecek şekilde üretilmiştir, ancak analizciler çoğunlukla 150-200 bar aralığında çalışmaktadır (129).

Rutin tayinler için kullanılan HPLC cihazlarında genellikle tek pistonlu pompalar kullanılır (Resim 23). Yapısında bulunan motorun dönüşü pistonu ileri ve geri yönde ittirir. Giriş ve çıkış kontrol valfleri ile hareketli fazın akış yönü belirlenir. Pompaya hareketli faz çekilirken çıkış valfleri kapatılır ve giriş valfinden çözücü alınır, çekilen hareketli faz kolona verileceği zaman ise giriş valfleri kapatılır ve çıkış valfi açılır Bu şekilde kolona sürekli çözücü pompalanır (131,133).



Resim 23. Tek pistonlu hplc pompası (LC Source'dan, 134)

2.10.3.3. Gradyent Sistemler İçin Çözücülerin Karıştırılması

İzokratik sistemlerde sistemsel çözücü karıştırılması yapılmadan, daha analize başlanmadan çözücü karıştırılması yapılabilir. Gradyent analizler için ise karışım HPLC cihazı tarafından ayarlanır. Bu işlem 3 teknikle gerçekleştirilir. Yüksek basınç, düşük basınç ve hibrit sistemler kullanılarak karıştırma sağlanır. Yüksek basınçlı karışımlar her çözücünün kendine ait pompası yardımıyla çekilerek karıştırılmasına dayanır. Yani, 1 mL/dk akış hızında ACN: Tampon çözelti karışımı (70:30, v/v) seçilmiş ise ACN pompası 0.7 mL/dk ve Tampon çözelti pompası 0.3 mL/dk akış hızında çekmektedir.

Yüksek basınçlı karıştırma sistemlerinin diğer sistemlere göre avantajı, minimum sistem hacmi gerektiren LC-MS gibi uygulamalarda karıştırıcının mikro-karıştırıcı ile değiştirilebilmesidir. Düşük basınçlı sistemlerde karıştırma pompaya gelmeden yapılır.

Haliyle birden çok pompaya ihtiyaç duyulmaz ve tek pompa ile işlem gerçekleştirilir. Oranlama valfi belli aralıklarda açılarak hareketli faz karışımı oluşturulur.

2.10.3.4. Otomatik Örnekleyiciler

Preparatif HPLC analizlerinde analizci saflaştırma yapacaksa manuel injeksiyon kullanıcıya mantıklı gelebilir. Ancak analitik ayırmalar gerçekleştirilirken bazı durumlarda 100-150 analizin bir günde tamamlanması gerekebilir. Bu durumda manuel injeksiyon analiz için büyük bir zaman külfetine dönüşür. Zamandan tasarrufun yanı sıra injeksiyonların aynı hassasiyette ve otomatize edilmiş olması çalışmanın doğruluğunu ve kesinliğini de büyük ölçüde etkileyecektir. Bu amaçla günümüzdeki çoğu HPLC otomatik örnekleyici içermektedir.

Birçok tasarımı bulunur ve 6 girişli, döner valf en sık kullanılan çeşittir. İğnesi x, y ve z eksenlerinde hareket ederek belirlenen miktardaki örneği çeker ve kolona verir. Örnekler analitik ayırmalarda genellikle 1-1,8 mL hacimdeki küçük şişelere konur. Bu şişeler de üzerinde çok sayıda kuyucuk bulunduran plakalara yerleştirilir. Otomatik olarak kuyudan çekilen örnek doğrudan kolona verilir (131, 135).

2.10.3.5. Dedektörler

Kromatografi sistemlerinde kullanılan dedektörler analitin fiziksel ya da kimyasal özelliğine bağlı nicel veriyi işleyip pik şeklinde almayı sağlayan sistem aygıtıdır. HPLC analizlerinde çok sayıda dedektör kullanılmaktadır. HPLC analizlerinde kullanılacak dedektörlerin hareketli fazdan bağımsız olarak cevap vermesi beklenmektedir. Bunun haricinde yüksek duyarlılığa sahip, akış hızı ya da sıcaklıktan etkilenmeme, genel olarak tüm analitlere cevap verme, analiti parçalamama ya da yapısını bozmama, analit miktarına bağlı doğrusal artan cevap verme gibi özelliklerinin bulunması istenir.

Dedektör çeşitleri; günümüzde bir çok teknikte çalışan dedektör HPLC sistemleriyle entegre edilerek kullanılabilir. Bunlar refraktif indeks, floresans, elektrokimyasal, radyoaktivite, kütle, kemilüminesans, NMR, IR ve en sık kullanılan morötesi-görünür bölge dedektörüdür. Tez çalışmada mor ötesi- görünür bölge dedektörü kullanıldığından sadece bu dedektör hakkında bilgi verilecektir.

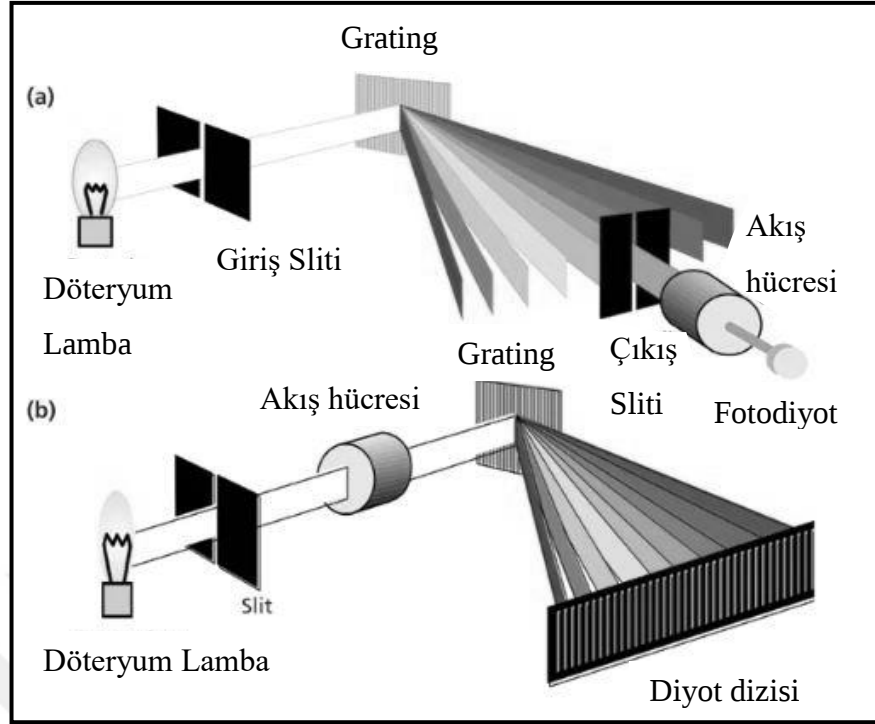
Morötesi- Görünür Bölge Dedektörü;

Temeli morötesi ve görünür bölge alanındaki ışığın absorpsiyonuna dayanan, günümüzde en sık kullanılan dedektörlerden biridir. Analizciler bu dalga boyu aralığında

absorbsiyon yapan bileşikler için yüksek duyarlılığa sahip saptama imkânına sahip olurlar. Ölçüm prensibi Lambert-Beer yasasına dayanır. Bu yasaya göre ışık akışının olduğu alanın uzunluğu ve analitin konsantrasyonu, ölçülecek olan maddenin ne şiddette absorbsiyon yapacağını belirlemektedir. Değişik büyüklükte gürültü büyüklüğüne sahip fotometreler içerebilen türleri ile düşük morötesi-görünür bölge aktivitesine sahip analitlerin analizi mümkün kılınır, ayrıca nanogram derecesinde saptamalar yapılması da mümkündür. Hücre iç çapı 1mm, uzunluğu 10 mm akış hücreleri Z şeklinde tasarlanmış modeller kullanılır. Bu tip hücreler küçük partikül boyuna (3 µm) sahip kolon maddeleri için oldukça uygundur. Daha büyük partiküllü kolonlarda bant genişlemesine neden olurlar. Akış hücrelerinin uzunluğu arttıkça elde edilen sinyal düzeyide artacaktır. Bu kriterler değerlendirilerek kolon tercihi yapılmalıdır.

Morötesi- Görünür Bölge dedektörleri 190nm-800nm dalgaboyu aralığında cevap verirler. Bir çok aromatik bitki, çifte bağ içeren bileşikler, fenolikler, halkasız düz zincirli hidrokarbonlar, 200-260 nm aralığında tespit edilebilir. Bu sebeple birçok alanda kullanılabilir. Hareketli faz seçimi çalışılacak dalga boyuna göre yapılmalıdır. Örneğin metanol 210-220 nm'den düşük seviyelerde kullanışlı değildir. Gradyent ayırmalarda morötesi-görünür bölge absorpsansları birbirine yakın çözücüler tercih edilmelidir. Birbirinden çok uzak absorpsans değerine sahip hareketli faz bileşenleri birlikte kullanılmamalıdır.

Diyot dizinli dedektörler (Resim 24), morötesi-görünür bölge dedektör tiplerinden biridir. Akış hücresine gönderilen beyaz ışık diyot dizisiyle teması ile dalga boylarına ayrılır. Aynı anda birçok dalga boyunda eş zamanlı veri toplanabilir.



Resim 24. Işığın absorpsiyonu prensipli çalışan dedektörlerin şematik gösterimi, (Wysocki'den 136) a) Morötesi- görünür bölge dedektörü b) Diyot dizimli dedektör (DAD)

2.10.3.5. Kolon

Tüm kromatografik sistemlerde olduğu gibi HPLC sistemlerinin de en etkin ve önemli parçası kolondur. Ayırımın etkin bir şekilde yapılması hareketli faz katkısıyla olsada ayırmada en önemli görevi üstlenen kısım kolondur. Uzunluğu 30-250mm uzunluğunda ve ticari olarak satılmaktadırlar. İlk üretildiği zamanlara nazaran kolon etkinliği artmış, kolon için stabilitesi yüksek ve tekrar edilebilir sonuçlar veren uzun ömürlü kolonlara erişmek günümüzde mümkündür. Kolonlar dolgu maddesi partiküllerle doldurulmuş ya da monolitik halde bulunabilirler. Kullanılan partiküller çeşitli özelliklere sahip olabilmektedir. Gözenekli, gözeneksiz ya da core-shell türleri mevcuttur. 3µm çaptaki partikül boyutuna sahip kolonlar analiz süresini büyük ölçüde kısalttıkları için oldukça popülerdir. Bu şekilde iş verliliğini arttırdıkları için sıklıkla tercih edilmektedirler. Tek dezavantajı olarak partikül boyutuna bağlı bant genişlemesine neden olabilirler. Bu dezavantaj ise daha yüksek basınçla çalışılan kromatografik tekniklerle önlenebilir.

Kolon dolgusu olarak kullanılan maddelerden biri silikadır. Yüksek mekanik dayanıklıya sahip bu madde kolon üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. HPLC şartları

gereği oluşan basınca karşı yüksek stabiliteye sahiptirler. pH 8'in üstünde yapılacak çalışmalarda tercih edilmemelidir. Bu seviye daha yüksek pH dereceleri silikanın çözünmesine neden olur.

Sabit fazlar genellikle organik yapılıdır. 8 veya 18 karbonlu türleri en sık kullanılan türlerdendir . Bunun haricinde 3-30 karbona kadar düz dincirli ve kovalent bağlı türleri de bulunur. Bu maddeler kolonda alıkonmayı ve analite özgü seçiciliği sağlar. Resim 25'de HPLC'da analitik amaçlı kullanılan kolon rneği gösterilmiştir.

Core-shell kolonlar ise bir çekirdek ve ona saran kabuktan oluşur. Bu kolonlar gözenekli partikül içeren kolonlardan farklıdır. 60 yıl önce büyük çaplı olan türleri geliştirilmiş ve kullanılmıştır.



Resim 25. HPLC'da analitik amaçlı kullanılan kolon, (ChromTech'den, 137)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Enstrümantasyon

3.1.1. Gaz Kromatografisi

Shimadzu QP20104 Ultra (Japonya) marka gaz kromatografisi cihazı ve Shimadzu 2010 plus FID, Shimadzu Class-5000 Chromatography Workstation yazılımları ve dedektör olarak Shimadzu marka kütle spektrometresi kullanılmıştır.

3.1.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Shimadzu LC-20AT pompa, DGU-20A5 gaz giderici, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO10ASVP kolon fırını, SPD20A DAD dedektörü kullanılmıştır.

3.1.3. Diğer Cihazlar

Aşağıdaki tabloda kullanılan diğer cihazlar ve markaları listelenmektedir.

Tablo 11. Kullanılan araç ve gereçler

Cihaz Türü	Marka
Mikrodalga fırın	DBK Manual Microwave Instrument
Hassas terazi	Ohaus, PA214C
Rotary evaporatör	Heidolph Hei-VAP Precision
pH metre	Hanna Instruments, HI 2211
Ultrasonik su banyosu	Sonica, 3300MH
Ultra saf su cihazı	Sartorius Stedim, Arium pro UV
Vortex	Isolab, MX-S
Mikropipetler	Socorex
Membran Filtre	Sartorius Stedim, Selüloz asetat, 0.45 µm
Şırınga ucu filtre	Agilent, Nylon, 0.45 µm
Santrifüj	Sigma, 3-30K
Mikro plate okuyucu	BMG Labtech Spectrostar Nano
Vial (HPLC)	
Differansiyel Taramalı Kalorimetre	Hitachi-7020
FT-IR Spektrometre	IRAffinity-1S

3.2. Bitki Örneklerinin Toplanması, Kurutulması ve Öğütülmesi

O. micranthum (Resim 26), yaklaşık 1300 m yükseklikten Adana Kozan' da 2020 yılı ağustos ayında toplanmıştır. *O. micranthum*, örnekleri Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (AEF 25873).



Resim 26. *O. micranthum* bitkisi (Karaoğlu'dan, 2)

O. minutiflorum (Resim 27), Antalya İnan Tarım'dan alınmıştır. Yaklaşık 1800 m yükseklikten Serik ilçesi, Etler Yaylası Antalya'da 2020 yılı eylül ayında, toplanmıştır *O. minutiflorum* Herbaryum kodu (AEF 25949)'dir.



Resim 27. *O. minutiflorum* bitkisi (Karaoğlu'dan, 2)

Tez çalışmasında kullanılan bu iki tür gölgede hava dolaşımı bulunan serin ve kuru bir alanda kurutulmuş, çalışmalarda çiçekli toprak üstü kısımları öğütücü değirmen yardımıyla toz haline getirildikten sonra kullanılmıştır.

3.3. Derin Ötektik Çözücülerin Sentezlenmesi

DÖÇ'lerin sentezi için Hidrojen Bağ Donör ve Hidrojen Bağ Akseptör olarak 2 grup kimyasal kullanılmıştır.

Tablo 12. Derin ötektik çözücü sentezi için kullanılan kimyasallar

Hidrojen Bağ Donör	Hidrojen Bağ Akseptör
Gallik Asit	Timol
Sinamik Asit	Mentol
Şiririk Asit	Rezorsinol
<i>p</i> -Kumarik Asit	tert- Bütıl Amonyum Bromür
1-Hegzadekanol	
1-Oktadekanol	

Hidrojen Bağ Donör ve Hidrojen Bağ Akseptör olarak ayrılan kimyasalların 10mmol ve katlarındaki miktarları 1:1 ile 1:10 arasındaki oranlarda değişen karışımları hazırlandı ve mikrodalga fırın ile 60 °C'ye kadar ısıtıldı daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

Hidrojen Bağ Donör ve Hidrojen Bağ Akseptör olarak ayrılan kimyasalların 1:1 ile 1:10 arasındaki oranlardaki bileşimleri Tablo 13'deki gibi hazırlanmıştır. Toplamda 240 adet sentez denemesi yapılmıştır. Sentez için kullanılan saf maddelerin IR Spektrumları alınmıştır. Bu şekilde sentezlenen DÖÇ ile saf maddelerin moleküler farkları ortaya konmuştur. Daha sonra sıvı fazını koruyabilen DÖÇ'ler için öz kütle hesaplamaları yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan DÖÇ'lere ait Diferansiyel taramalı kalorimetre ile ısıtma/ soğutma analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 13. Derin ötektik çözücü kombinasyonları

Kombinasyonlar (1:1-1:10)	
Gallik Asit- Timol	Sinnamik Asit- Timol
Gallik Asit- Mentol	Sinnamik Asit- Mentol
Gallik Asit- Rezorsinol	Sinnamik Asit- Rezorsinol
Gallik Asit- TBAB	Sinnamik Asit- TBAB
1-Oktadekanol- Timol	1-Hegzadekanol- Timol
1-Oktadekanol- Mentol	1-Hegzadekanol- Mentol
1-Oktadekanol- Rezorsinol	1-Hegzadekanol- Rezorsinol
1-Oktadekanol- TBAB	1-Hegzadekanol- TBAB
Şiririk Asit- Timol	<i>p</i> - Kumarik Asit- Timol
Şiririk Asit- Mentol	<i>p</i> - Kumarik Asit- Mentol
Şiririk Asit- Rezorsinol	<i>p</i> - Kumarik Asit- Rezorsinol
Şiririk Asit- TBAB	<i>p</i> - Kumarik Asit- TBAB

3.3.1. Sentezlenen DDÖÇ'lerin Fiziksel Özelliklerinin Belirlenmesi ve Karakterizasyonu

Sentezlenen DÖÇ'lere ait fiziksel özelliklerin belirlenmesi amacı ile IR analizleri, özkütle hesaplamaları, termal özelliklerinin incelenmesi amacıyla diferansiyel taramalı kalorimetre analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. IR Analizleri

IR analizleri için başlangıç saf maddelerinin ve DÖÇ'lerin Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektrumları, zayıflatılmış bir toplam yansıtma aksesuarı ile donatılmış bir IRspektrometresi kullanılarak elde edildi.

3.3.3. Özkütle Hesaplanması

Özkütle hesaplamaları, gravimetrik yöntem kullanılarak üç tekrarlı olarak ölçüldü.

3.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizleri

Sentezlenen ve çalışmalarda kullanılan DÖÇ'lerin termal özellikleri, bir Hitachi-7020 cihazı kullanılarak diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) ile 10 °C/dk ısıtma/soğutma hızında ölçülmüştür. Sıcaklık aralığı olarak -20°C ile 230 °C seçilmiştir. Ölçümlerde referans olarak boş krezeller kullanılırken çalışma için yaklaşık 10 mg örnek öncesi dondurulduktan sonra analiz edilmiştir. Termogram grafiklerinden elde edilen grafikler yorumlanmıştır. Faz dönüşümüne (erime – donma) karşılık gelen entalpi değişimi

piklerin altında kalan alan üzerinden hesaplanır. Bu çalışmada karakterizasyon erime noktası değişimine göre değerlendirilecektir.

3.3.5. En İyi Verime Sahip DDÖÇ ‘ün Belirlenmesi

Geliştirilen tekniğin performansını değerlendirmek için DÖÇ için ekstraksiyon geri kazanımı (EGK) ve zenginleştirme faktörü (ZF) aşağıdaki denklemlerle tahmin edildi.

$$\text{Ekstraksiyon Geri Kazanımı: } \mathbf{EGK} = \left(\frac{C_{DÖÇ}}{C_0} \right) \quad (\text{Eşitlik 52})$$

$$\text{Zenginleştirme Faktörü: } \mathbf{ZF} = \left(\frac{C_{DÖÇ} \times V_{DÖÇ}}{C_0 \times V_0} \right) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 53})$$

3.4. Türlerin Ekstraksiyonu

Türlere ait ekstraksiyon iki şekilde gerçekleştirildi biri; metanol ekstraksiyonu diğeri ise DÖÇ’lerle mikro ekstraksiyon şeklinde uygulandı. Metanol ekstraksiyonu mikrodalga ekstraksiyon ile mikrodalga ekstraksiyon ve çalkalayıcı ekstraksiyonu şeklinde gerçekleştirildi. Kuru ekstrelerden kazınan numune, konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde HPLC saflıkta metanolde yeniden çözüldükten sonra 0.45 µm membran filtreden geçirilmek suretiyle analiz örnekleri hazırlandı.

Mikrodalga fırın şartları 400 W, 40°C 10 dk sürede gerçekleştirildi. *O. micranthum* için 1.1133 g örnek hassas terazide tartılıp üzerine 10 mL HPLC saflıkta metanol ilave edilmiş ve mikrodalga ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. *O. minutiflorum* için 1.0009 g örnek hassas terazide tartılıp üzerine 10 mL HPLC saflıkta metanol ilave edilmiş ve mikrodalga ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir

Metanol ile çalkalayıcı ile *O. micranthum* için 1.0239 g örnekten alınıp üzerine 10 mL HPLC saflıkta metanol ilave edilmiş ve 40 °C de 24 saat çalkalayıcıda ekstraksiyonu yapılmıştır. *O. minutiflorum* için 1.0009 g örnek hassas terazide tartılıp üzerine 10 mL HPLC saflıkta metanol ilave edilmiş ve 40 °C de 24 saat çalkalayıcıda ekstraksiyonu yapılmıştır.

Dispersif sıvı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile sulu bir numunede ince ekstraksiyon solventi olarak seçilen DÖÇ damlacıklarının dispersiyonunu içeren bir ekstraksiyon tekniği kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi mikrodalga fırın içerisinde tamamlandı. DÖÇ su içindeki

bitki örnekleri ile birlikte aynı anda mikrodalga fırın içinde optimum şartları belirlenen derecelerde gerçekleştirildi.

3.5. Gaz Kromatografisi Yöntemleri Deneysel Koşulları

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen uçucu yağları, Shimadzu QP20104Ultra marka gaz kromatografisi cihazı ve Shimadzu 2010 plus FID, Shimadzu Class-5000 Chromatography Workstation yazılımları ve dedektör olarak Shimadzu marka kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerin yapıldığı koşullar Tablo 14’de verilmiştir.

Tablo 14. GC-MS deneysel koşullar

Parametre	Durum
Sıcaklık	60 C 'dan 240°C (dakikada 3°C)
Akış Hızı	1.0 mL.dak ⁻¹
Toplam Analiz Süresi	62dak
Enjekte Edilen Numune Miktarı	1µL
Ara faz Sıcaklığı	250°C
Enjektör Sıcaklığı	250°C
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Kolon	RTX-5M 30 m Kapiler Kolon
İyonizasyon Voltajı	70 eV

3.5.1.Uçucu Yağların Eldesi

Kurutulmuş *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkileri ayrı ayrı, toprak üstü kısımları ayrılmadan, öğütücü değirmen yardımıyla toz haline getirildikten sonra 20'şer gram tartılarak ayrı ayrı 1 L'lik düz dipli balona yerleştirildi. Üzerlerine 500 mL ultra saf su eklendikten sonra clevenger düzeneği mikrodalga düzeneği ile kombine bir şekilde kurularak 3 saat boyunca su buharı ekstraksiyonuna tabii tutuldu. Kombine edilmiş yöntem Resim 28'de gösterilmiştir.



Resim 28. Mikrodalga fırın ile kombine Clevenger düzeneği

Ekstraksiyon işlemi 400 W, 100°C’de gerçekleştirilmiştir. Bitkilerden gelen uçucu yağlar su buharı ile sürüklenerek -15°C’ye kadar soğutulmuş geri soğutucu düzeneğinde yoğunlaştırılarak suyun üzerinde toplandı. HPLC grade n-hegzan ile çözünerek -18°C’de kahverengi viallerde analiz yapılana kadar muhafaza edildi. Analiz sırasında elde edilen yağın 1µL’si GC-MS cihazına injeksiyonuyla gerçekleştirildi. Ekstraksiyon işlemi 400W, 100 °C’de 3 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

Ön muamele için kullanılacak DÖÇ uçucu analizlerini değiştirmeyecek nitelikte seçilmeye çalışılmıştır. Timol ve Mentol içeren türler uçucu bileşen olduğundan dolayı bu karışımları içeren türler elenmiştir. Sıvı formunu koruyan Rezorsinol türü hiç olmadığından bu grup çözücüler elenmiştir. Kullanılacak DDÖÇ alternatifleri sadece Sinamik Asit- TBAB, Şiririk Asit- TBAB ve *p*-Kumarik asit –TBAB olarak kalmıştır.

Çalışmada kullanılan DDÖÇ *p*-kumarik asit- TBAB olarak seçilmiş ve çalışmaya bu şekilde devam edilmiştir. *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerine 20’şer gram alınarak, uygun derin ötektik çözücünden 10 mL kadar eklenip mikrodalga fırında 60 °C’ de 400 W güç uygulanarak 15 dk ön muameleye tabi tutulmuştur. Daha sonra aynı düzenek için üzerlerine 500 mL ultra saf su eklendikten sonra mikrodalga düzeneği ile kombine clevenger düzeneğinde 400 W, 100 °C’ de 3 saat süre ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.

3.5.2. Uçucu Bileşenlerinin Aydınlatılması

İzole edilen uçucu bileşikler, bileşiklere ait kütle spektrumlarının Shimadzu QP20104 Ultra marka gaz kromatografisi cihazı ve Shimadzu 2010 plus FID, Shimadzu Class-5000 Chromatography Workstation cihazına entegre edilmiş NIST ve Wiley kütüphanelerindeki verileriyle karşılaştırılması sonucu aydınlatılmıştır.

3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Deneysel Koşulları

Fenolik bileşik analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla. *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen ekstraktlar yürütülmeden önce kalibrasyon işlemi gerçekleştirildi. HPLC çalışmalarında kullanılan fenolik madde standartları *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit asit, *p*-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin olmak üzere 7 fenolik bileşik türüdür. HPLC saflıkta metanolla her bir standardın konsantrasyonunun 100 µg/mL olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır. 0.45 µm membran filtreden geçirildikten sonra HPLC çalışmalarında kalibrasyon eğrisi

oluşturulması için standartları içeren stok çözeltiden, 5-10-25-50-100 µg/mL konsantrasyonlarındaki dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC cihazında yürütülmeleri daha önce oluşturulan fenolik asit tayin yönteminden yenilenerek gerçekleştirilmiştir.

C18 (RP-C18, 150 mm×4.6 mm, 5 µm) kolon fenolik bileşiklerin tespitinde kullanılmıştır. Analiz 270 nm’de Shimadzu LC-20AT pompa, DGU-20A5 gaz giderici, SIL-20A otomatik örnekleyici, CTO10ASVP kolon fırını, SPDM20A DAD dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çözücü sistemi ise gradiyent program uygulanarak 16 dk ‘da tamamlanmıştır. Ayırım olarak, A çözeltisi %100 metanol, B çözeltisi %2’lik sulu asetik asit (pH 2.7) olduğu ikili çözücü sistemi kullanılmıştır. Tablo 15 şartları göstermektedir.

Tablo 15. Fenolik bileşiklerin analizinde kullanılan HPLC şartları

Yöntem	Gradient elüsyon
Hareketli Faz	A: %100 metanol B: %2 sulu asetik asit çözeltisi (pH 2.7)
Dedektör	SPDM20A Diode Array Detector (DAD)
Kolon	C18 kolonu (RP-C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm)
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Akış Hızı	1.5 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Dalga Boyu	270 nm
Süre	16 dk

Gradiyent elüsyonda kullanılan çözücülere ait oranlar ve oran değişim zamanları Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16. Gradient elüsyonda kullanılan çözücü oranları ve değişim zamanı

Zaman (dk)	Solvent A %	% Solvent B %
0.01	20	80
4.00	30	70
7.00	40	60
8.00	40	60
10.00	45	55
11.00	45	55
12.00	50	50
13.00	50	50
14.00	60	40
15.30	80	20
16.00	Stop	

3.6.1. Yöntem Validasyonu

3.6.1.1. Sistem Uygunluğu

Validasyon işlemleri yapılmadan önce sistemin yeterli bir şekilde çalıştığını kanıtlamak için sistem uygunluk testi yapılır. Bu işlem için aynı standardın 5 tekrarlı enjeksiyonu değerlendirilmiştir. HPLC yöntemi validasyonu, ICH yönergelerine göre doğrusallık, LOD ve LOQ, geri kazanım, kesinlik ve seçicilik açısından değerlendirilmiştir.

5–100 µg/mL aralığında en az beş farklı fenolik bileşik karışım solüsyonu konsantrasyonu beş tekrar halinde analiz edilmiştir.

3.6.1.2. Doğrusallık

5–100 µg/mL aralığında en az beş farklı fenolik bileşik karışım solüsyonu konsantrasyonu beş tekrar halinde analiz edilmiştir.

Pik alanları, doğrusal bir regresyon denklemi oluşturmak ve korelasyon katsayısını belirlemek için karışım çözeltilerinin her bir konsantrasyonuna karşı çizilmiştir.

3.6.1.3. LOD ve LOQ

Pik alanları, doğrusal bir regresyon denklemi oluşturmak ve korelasyon katsayısını belirlemek için karışım çözeltilerinin her bir konsantrasyonuna karşı çizilmiştir. Algılama limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) değerleri, sinyal-gürültü yöntemi kullanılarak

atanmıştır. LOD'yi değerlendirmek için üç katlı bir sinyal-gürültü oranı (S/N) ve LOQ'yu değerlendirmek için on katlı bir sinyal-gürültü oranı kullanılmıştır.

3.6.1.5. Geri Kazanım ve Kesinlik

Geri kazanımı belirlemek için üç farklı konsantrasyonda karışım solüsyonları (5, 25 ve 50 µg/mL) üç kopya halinde uygulanmıştır. Geri kazanım, bilinen miktarın yüzdesinin ortalama ve standart sapması olarak değerlendirilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik, tutma sürelerinin bağlı standart sapması (% RSD) ve üç farklı konsantrasyonla, iki ayrı gün için standartlara göre üç tekrarlı karışım çözeltileriyle yüzde pik alanları olarak belirlenmiştir.

3.6.1.6. Seçicilik

Yöntem seçiciliği, standart tepe noktaları arasındaki çözünürlüğü değerlendirerek değerlendirilmiştir. Fenolik bileşikler, aynı HPLC koşulları kullanılarak belirlenmiştir. Numune pikleri, bilinen fenolik standartların alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Metodun tekrarlanabilirliğini doğrulamak için metanolik ekstrakt üç kopya halinde çalıştırılmış ve değerler, bitki konsantrasyonlarının ortalama ve standart sapması olarak ifade edilmiştir.

3.7. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağların oksidasyon engelleme kapasitelerinin tayin edilmesi amacıyla antioksidan aktivite testleri ve bakteri ve küf dahil mikropların gelişimini engelleyen, bunlara direnç gösterme özelliğinin tayin edilmesi amacıyla antimikrobiyal aktivite test uygulamaları yapılmıştır.

Antioksidan tayinler için kullanılan kimyasalların listesi Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. Antioksidan tayinler için kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Marka
Asetik Asit	Merck
HCl	Merck
Metanol-LC Saflıkta	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu’s Fenol Reaktifi	Sigma-Aldrich
DPPH	Sigma-Aldrich
Gallik asit	Sigma-Aldrich
Troloks	Sigma-Aldrich
BHT	Sigma-Aldrich
CuCl ₂ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich

Antioksidan tayinler için kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. Antioksidan tayinler için kullanılan çözeltiler

FRAP Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
Çözelti	Hazırlanışı
HCl (100 mM)	50 mL saf suyun üzerine % 37'lik HCl'den 410 µL ilave edilerek hazırlanmıştır.
TPTZ (10 mM)	46.8 mg TPTZ tartılmıştır, 6 mL 100 mM'lık HCl içinde çözüldükten sonra üzerine 9 mL metanol ilave edilmiştir
FeCl ₃ (20 mM)	48.6 mg FeCl ₃ 6 mL saf suda çözülmüş, sonra üzerine 9 mL metanol ilave edilerek hazırlanmıştır
Asetat Tamponu (300 mM, pH 3,6)	12 mL glasiyel asetik üzerine 2.325 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O tuzu ilave edilmiştir. Saf suyla 750mL 'ye tamamlanmıştır.
FRAP Reaktifi	300 mM pH 3.6 asetat tamponu üzerine 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl ₃ (10:1:1) oranında karıştırılarak taze olarak hazırlanmıştır.
Troloks (0.25 mg/mL)	5 mg troloks 20 mL etanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlanmıştır.
DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi İçin Kullanılan Çözeltiler	
Çözelti	Hazırlanışı
DPPH• Reaktifi (100 mM)	1.97 mg DPPH• tartılmış, 45 mL metanolle çözülmüştür ve 50 mL'ye tamamlanmıştır
BHT (0.01 mg/mL)	0.1 mg BHT 10 mL metanolde çözülerek hazırlanmıştır. Stok çözelti metanolle 1:1 oranında seyreltilerek 10-5-2.5-1.25-0.625µg/mL konsantrasyonları hazırlanmıştır
CUPRAC Tayini İçin Kullanılan Çözeltiler	
Troloks (0.25 mg/mL)	12.5 mg Troloks 50 mL metanolde çözülerek stok çözeltisi hazırlanmıştır.
7.5 mM Nc Çözeltisi	39 mg Neokuproin 25 mL metanolde çözülerek hazırlanmıştır.
10 mM CuCl ₂ .2H ₂ O	46.2 mg CuCl ₂ .2H ₂ O 25 mL distile su ile çözülerek hazırlanmıştır (NaOH ile pH 7 olacak şekilde ayarlandı.)
1 M NH ₄ CH ₃ COO-	1.9 g NH ₄ CH ₃ COO tuzu 50 mL distile su ile çözülerek hazırlanmıştır (NaOH ile pH 7 olacak şekilde ayarlanır.).

3.8. Antioksidan Aktivite Çalışmaları

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilecek tüm ekstraktların antioksidan aktivitesin belirlenmesi amacıyla antioksidan tayin yöntemlerinden CUPRAC Tayini, FRAP Tayini ve DPPH Tayini testleri gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

Bu metot, 450 nm’de absorbans veren Nc’nin Cu (II) ile oluşturmuş olduğu Cu(II)-Nc’nin, antioksidan varlığında oluşturduğu şelat Cu(I)-N kompleksinin UV-Görünür bölge spektrofotometrik ölçümüne dayandırılarak antioksidan kapasitesi ölçülmektedir (101).

5 farklı konsantrasyonda Troloks (62.5, 125, 250, 500, 1000) μ M metanollü çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışmada, *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar, fenolik analiz için elde edilen ekstraktlar (10 mg/mL) kullanılmıştır. 500 μ L numune çözeltileri üzerine 1000 μ L $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}^-$ ve 1000 μ L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eklenmiştir. Ardından test çözeltilerine 1000 μ L Nc reaktifi, numune körlerine 1000 μ L metanol (çözücü olarak) 20’şer sn arayla eklenmiştir. 30 dakika sonra numunelerin absorbansları 450 nm’de spektrofotometrede okunmuştur. Deney sırasında numunelerin çözücülerini kör olarak kullanılmıştır. Örneklerin antioksidan kapasiteleri, standart olarak hazırlanan Troloks ile karşılaştırılarak Troloks Eşdeğeri TEAC (μ M) olarak verilmiştir.

3.8.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Bu metot ile 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren, Fe(III)-TPTZ kompleksinin antioksidan madde varlığında indirgenmesi ile oluşan mavi renkli Fe(II)-TPTZ kompleksinin UV-Görünür bölge spektrofotometrik ölçümüne dayandırılarak antioksidan kapasitesi ölçülmektedir (100). 5 farklı konsantrasyonda Troloks (62.5, 125, 250, 500, 1000) μ M etanollü çözeltileri hazırlanmıştır ve kalibrasyon için kullanılmıştır. *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar, fenolik analiz için elde edilen ekstraktlar 10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlanmıştır. Kullanmadan hemen önce taze olarak hazırlanması gereken FRAP reaktifi çalışma boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiş ve tazeliğini korumuştur. Bu deneyde de kör olarak numunelerin kendi çözücülerini kullanılmıştır. Gallik asit ve örnek çözeltilerinden 50 μ L alındıktan sonra, üzerlerine 1,5 mL FRAP reaktifinden eklenmiştir. Bir süre vortekslelendikten sonra, tüm tüpler oda sıcaklığında 20 dk kadar bekletilmiştir. Bu süre

tamamlandıktan sonra 565 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Örneklerin antioksidan kapasiteleri, standart olarak hazırlanan Troloks ile karşılaştırılarak Troloks Eşdeğeri TEAC (μM) olarak verilmiştir.

3.8.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

Potansiyel antioksidan aktivite tayini için kullanılan en sık yöntemlerden biri olan DPPH tayin yöntemi için ticari olarak satın alınabilen, kararlı bir serbest radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil kullanılır. DPPH metodu ile 517 nm dalga boyunda maksimum absorbanı veren DPPH radikalının mor menekşe rengindeki açılma ve buna bağlı absorbanındaki azalma tespit edilmiştir. DPPH metodu için 100 μM ’lık DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. BHT (bütil hidroksi tolüen) kimyasalının 0.01 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanmış olan çözeltisi standart madde olarak kullanılmıştır (98,99).

Önce, analizi yapılacak örneklerin çalışma için uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi işlemi yapılmıştır. Ön denemelerde hazırlanan örnekten ve DPPH• çözeltisinden 1:1 oranında karıştırılarak 40 dk beklenmiştir. Bu süre sonunda radikalın mor menekşe rengi kalıcı ise konsantrasyonun numune için uygun olduğuna karar verilmiştir. Aynı şekilde karıştırılan örnek ve DPPH karışımının renginin kaybolması durumunda ise numune konsantrasyonu yarım kat daha seyreltilerek aynı şekilde ön denemeye uygun konsantrasyonu bulma işlemine devam edilmiştir. Çalışma konsantrasyonları belirlendikten sonra numunelerin belirlenen konsantrasyonları kendi çözücüleri ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Standart stok çözeltisi olan BHT de yarı yarıya seyreltilmiş 5 farklı dilüsyonu hazırlanmıştır.

750 μL DPPH• çözeltisi ve 750 μL numune çözeltisi karıştırılıp vortekslenmiştir. Sonra oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 50 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 517 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Kör olarak DPPH• çözeltisi ve örneklerin çözüldüğü çözücüler kullanılmıştır. Elde edilen absorbanlara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Tüm numuneler üç tekrarlı çalışılmıştır.

3.9. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

3.9.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Testi

Antimikrobiyal aktivite testi için *Candida albicans* ATCC10231 fungus türü olarak ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* RSKK709, *Staphylococcus epidermis* ATCC12228 ve *Escherichia coli* ATCC25922 bakteri olarak indikatör seçilmiştir. Yöntem prosedüründe bazı modifikasyonlar yapılarak çalışıldı. Elde edilen uçucu yağların ve ekstratların antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk difüzyon testi ile analiz edilmiştir. Yöntem testi için önce, 121 °C’de 15 dakika sterilize edilen Muller Hilton Agar, steril kabin içinde 20-25 mm kalınlığında ayarlanarak petri kabına dökülmüştür. Soğumak üzere bekletildikten sonra, bakteri yoğunluğu 0.5 Mc Farlanda, maya yoğunluğu 2.0 Mc Farlanda ayarlanmış olup agar yüzeyine eküvyon çubuğuyla yayılmış, daha sonra agar yüzeyinde 6-7 mm çapında kuyucuklar açılmış ve her kuyucuğa 75 µL örnekler enjekte edilmiştir. Negatif kontrol olarak her fraksiyonun örneksiz içeriği hazırlanıp kullanıldı. 25 °C’de Petriyer *C. albicans*, 37 °C’de 24 saat kalan mikroorganizmalar inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda kuyucukların etrafında oluşan inhibisyon zon çapları (mm) olarak ölçülmüştür.

3.10. Deney Tasarımının Design-Expert-11.1.2 ile Kurgulanması

Ekstraksiyon sürecine etki eden parametreleri belirlemek için deney tasarımı oluşturuldu ve sonuçlar Design Expert 11.1.2 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir. Tasarım programı Tablo 19’da verilmiştir.

Program ile elde edilen tasarım gücü aşağıdaki gibi elde edilmiştir. Gücün % 80 üstü olması beklenmektedir. Resim 29’da tasarım ile %98.3 üzerinde olduğu görülmüştür.

Design Power											
	Name	Units	Delta (Signal)	Sigma (Noise)	Signal/Noise	Power for A	Power for B	Power for C	Power for D	Power for E	Power for F
	R1	%	3	2	1.5	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%
	R2	%	3	2	1.5	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%
	R3	%	3	2	1.5	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%
	R4	%	3	2	1.5	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%
	R5	%	3	2	1.5	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%
	R6	%	3	2	1.5	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%	98.3%

Power is reported at a 5.0% alpha level to detect the specified signal/noise ratio.

Power should be approximately 80% or greater for the effects you want to detect.

Resim 29. Design Expert 11.1.2 program ile elde edilen tasarım gücü

Tablo 19. Tasarım programı

Sıra	Faktör 1 A:MW Süresi s	Faktör 2 E:MD Sıcaklığı °C	Faktör 3 B:MD Gücü W	Faktör 4 C:Döç Hacmi µL	Faktör 5 F:Su Hacmi mL	Faktör 6 D:Vortex süresi min
1	60	10	300	150	3	60
2	60	10	300	150	1	20
3	60	70	500	150	1	20
4	60	10	500	150	3	20
5	60	10	300	100	3	20
6	20	70	300	150	3	60
7	60	70	300	100	3	60
8	20	10	300	100	1	20
9	60	70	500	100	3	60
10	20	10	500	100	1	60
11	20	10	500	150	3	60
12	60	70	300	150	3	20
13	60	70	500	150	3	60
14	60	70	300	100	1	20
15	20	10	500	100	3	60
16	20	10	300	100	3	60
17	20	10	500	150	1	20
18	60	70	300	150	1	60
19	20	10	300	150	1	60
20	20	70	300	100	1	60
21	20	70	300	100	3	20
22	20	70	500	150	3	20
23	60	10	300	100	1	60
24	60	10	500	100	1	20
25	20	70	300	150	1	20
26	60	10	500	150	1	60
27	60	10	500	100	3	60
28	20	70	500	100	3	60
29	60	70	500	100	1	60
30	20	70	500	100	1	60
31	20	10	300	150	3	60
32	20	70	500	150	1	60

3.10.1. Faktörlerin Belirlenmesi

Program ile sıralamaya tabi tutulan veriler Design Expert 11.1.2 ile analiz edilmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır.

3.10.2. Box-Behnken Optimizasyonu

Merkez noktada 3 tekrarlı 3 parametre için rastgele sırayla toplam 15 deney gerçekleştirilmiştir ve verilere çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Modeli istatistiksel olarak değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. *p*-benzoik asit fenolik analiz sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 20. Box-Behnken tasarım programı

Analiz Sayısı	Sıcaklık °C	Çözücü Hacmi µL	Süre sn
1	10	125	20
2	70	100	40
3	40	100	20
4	40	150	60
5	10	100	40
6	70	150	40
7	40	150	20
8	70	125	20
9	40	125	40
10	40	100	60
11	40	125	40
12	70	125	60
13	10	150	40
14	40	125	40
15	10	125	60

4. BULGULAR

4.1. Sıvı Formunu Koruyan Doğal Derin Ötektik Çözeltiler

Gruplandırılan karışımlardan molar oranı 1:1-1:10 arasında her biri için 10 karışım oluşturuldu. Toplamda 240 tane ötektik karışım oluşturuldu. Oda sıcaklığına geldikten sonra sıvı yapısını koruyan bileşikler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

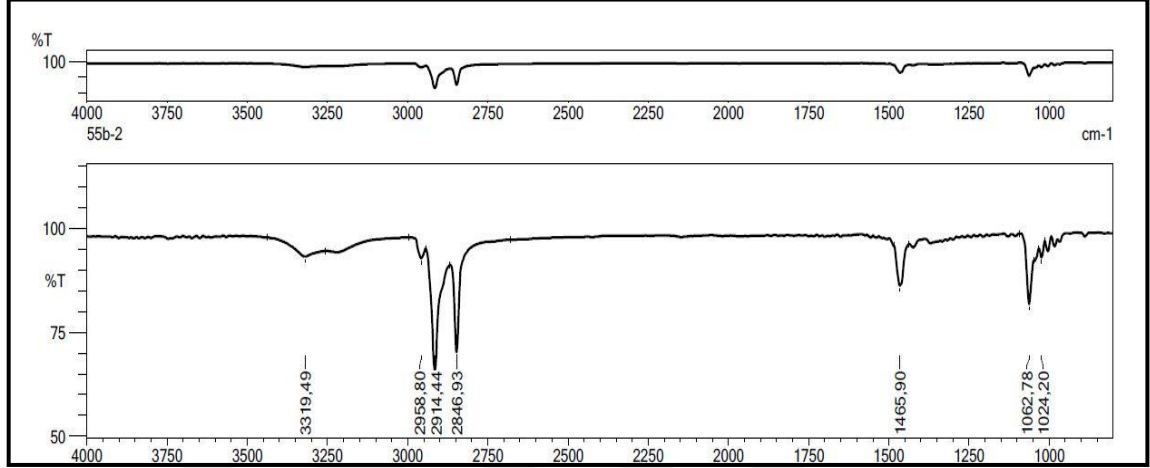
Tablo 21. Sıvı formunu koruyabilen derin ötektik karışımlar

HBD/HBA	Çalışılan Molar Oranlar*	Sıvı Formu Koruyanlar
Gallik Asit- Timol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Gallik Asit- Mentol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Gallik Asit- Rezorsinol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Gallik Asit- TBAB	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Sinnamik Asit- Timol	1:1 ile 1:10 arası	1:9,1:10
Sinnamik Asit - Mentol	1:1 ile 1:10 arası	1:6-1:10
Sinnamik Asit - Rezorsinol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Sinnamik Asit - TBAB	1:1 ile 1:10 arası	1:5-1:10
1-Oegzadekanol- Timol	1:1 ile 1:10 arası	1:3,1:5,1:8,1:10
1-Oktadekanol – Mentol	1:1 ile 1:10 arası	1:6-1:10
1-Oktadekanol – Rezorsinol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
1-Oktadekanol – TBAB	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
1-Hegzadekanol- Timol	1:1 ile 1:10 arası	1:1-1:8
1-Hegzadekanol- Mentol	1:1 ile 1:10 arası	1:1-1:7
1-Hegzadekanol- Rezorsinol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
1-Hegzadekanol- TBAB	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Şiririk Asit- Timol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Şiririk Asit- Mentol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Şiririk Asit – Rezorsinol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
Şiririk Asit – TBAB	1:1 ile 1:10 arası	1:7-1:10
p-Kumarik Asit- Timol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
p-Kumarik Asit-Mentol	1:1 ile 1:10 arası	1:9-1:10
p-Kumarik Asit- Rezorsinol	1:1 ile 1:10 arası	Hepsi Katı
p-Kumarik Asit- TBAB	1:1 ile 1:10 arası	1:3-1:10

Molar Oranlar*1:1,1:2,1:3,1:4,1:5,1:6,1:7,1:8,1:9,1:10 şeklinde hazırlanmıştır.

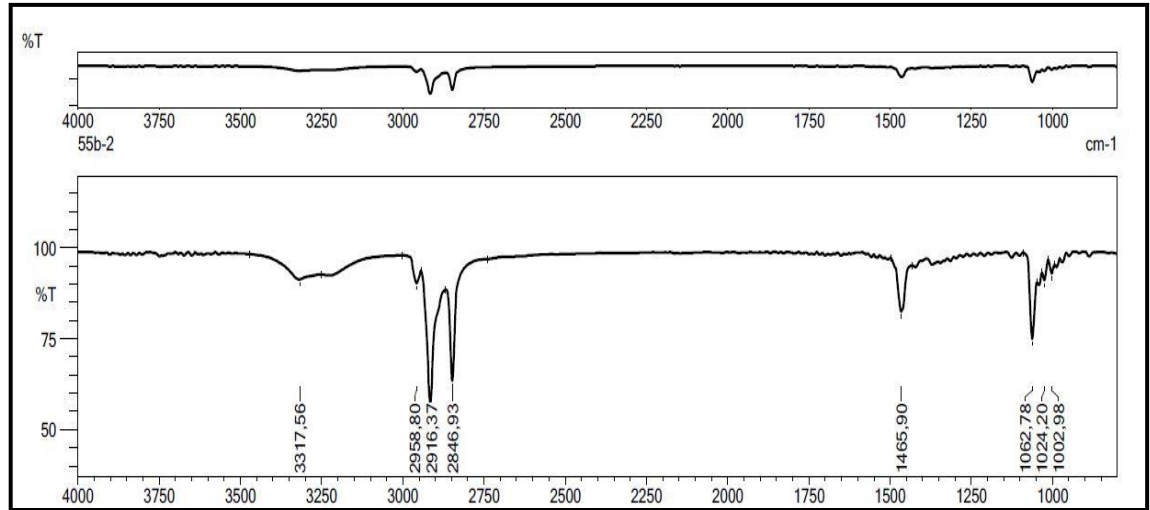
4.2. Başlangıç Maddelerine ait IR Spektrumları

1-oktadekanol saf maddesine ait IR spektrumu Resim 30’da verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3319 cm^{-1} , 2914 cm^{-1} , 2846 cm^{-1} ve 1465 cm^{-1} ve 1062 cm^{-1} ’dir.



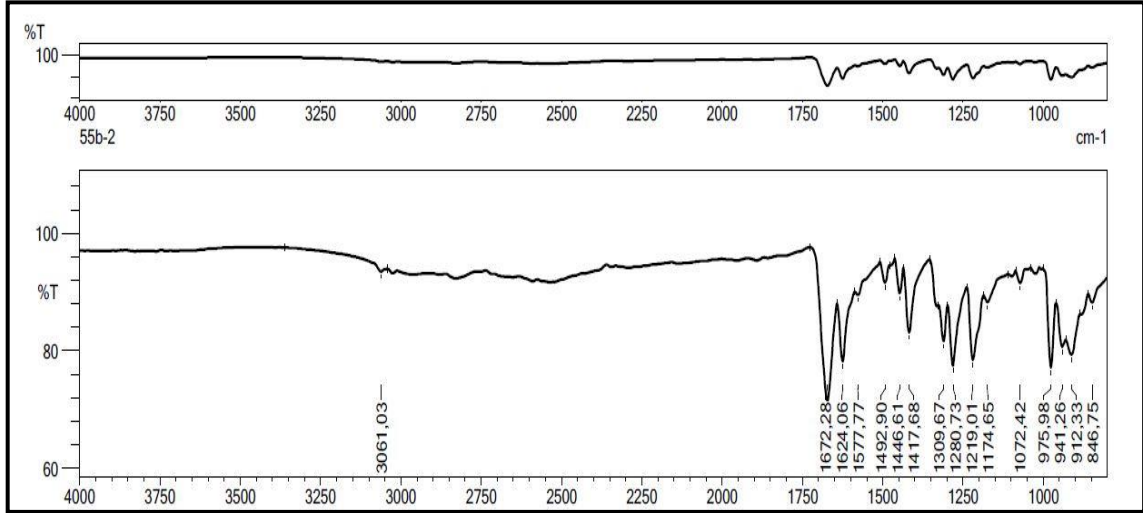
Resim 30. 1-oktadekanol’e ait IR spektrumu

1-hegzadekanol saf maddesine ait IR spektrumu Resim 31’de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3317 cm^{-1} , 2916 cm^{-1} , 2946 cm^{-1} ‘dır.



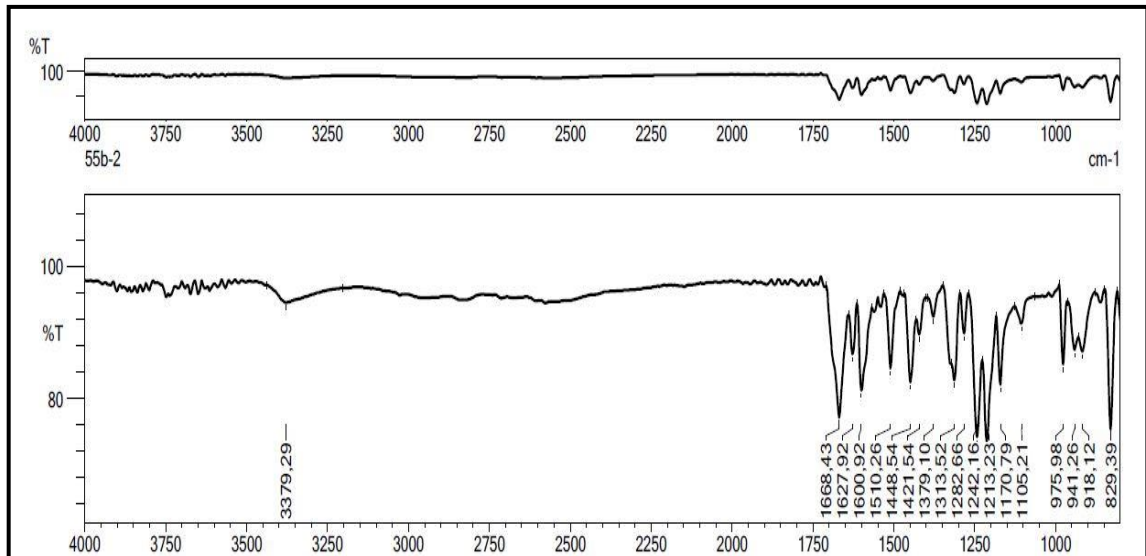
Resim 31. 1-hegzadekanol’e ait IR spektrumu

Sinnamik asit saf maddesine ait IR spektrumu Resim 32’de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 306 cm^{-1} , 1672 cm^{-1} ‘dir.



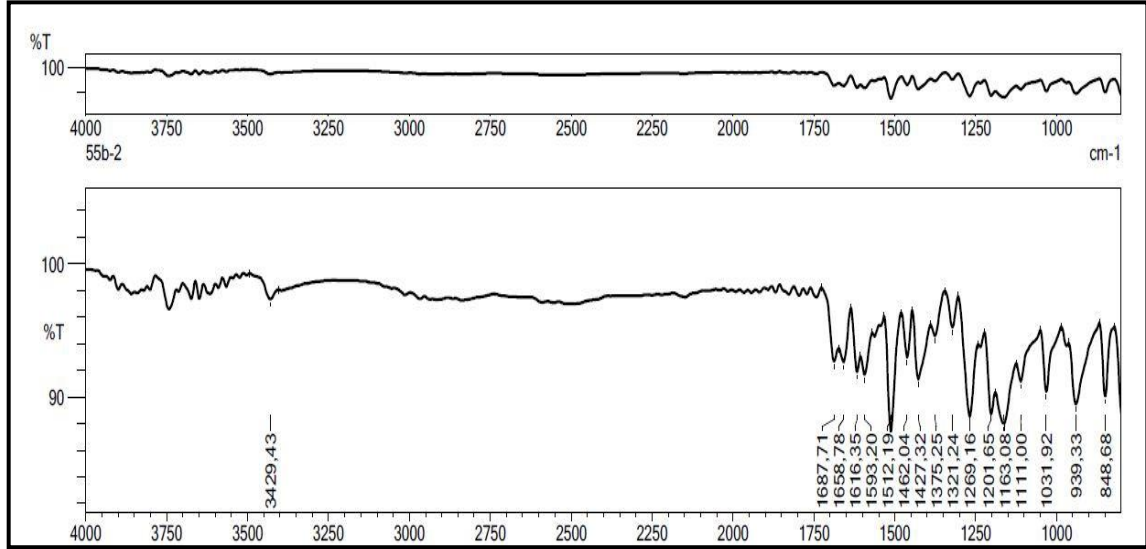
Resim 32. Sinnamik asit’e ait IR spektrumu

p-Kumarik asit saf maddesine ait IR spektrumu Resim 33’de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3379 cm^{-1} , 1800 cm^{-1} ’li bölgedeki dalgalanma, 1668 cm^{-1} 1600 cm^{-1} 1213 cm^{-1} ve 829 cm^{-1} dir.



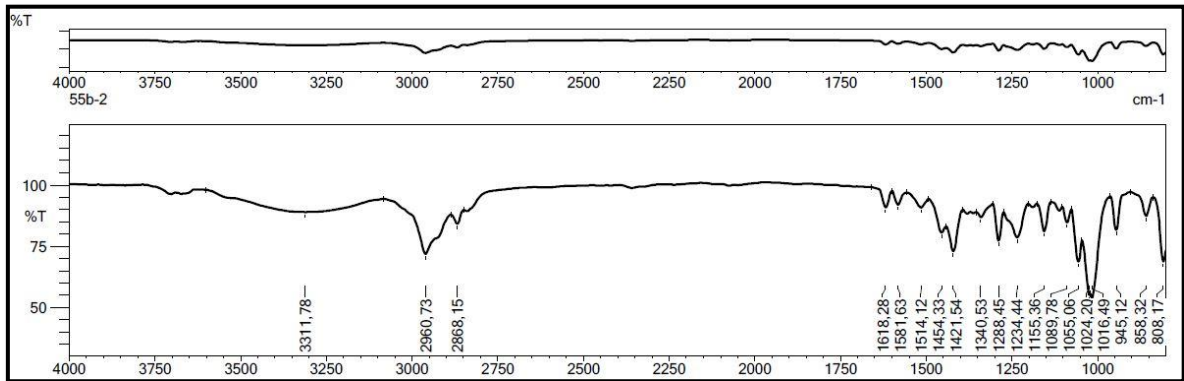
Resim 33. *p*-Kumarik asit’e ait IR spektrumu

Siringik asit saf maddesine ait IR spektrumu Resim 34’de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3229 cm^{-1} , 1687 cm^{-1} ’ dir.



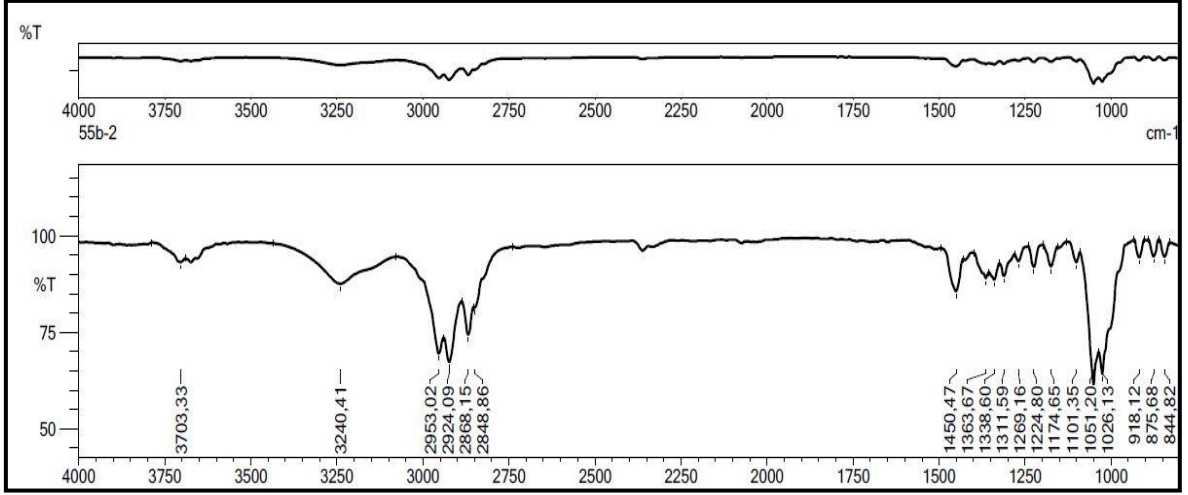
Resim 34. Şirinik asit’e ait IR spektrumu

Timol saf maddesine ait IR spektrumu Resim 35’de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3311 cm^{-1} , 2960 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} ve 1055 cm^{-1} ’dir.



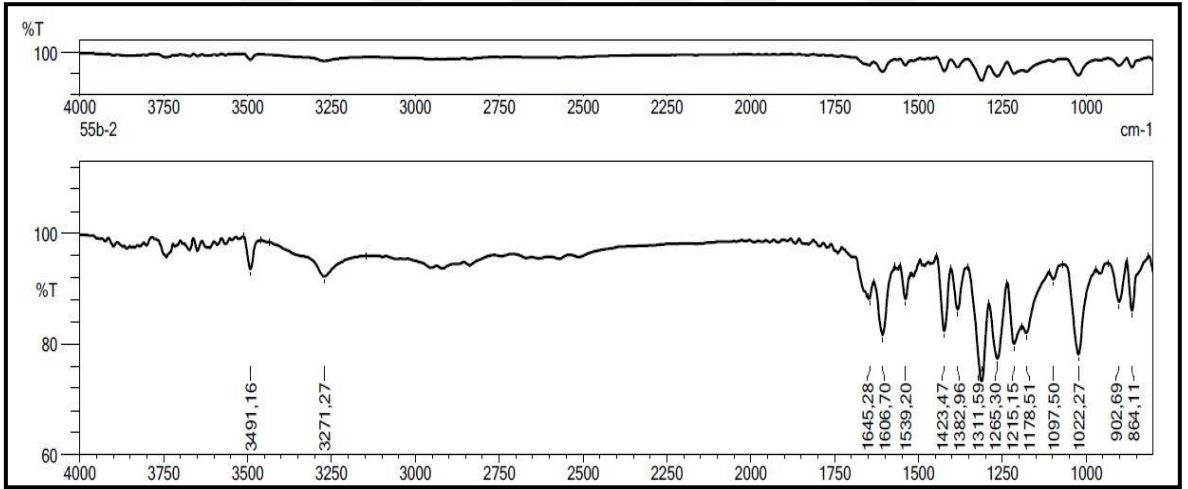
Resim 35. Timol’e ait IR spektrumu

Mentol saf maddesine ait IR spektrumu Resim 36’da verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3703 cm^{-1} , 3240 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} ‘dür.



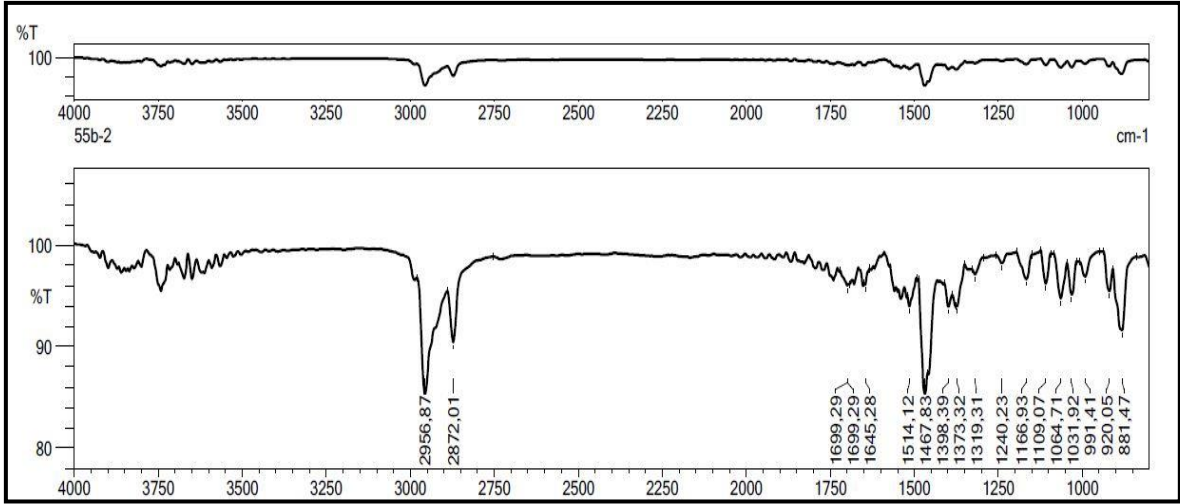
Resim 36. Mentol'e ait IR spektrumu

Gallik asit saf maddesine ait IR spektrumu Resim 37'de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3491 cm^{-1} , 3271 cm^{-1} ve 1606 cm^{-1} 'dir.



Resim 37. Gallik asit'e ait IR spektrumu

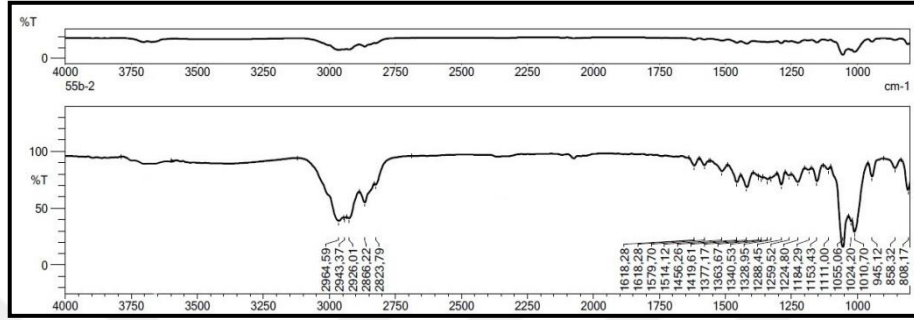
Tert-butil amonyum bromür saf maddesine ait IR spektrumu Resim 38'de verilmiştir. Maddenin saf olduğunu belirleyen bantlar; 2958 cm^{-1} , 2872 cm^{-1} , 1467 cm^{-1} 'dir.



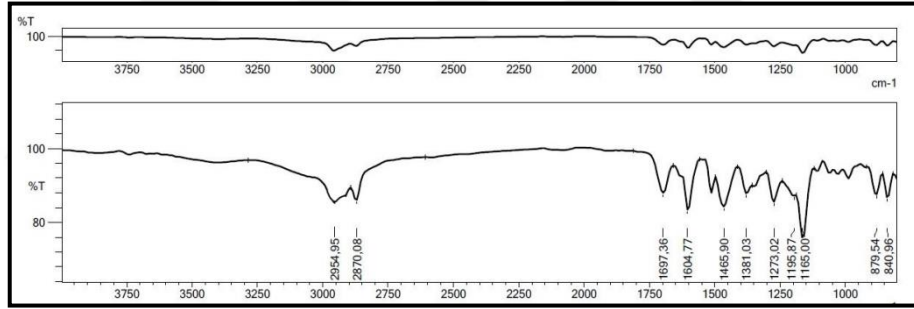
Resim 38. TBAB'e ait IR spektrumu

4.3. Sentezlenen Doğal Derin Ötektik Çözeltilere ait IR Spektrumları

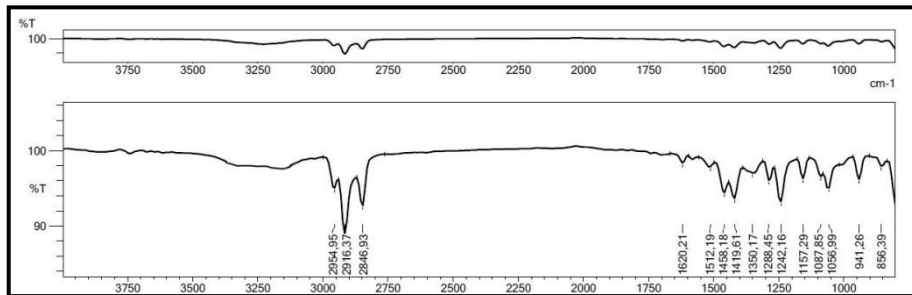
1-Oktadekanol-timol karışımından oluşan DÖÇ'e ait IR spektrumu Resim 39'de *p*-Kumarik asit -TBAB karışımından oluşan DÖÇ'e ait IR spektrumu Resim 40'de ve 1-Hegzadekanol-timol karışımından oluşan DÖÇ'e ait IR spektrumu Resim 41'de verilmiştir.



Resim 39. 1-Oktadekanol-Timol karışımına ait IR spektrumu



Resim 40. *p*-Kumarik asit -TBAB karışımına ait IR spektrumu



Resim 41. 1-Hegzadekanol-timol karışımına ait IR spektrumu

4.4. Derin Ötektik Çözücülerin Fiziksel Özellikleri

Sıvı Formunu koruyan bileşiklerin molar oranlarından bağımsız aynı renge sahip olduğu görülmüş ve toplu bir şekilde renkleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 22. Sıvı formunu koruyabilen derin ötektik karışımların fiziksel özellikleri

HBD/HBA	Molar Oranlar	Sıvı Rengi
Sinamik Asit- Timol	1:9-1:10	Renksiz, akışkan
Sinamik Asit - Mentol	1:6-1:10	Renksiz, akışkan
Sinamik Asit - TBAB	1:5-1:10	Renksiz, akışkan
1-Hegzadekanol- Timol	1:3,1:5,1:8,1:10	Çok açık sarı, yağimsı
1-Oktadekanol – Mentol	1:6-1:10	Çok açık sarı, yağimsı
1-Hegzadekanol- Timol	1:1-1:8	Çok açık sarı, yağimsı
1-Hegzadekanol- Mentol	1:1-1:7	Çok açık sarı, yağimsı
Şiririk Asit – TBAB	1:7-1:10	Renksiz, viskoz
<i>p</i> -Kumarik Asit-Mentol	1:9-1:10	Çok açık pembe, akışkan
<i>p</i> -Kumarik Asit- TBAB	1:3-1:10	Çok açık pembe, akışkan

4.4.1. Sentezlenen Derin Ötektik Çözücülerin Gravimetrik Özkütle Tayinleri

Özkütle hesaplamaları, gravimetrik yöntem kullanılarak üç tekrarlı olarak ölçüldü. Sonuçlar Tablo 23’de verilmiştir.

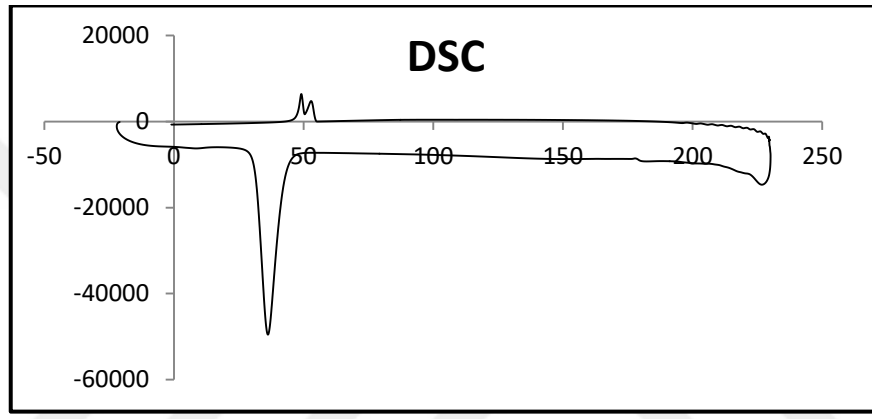
Tablo 23. Derin ötektik çözücülerin özkütle değerleri

Derin Ötektik Çözücü İsmi	Molar Oranlar	Özkütlesi (g/mL)
Sinamik Asit- Timol	1:9,1:10	0.86-0.86
Sinamik Asit - Mentol	1:6-1:10	0.89-0.89-0.89-0.90-0.90
Sinamik Asit - TBAB	1:5-1:10	0.82-0.83-0.83-0.84-0.84-0.85
1-Oktadekanol- Timol	1:3,1:5,1:8,1:10	0.95-0.95-0.95-0.96
1-Oktadekanol – Mentol	1:6-1:10	0.95-0.95-0.95-0.95
1-Hegzadekanol- Timol	1:1-1:8	0.93-0.93-0.94-0.94-0.94-0.94-0.95-0.95
1-Hegzadekanol- Mentol	1:1-1:7	0.94-0.94-0.94-0.95-0.95-0.95-0.95
Şiririk Asit – TBAB	1:7-1:10	Hesaplanamadı.
<i>p</i> -Kumarik Asit-Mentol	1:9-1:10	0.96-0.96
<i>p</i> -Kumarik Asit- TBAB	1:3-1:10	0.94-0.94-0.94-0.94-0.94-0.95-0.95-0.96

4.4.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analiz Sonuçları

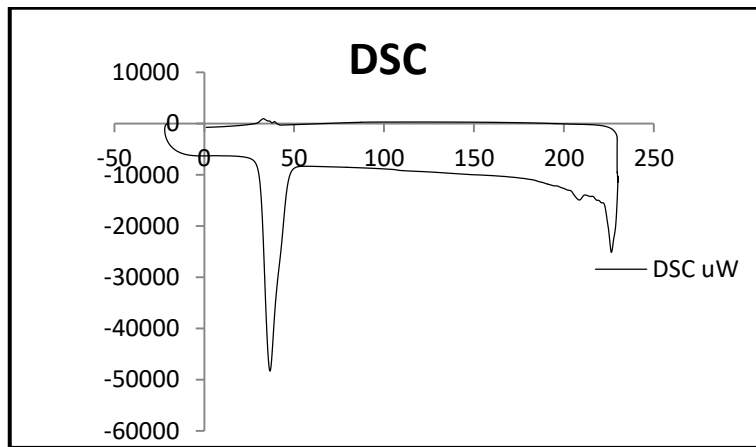
Sentezlenen ve çalışmalarda kullanılan DÖÇ'lerin termal özellikleri, bir Hitachi-7020 cihazı kullanılarak diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) ile 10 °C/dk ısıtma/soğutma hızında ölçülmüştür. Ölçülen DÖÇ'ler sırasıyla 1-oktadekanol/Timol, 1-hegzadekanol/Timol, *p*-kumarik asit/TBAB'dir.

1-oktadekanol/Timol karışımından oluşan DÖÇ'e ait DSC taraması Şekil 7'de gösterilmiştir.

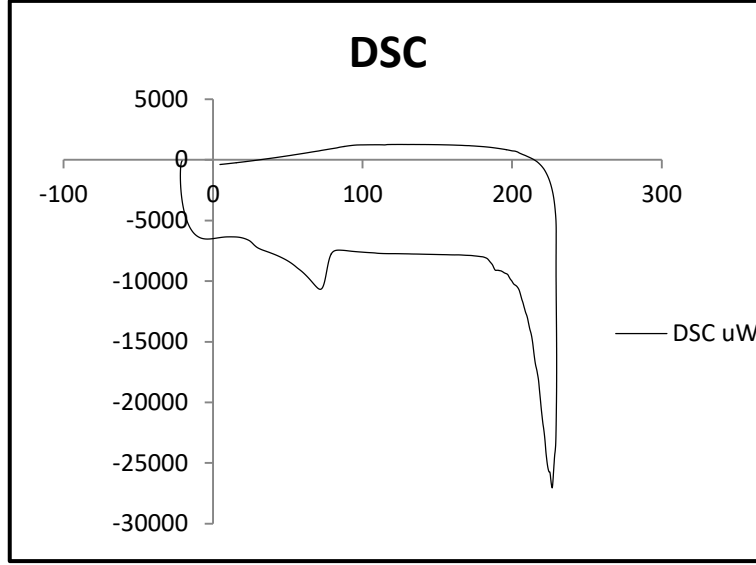


Şekil 7. 1-Oktadekanol/Timol karışımına ait DSC taraması

1-Hegzadekanol/Timol karışımından oluşan DÖÇ'e ait DSC taraması Şekil 8'de gösterilmiştir. . *p*-kumarik asit/TBAB karışımına ait DSC taraması Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 8. 1-Hegzadekanol/Timol karışımına ait DSC taraması



Şekil 9. *p*-kumarik asit/TBAB karışımına ait DSC taraması

4.5. Clevenger Ekstaksiyonundan Elde Edilen Yağların GC-MS Analiz Sonuçları

Bitkilerin clevenger ekstaksiyonu sonucu toplanan uçucu yağlar; yağ verimi *O. micranthum* için %0.19 ve *O. minutiflorum* için %0.21 olarak hesaplanmıştır. Bileşenlerin alikonma indeksleri literatür verileriyle karşılaştırılarak doğrulanmıştır.

4.5.1. *O. micranthum* Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları

Clevenger aparatının mikrodalga fırın ile kombine hale getirilmesiyle yapılan *O. micranthum* bitkisinin ekstraksiyon sonucu elde edilen uçucu yağ GC-MS analizine tabii tutulmuş ve elde edilen sonuçlar Tablo 24’de verilmiştir. Elde edilen deneysel retention indeksler ve alev iyonlaştırmalı dedektörde elde edilen % alan verileri eşleştirilerek sunulmuştur. % 85.5909 aydınlatılmıştır.

O. micranthum bitkisine uygulanan yöntemi sonucunda 20 uçucu yağ bileşeni saptanmıştır. Bunlar; 10 monoterpen, 9 monoterpenoid ve 1 adet diğer uçucu yağ türüdür.

Tablo 24. *O. micranthum* bitkisinin GC-MS analiz sonuçları

Bileşikler	Deney RI	%Alan
α Tjuhen	920	1.0288
α Pinen	925	1.2758
Kamfen	942	1.2526
Sabinen	968	0.9007
β -Pinen	974	0.5274
α -Terpinen	1016	6.3720
<i>p</i> -Simen	1024	1.6591
Limonen	1029	1.0394
Ökalyptol	1035	2.3524
γ -Terpinen	1062	10.6870
trans Sabinen hidrat	1072	2.5967
α -Terpineolen	1096	2.1984
Linalool	1105	1.7993
trans-Sabinol	1107	6.3873
Kamfor	1146	1.2708
Endo-Borneol	1184	2.8278
Terpinen-4 ol	1196	30.3160
α -Terpineol	1210	4.9480
Karvakrol	1316	2.5688
<i>m</i> -Asetanisol	1327	3.5826

4.5.2. *O. minutiflorum* Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları

O. minutiflorum bitkisinin ekstraksiyon sonucu elde edilen uçucu yağ GC-MS analizine tabii tutulmuş ve elde edilen sonuçlar Tablo 25’de verilmiştir. Elde edilen deneysel retention indeksler ve alev iyonlaştırmalı dedektörde elde edilen % alan verileri eşleştirilerek sunulmuştur ve % 88.4291’i aydınlatılmıştır.

Tablo 25. *O. minutiflorum* bitkisinin GC-MS analiz sonuçları

Bileşikler	Deney RI	%Alan
α Tjuhen	920	1.2773
α Pinen	925	1.5536
Kamfen	942	1.2809
Sabinen	968	2.2866
β -Pinen	974	0.8579
Mirsen	984	0.6313
2,3-dehidro ökaliptöl	989	0.5342
α -Terpinen	1016	2.5090
<i>p</i> -Simen	1024	1.2819
Limonen	1029	0.7821
β -Fellandren	1031	0.6446
Ökaliptol	1034	1.9627
γ -Terpinen	1062	5.3124
trans Sabinen hidrat	1072	1.5640
α -Terpineolen	1096	1.1069
Linalool	1105	13.8548
trans-Sabinol	1107	1.8316
Kamfor	1162	0.4498
Endo-Borneol	1184	2.3895
Terpinen-4 ol	1196	8.2174
α -Terpineol	1210	24.6102
Linalil asetat	1277	4.3083
Karvakrol	1316	2.4550
m-Asetanisol	1328	2.9441
Karyofilen	1472	1.6654
Germakren D	1540	0.5997
Bisiklogermakren	1557	1.5179

O. minutiflorum bitkisine uygulanan yöntem sonucunda 27 uçucu yağ bileşeni saptanmıştır. Bunlar; 12 monoterpen, 11 monoterpenoid, 3 seskiterpen ve 1 adet diğer uçucu yağ türüdür.

4.6. Ön Muamele Yapılan Bitkilerin GC-MS Analiz Sonuçları

Ön muameleye tabi tutulan bitkilerin clevenger ekstaksiyonu sonucu toplanan uçucu yağlar; yağ verimi *O. micranthum* için % 0.23 ve *O. minutiflorum* için % 0.22 olarak hesaplandı. Bileşenlerin alıkonma indeksleri literatür verileriyle karşılaştırılarak doğrulandı.

4.6.1. *O. micranthum* Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları

O. micranthum Bitkisinin yöntem sonucu elde edilen analiz sonucunda 52 adet uçucu bileşen tespit edilmiştir.

Tablo 26. Ön muamele yapılan *O. micranthum* bitkisinin GC-MS analiz sonuçları

Bileşikler	Deney RI	%Alan
α -Thujen	920	0.5380
α Pinen	926	0.4516
Kamfen	943	0.7774
Sabinen	969	0.6854
β -Pinen	975	0.5073
6,6-dimetil-hepta-2,4-dien	989	0.3146
α -Fellandren	1004	0.3937
(+)-2-Karen	1017	2.4786
o-Simen	1026	3.0929
p- Simen	1030	0.3996
β -Fellandren	1032	0.6446
Ökalyptol	1035	4.0284
γ -Terpinen	1064	4.8007
trans Sabinen hidrat	1075	5.9291
Δ -4-Karen	1097	1.4909
Linalool	1110	7.7025
trans-Sabinol	1113	8.3730
p-Ment-2-En-1-Ol	1135	0.6271
cis-p-2-Menten-1-Ol	1154	0.5270
Kamfor	1163	1.6190
Sabinaketon	1187	2.9811
5-izopropil-6-metil-hepta-3,5-dien-2-ol	1201	13.0195
Endo-borneol	1207	0.6870
Terpineol	1217	14.2297
p- Simen 8-ol	1231	0.4193
α -Terpinil asetat	1243	0.2781
p-Sineole	1248	0.6965
p-Menthane-1,2,3-Triol	1280	5.7724
2-Hidroksisineol	1299	0.6350
Hotrienil asetat	1332	3.4018
Karvil asetat	1336	0.2222
Karvenon	1355	0.2213
3,7-Dimetil-1,7-Oktadiene-3,6-Diol	1371	1.0220
Endobornil asetat	1388	0.2783
Karvatonaseton	1409	0.7815
2-Pentanoilfuran	1421	0.3864
4-Metil-7-Metiletil-3,8-dioksatisiklo[5.1.0(2-4)]oktan	1434	1.1619
Epoksiylinalol	1440-1451	0.2262
Miristaldehit	1448-	0.2508
Z-Karyofilen	1474-1467	2.6418
Germakren	1482--1485	0.0890
α -Humulen	1510-1455	0.0378
Alloaromadendren	1519-1461	0.2768
(-)-Spathulenol	1532	0.2108
γ -Kadinen	1576-1514	0.0890
Δ -Kadinen	1584-1523	0.0378
Spatulenol	1650-1578	0.6624
(-)-Karyofilen oksit	1658-1583	1.3106
Oplopenon	1684-1740	0.7404
4,4-dimetil-tetrasiklo[6.3.2.0e2,5.0e1,8]tridekan-9-ol	1715	0.4282
Epiglobulol	1737	0.2591
Stearil morfolin	1974	0.1511

O. micranthum bitkisine uygulanan yöntemi sonucunda 52 uçucu yağ bileşeni saptanmıştır. Bunlar; 12 monoterpen, 19 monoterpenoid, 5 seskiterpen, 6 seskiterpenoid ve 10 adet diğer uçucu yağ türüdür.

4.6.2. *O. minutiflorum* Bitkisinin GC-MS Analiz Sonuçları

O. minutiflorum bitkisinin yöntem sonucu elde edilen analiz sonucunda 58 adet uçucu bileşen tespit edilmiştir.

Tablo 27. Ön muamele yapılan *O. minutiflorum* bitkisinin GC-MS analiz sonuçları

Bileşikler	Deney RI	%Alan
α -Thujen	920	0.6768
α Pinen	926	0.8488
Kamfen	943	0.4225
Sabinen	969	1.1409
β -Pinen	975	0.5884
β -Mirsen	985	0.3350
4-Trimetilsilil-1-buten-3-in	989	0.3164
α -Terpinen	1017	0.9972
o-Simen	1026	1.4064
α -Fensen	1031	0.8074
Ökaliptol	1035	2.1608
γ -Terpinen	1064	2.9007
trans Sabinen hidrat	1075	8.3235
Δ -4-Karen	1097	0.8468
Linalool	1110	19.9608
trans-Sabinol	1113	1.6367
cis-2-Mentenol	1136	0.1622
cis-p-2-menten-1-ol	1154	0.1262
Kamfor	1163	0.5711
Endo-Borneol	1207	2.0358
(-)-4-Terpineol	1217	2.1580
α -Terpinil asetat	1243	22.7084
2-Asetoksi-1,8-sineol	1233	0.1297
Hidroksicineil asetat	1250	0.2795
Linalil asetat	1284	10.5428
2,6-Dimetil-1,7-octadien-3,6-diol	1300	0.1563
Karvotanacetone	1332	0.5060
Karvon	1332	2.0499
8-asetoksilinalool	1371	0.1788
Bisikloelemen	1377	0.4063
α -kubeben	1390	0.0544
Geraniol	1420	0.1469
(-)- β -elemene	1438	0.4363
α -Kopaen	1443	0.2302
Dodekanal	1449	0.0726
trans-Karyofilen	1474	4.4497
β -kubeben	1483	0.1384
(+)-Aromadendren	1495	0.3040
Germakren	1482	0.0882
α -Humulen	1510	0.2592
Kalaren	1520	0.2354

Tablo 27. (Devam)

γ -Murolen	1534	0.2685
Germakren-d	1542	1.0976
Bisiklogermakren	1561	2.6725
1(10),4-aromedenedradien	1570	0.0482
γ -kadinen	1576	0.4442
Δ -kadinen	1584	0.5681
α -kopaen	1595	0.0480
α -amorfene	1601	0.1104
Karyofilen Oksit	1658	0.0334
Spatulenol	1650	0.9559
(+)-Karyofilen Oksit	1659	0.6237
İzospatulenol	1684	0.0849
Butilen adipat	1708	0.1751
Leden	1752	0.0974
Karotol	1777	0.0993
Hegzahidrofarnesil aseton	1929	0.0712
Ftalik asit	1960	0.1301
Stearilmorfolin	1974	0.2685

O. minutiflorum bitkisine uygulanan yöntemi sonucunda 58 uçucu yağ bileşeni saptanmıştır. Bunlar; 11 monoterpen, 17 monoterpenoid, 15 seskiterpen, 9 seskiterpenoid ve 6 adet diğer uçucu yağ türüdür

Tablo 28. *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerinin kimyasal sınıf dağılımı

Bitkiler	<i>O. micranthum</i>				<i>O. minutiflorum</i>			
	MW		Ö-MW		MW		Ö-MW	
	Bileşik Sınıfı	%	Bileşik Sayısı	%	Bileşik Sınıfı	%	Bileşik Sayısı	%
Monoterpen			10		12		11	
Monoterpenoid			9		11		17	
Seskiterpen			-		3		15	
Seskiterpenoid			-		-		9	
Diğerleri			1		1		6	

Tablo 29. Bileşik sınıfı ve türlere göre % dağılımı

Ana türlere ait % değerleri ve ana bileşenlere ait % değerleri					
Kimyasal Tür Bitki Türü	Monoterpen	Monoterpenoid	Seskiterpen	Seskiterpenoid	Diğer
<i>O. micranthum</i>	33.3285	46.6798	-	-	3.5826
Major Bileşeni	γ -Terpinen (% 10.6870)	Terpinen-4-ol (%30.3160),	-	-	m-Asetanisol (%3.5826)
<i>O. minutiflorum</i>	21.3561	60.3459	3.7830	-	2.9441
Major Bileşeni	γ -Terpinen (%5.3124)	α -Terpineol (%24.6102)	Karyofilen (%1.6654)	-	m-Asetaniso (2.9441)
Önmuamele <i>O. micranthum</i>	24.6337	44.8631	2.8954	3.4601	19.1129
Major Bileşeni	γ -Terpinen (4.4807)	Terpineol (14.2297)	trans Karyofilen (2.6418)	Karyofilen oksit (1.3106)	5-Izopropil-6- metil-hepta- 3,5-dien-2-ol (13.0195)
Önmuamele <i>O. minutiflorum</i>	13.0208	71.6272	11.3266	2.4276	1.1902
Major Bileşeni	γ -Terpinen (2.9007)	α -Terpinil asetat (22.7084)	trans- karyofilen (4.4497)	Karyofilen oksit (0.6237)	4-trimetilsilil- 1-buten-3-in (0.3164)

4.7. Validasyon Parametreleri

4.7.1. Sistem Uygunluğu

Fenolik bileşikler içeren 2.5µg/mL’lik standart çözelti 5 tekrarlı injeksiyon ile sistem uygunluk testi için yürütülmüştür. Kuyruklanma faktörü, ayırma gücü ve injeksiyon kesinliği Tablo 30 ‘de sunulmuştur.

Kuyruklanma faktörü (T), pik yüksekliğinin %5’indeki pik genişliği üzerinden hesaplanır.

$$T = W_{0.05}/2f \quad (\text{Eşitlik 54})$$

Tablo 30. Fenolik bileşikler için bulunan sistem uygunluk parametreleri

Fenolik Bileşikler	Alıkonma Zamanı K_A	Kuyruklanma Faktörü T	Kapasite Faktörü k	Enjeksiyon Kesinliği BSS (t_R)
<i>p</i> -OH Benzoik	3.844	1.52	2.5593	0.61
Vanilik	4.641	1.44	3.2972	0.45
Siringik asit	5.081	1.48	3.7046	0.58
<i>p</i> -Kumarik	5.489	1.51	4.0824	0.63
Sinapik Asit	6.576	1.60	5.0889	0.52
Benzoik Asit	8.448	1.44	6.8222	0.64
Kersetin	13.612	1.55	11.6037	0.81

4.7.2. Doğrusallık

Yöntem doğrusallığının belirlenmesi için kromatogramdan alınan pik alanlarının kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Korelasyon katsayıları üzerinden doğrusallık değerlendirilmesi yapılmıştır. Doğrusallığa ait veriler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 31. Fenolik bileşikler için kalibrasyon parametreleri

Fenolik Bileşikler	Korelasyon katsayısı r	Çalışma Aralığı
<i>p</i> -OH Benzoik	0.9998	5 µg/L-100 µg/L
Vanilik	0.9994	5 µg/L-100 µg/L
Siringaldehit	0.9995	5 µg/L-100 µg/L
<i>p</i> -Kumarik	0.9999	5 µg/L-100 µg/L
Sinapik Asit	0.0998	5 µg/L-100 µg/L
Benzoik Asit	0.0998	5 µg/L-100 µg/L
Kersetin	0.0998	5 µg/L-100 µg/L

4.7.3. LOD ve LOQ

En düşük konsantrasyon seviyesi LOQ olarak belirlenmiştir. LOD değerleri de bu eğriden elde edilen eğim (m) ve standart sapması (SS) kullanılarak hesaplanmıştır..

Tablo 32.Fenolik bileşikler için LOD ve LOQ değerleri

Fenolik Bileşikler	LOD	LOQ
<i>p</i> -OH Benzoik	0.05	0.17
Vanilik	0.08	0.26
Siringaldehit	0.20	0.65
<i>p</i> -Kumarik	0.07	0.22
Sinapik Asit	0.25	0.78
Benzoik Asit	0.23	0.71
Kersetin	0.09	0.27

4.7.4. Geri Kazanım ve Kesinlik

Analitlerin geri kazanımı belirlemek için üç farklı konsantrasyonda (5, 25 ve 50 µg/L) kalite kontrol örnekleri çözeltileri hazırlandı ve üç tekrarlı şekilde uygulandı. Hesaplanan % geri kazanımlar aşağıdaki tabloda verilmiştir

Tablo 33. Fenolik bileşikler için geri kazanım değerleri ve seçicilik parametreleri

Fenolik Bileşikler	5	25	50	RT%BSS	RT%BSS	A%BSS	A%BSS
				Gün içi	Gün arası	Gün içi	Gün arası
<i>p</i> -OH							
Benzoik	101.0±0.25	100.0±0.55	99.5.5±0.52	0.14	0.18	0.62	1.19
Vanilik	100.7±0.27	102.2±1.24	102.1±2.05	0.12	0.22	0.51	0.79
Siringaldehit	100.2±1.04	100.9±1.04	99.6.2±1.75	0.03	0.16	0.45	0.82
<i>p</i> -Kumarik	99.3±1.95	99.3.0±1.95	99.5.0±0.21	0.05	0.05	0.26	0.50
Sinapik Asit	102.3±1.97	98.9±1.97	98.3±0.15	0.16	0.41	0.65	0.78
Benzoik							
Asit	102.2±0.21	98.8±0.92	98.2±0.92	0.05	0.10	0.63	0.98
Kersetin	98.9±0.46	99.9±0.69	100.4.9±0.46	0.02	0.08	0.25	0.65

4.7.5. Seçicilik

Yöntem seçiciliği, standart tepe noktaları arasındaki çözünürlüğü analiz edilerek değerlendirildi. Fenolik bileşikler, aynı HPLC koşulları kullanılarak belirlendi. Numune pikleri, bilinen fenolik standartların alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak tespit edildi. Metodun tekrarlanabilirliğini doğrulamak için metanolik ekstrakt üç kopya halinde çalıştırıldı ve değerler bitki konsantrasyonlarının ortalama ve standart sapması olarak ifade edildi (Tablo33).

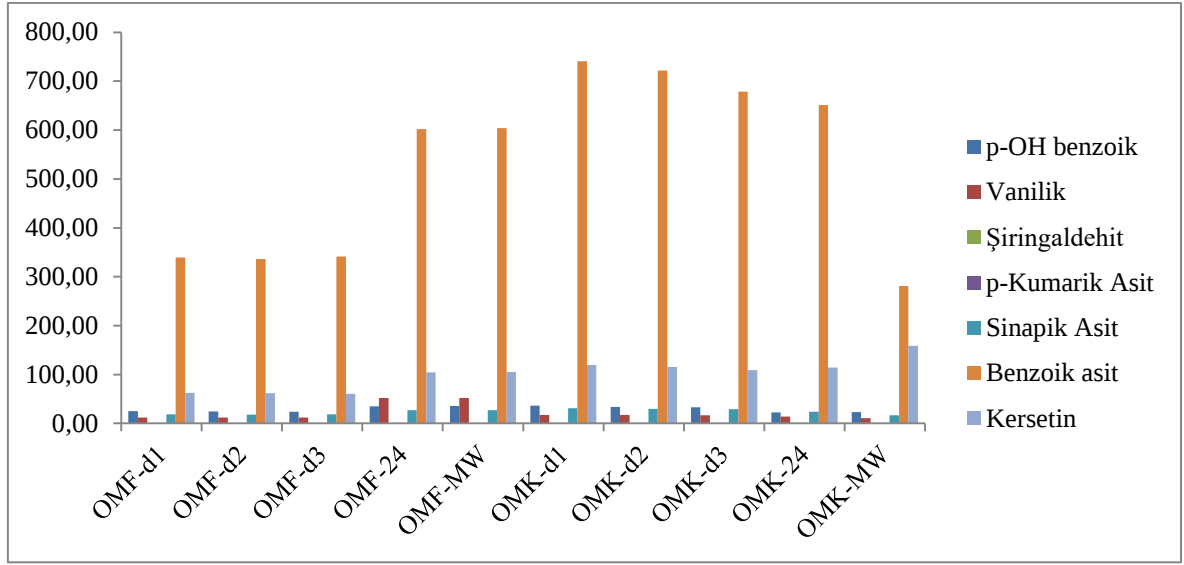
4.7.6. Gerçek Numunelerde Fenolik Bileşik Analizleri

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen ekstraktlar 24 saat klasik yöntemle metanol ekstraktı, Mikrodalga yöntem kullanılarak elde edilen metanol ekstraktı ve 3 farklı DÖÇ kullanılarak elde edilen DSSME örneklerinden oluşmaktadır. Valide edilen HPLC yöntemi ile analizler yapılmış ve sonuçlar $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cinsinden Tablo 34’ de verilmiştir.

Tablo 34. Bitki örneklerine ait fenolik bileşen analiz sonuçları

	OMF-d1	OMF-d2	OMF-d3	OMF-24	OMF-MW	OMK-d1	OMK-d2	OMK-d3	OMK-24	OMK-MW
<i>p</i> -OH benzoik	5.20	4.74	3.71	4.77	5.48	6.40	3.87	3.25	2.52	3.04
Vanilik	2.07	2.09	2.26	2.01	2.35	7.25	7.49	6.81	4.34	1.04
Şiringik A.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.86	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>p</i> -Kumarik Asit	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.11	0.00	0.00	0.00	0.00
Sinapik Asit	8.49	8.31	8.40	7.13	7.40	1.05	9.90	9.36	3.92	6.71
Benzoik asit	39.55	35.90	41.31	02.24	03.97	40.81	21.70	78.34	51.30	81.21
Kersetin	2.65	1.70	0.35	04.12	05.19	19.69	15.53	09.23	14.49	58.76

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkilerine ait fenolik bileşiklere ait bağıl bolluk durumunu gösteren sütun grafiği Şekil 10’da verilmiştir.



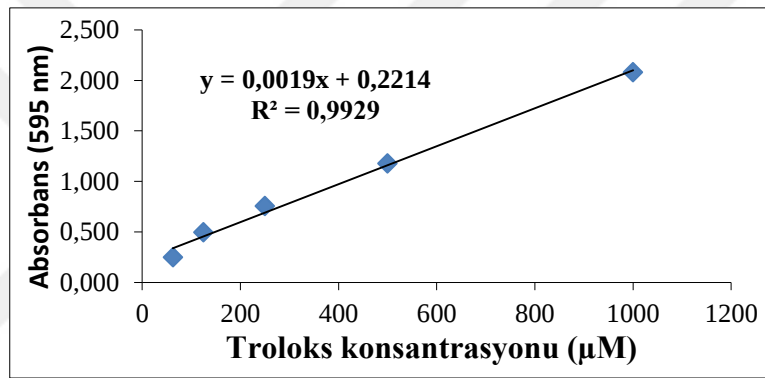
Şekil 10. Bitki örneklerine ait fenolik asitler ve bağıl bollukları

4.8. Antioksidan Aktivite Sonuçları

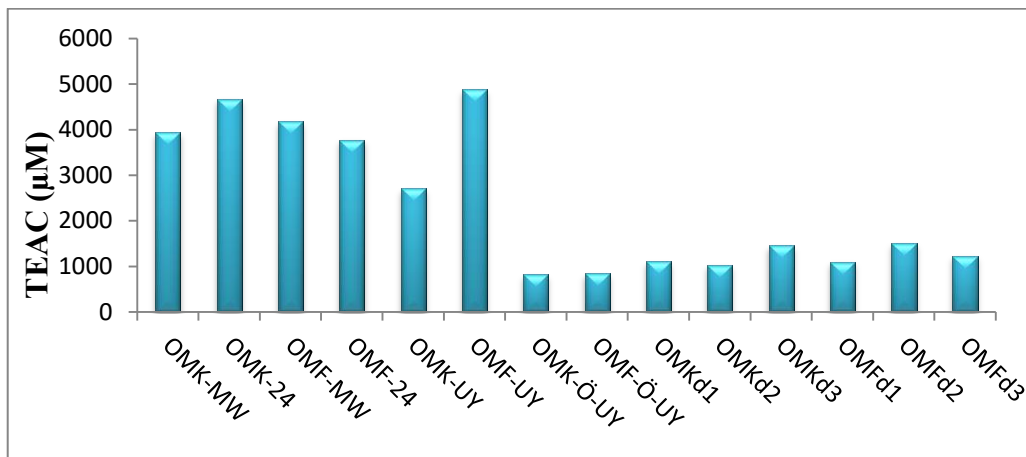
Çalışmada kullanılan *Origanum* türlerinden elde edilen tüm örneklerin antioksidan özelliklerin belirlenmesi için CUPRAC, FRAP ve DPPH yöntemleri kullanılmıştır.

4.8.1. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Sonuçları

Tez kapsamında çalışılan *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen ekstrelerin CUPRAC tayinleri için standart madde olarak Troloks kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi troloks'a karşı elde edilen sonuçlar ile çizilmiştir. Ekstrelerin ve uçucu yağların CUPRAC değeri troloks ile karşılaştırılıp Troloks eşdeğeri TEAC(μM) olarak hesaplanmıştır. CUPRAC tayinine ait kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.



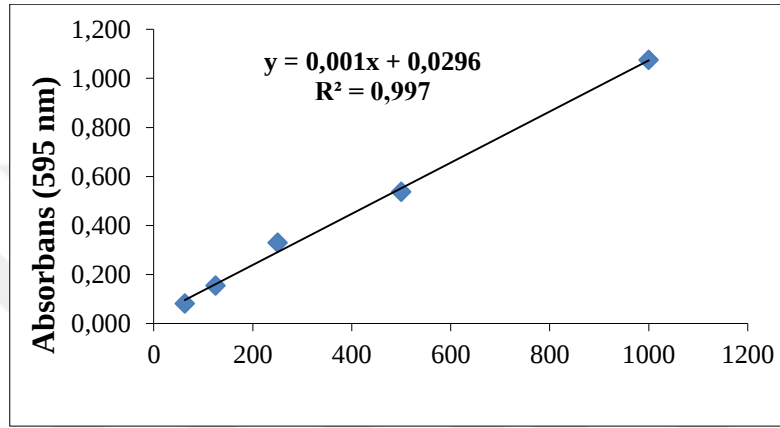
Şekil 11. CUPRAC tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği



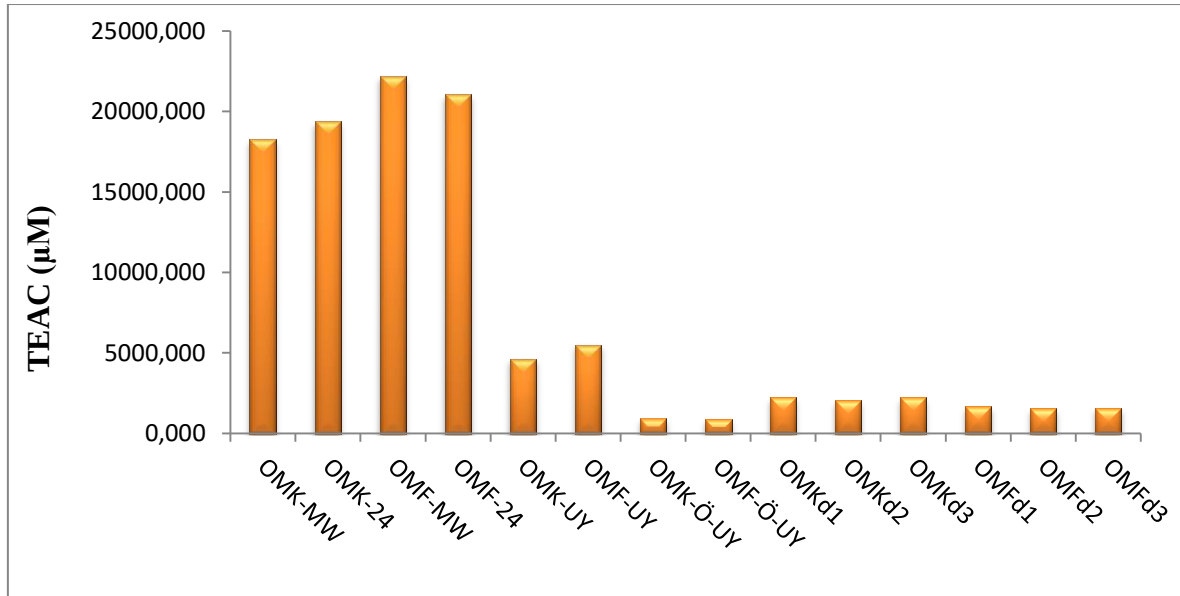
Şekil 12. *Origanum* türlerine ait ekstrelerin CUPRAC tayini sonuçlarının karşılaştırılması

4.8.2. Ferrik İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Sonuçları

Tez kapsamında çalışılan *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen ekstrelerin FRAP tayinleri için standart madde olarak Troloks kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisi troloks'a karşı elde edilen sonuçlar ile çizilmiştir. Ekstrelerin ve uçucu yağların FRAP değeri troloks ile karşılaştırılıp Troloks eşdeğeri TEAC(μM) olarak hesaplanmıştır. FRAP tayinine ait kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.



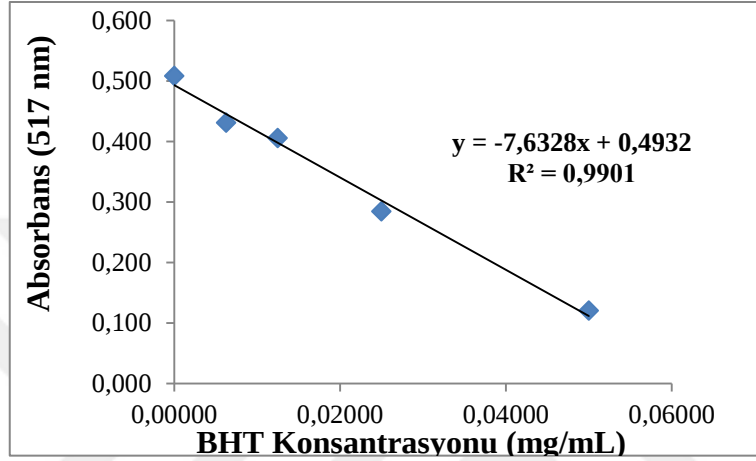
Şekil 13. FRAP tayininde kullanılan troloks'a ait kalibrasyon grafiği



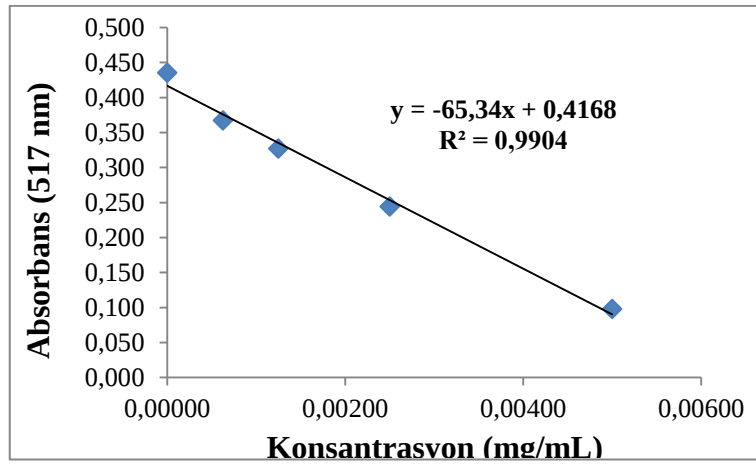
Şekil 14. Origanum türlerine ait ekstrelerin FRAP tayini sonuçlarının karşılaştırılması

4.8.3. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Sonuçları

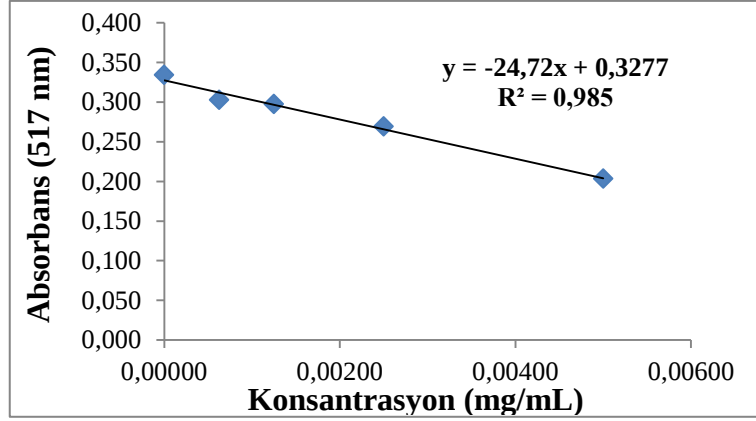
517 nm dalga boyunda yapılan spektroskopik yöntem sonucu elde edilen veriler aşağıda verilmiştir. Standart olarak BHT kullanılmış ve *Origanum* türlerinden elde edilen uçucu yağlar ve ekstraktların karşılaştırılması SC₅₀ değeri olarak verilmiştir. BHT standartına ait kalibrasyon grafiği aşağıda verilmiştir.



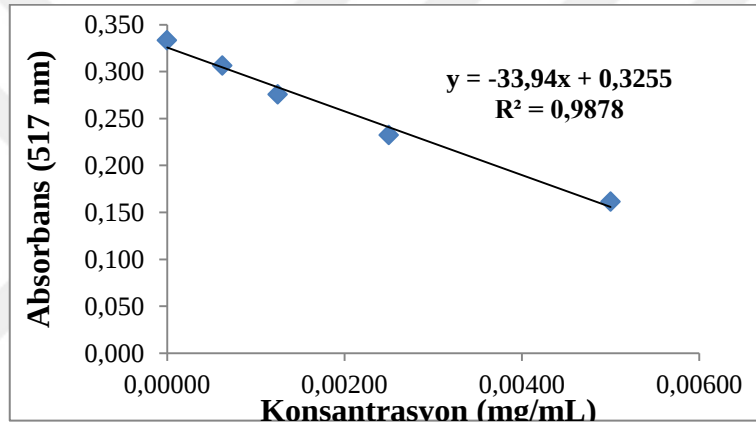
Şekil 15.DPPH tayininde kullanılan BHT'ye ait kalibrasyon grafiği



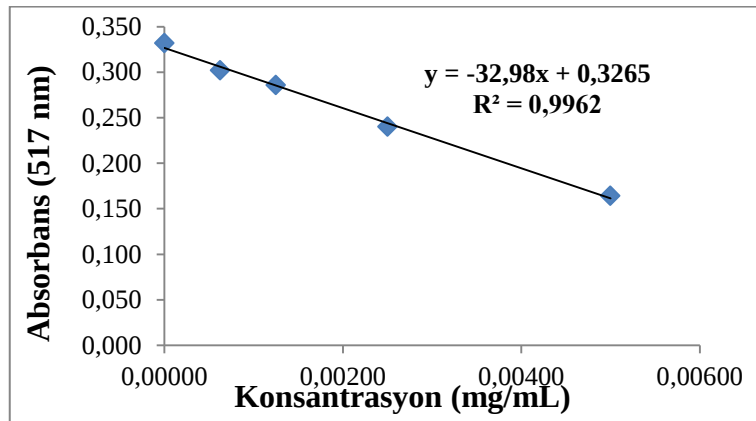
Şekil 16.OMK-MW DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



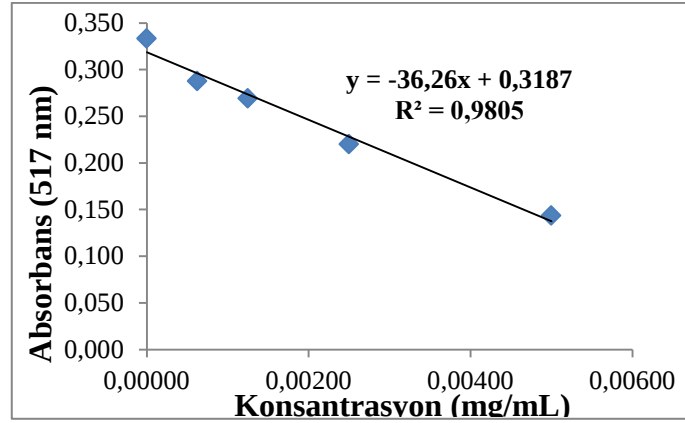
Şekil 17.OMK-24 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



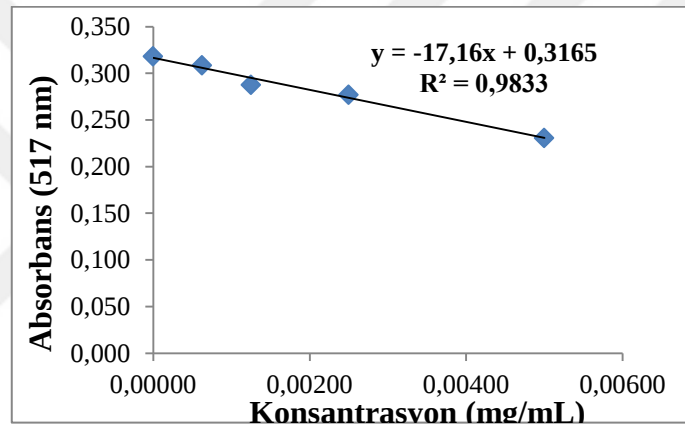
Şekil 18. OMF-MW DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



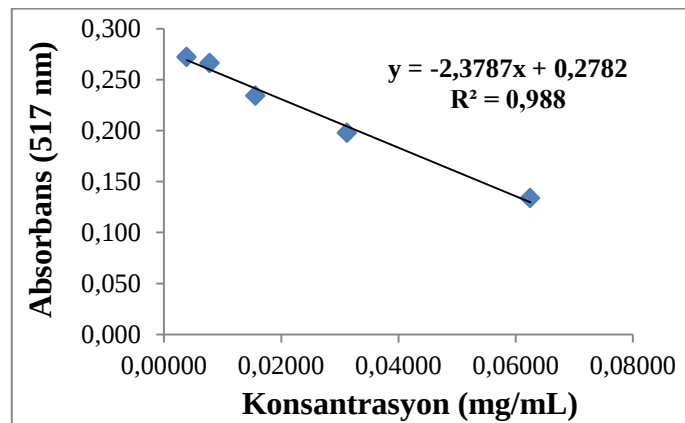
Şekil 19. OMK-24 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



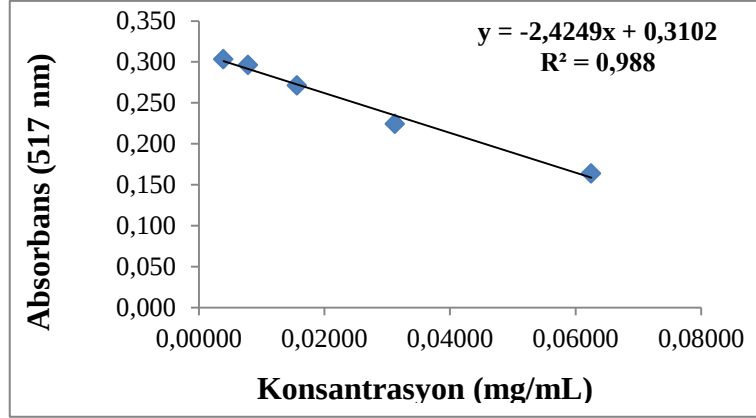
Şekil 20. OMK-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



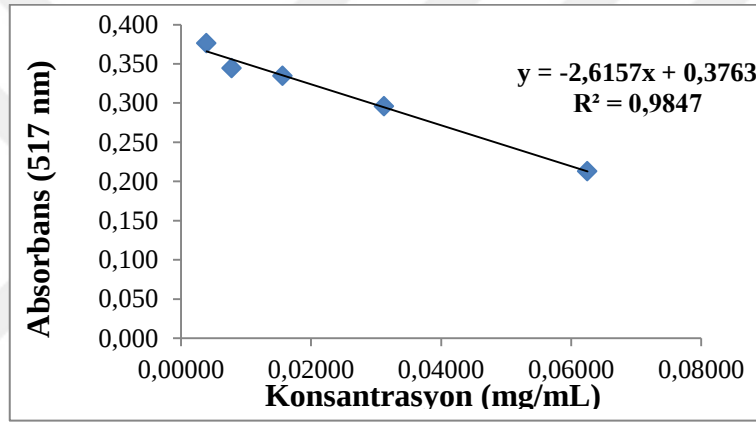
Şekil 21. OMF-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



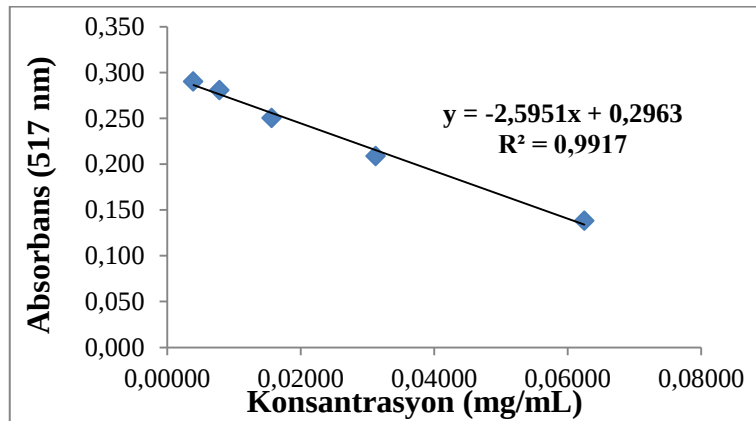
Şekil 22. OMK-Ö-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



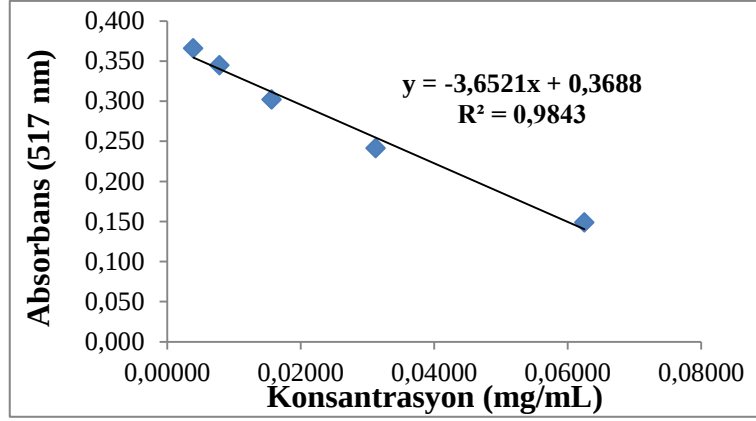
Şekil 23. OMF-Ö-UY DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



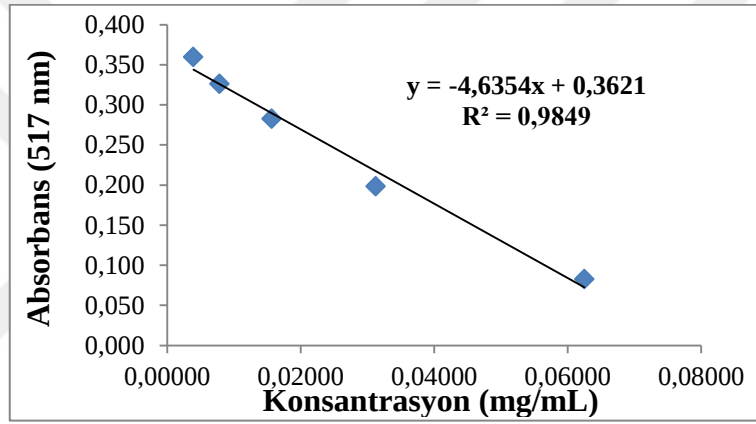
Şekil 24. OMK-d1 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



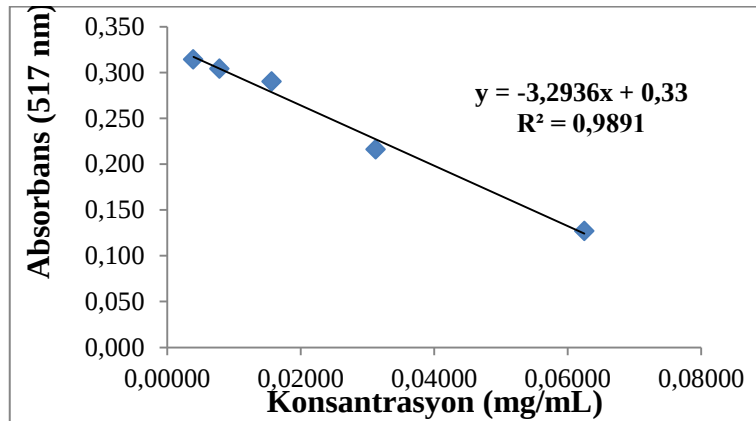
Şekil 25. OMK-d2 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



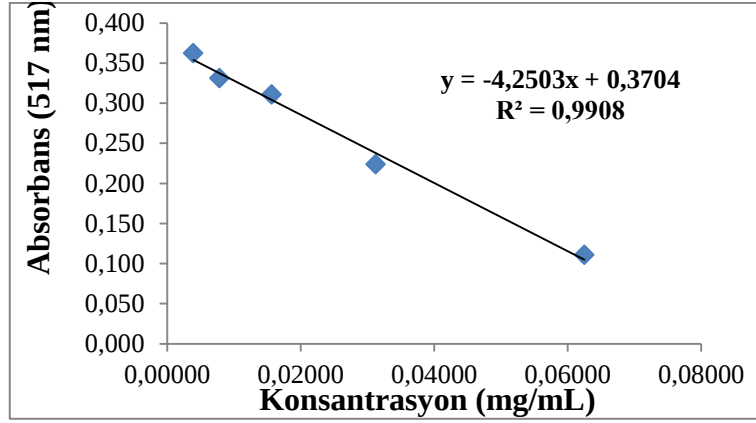
Şekil 26. OMK-d3 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



Şekil 27. OMF-d1 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu

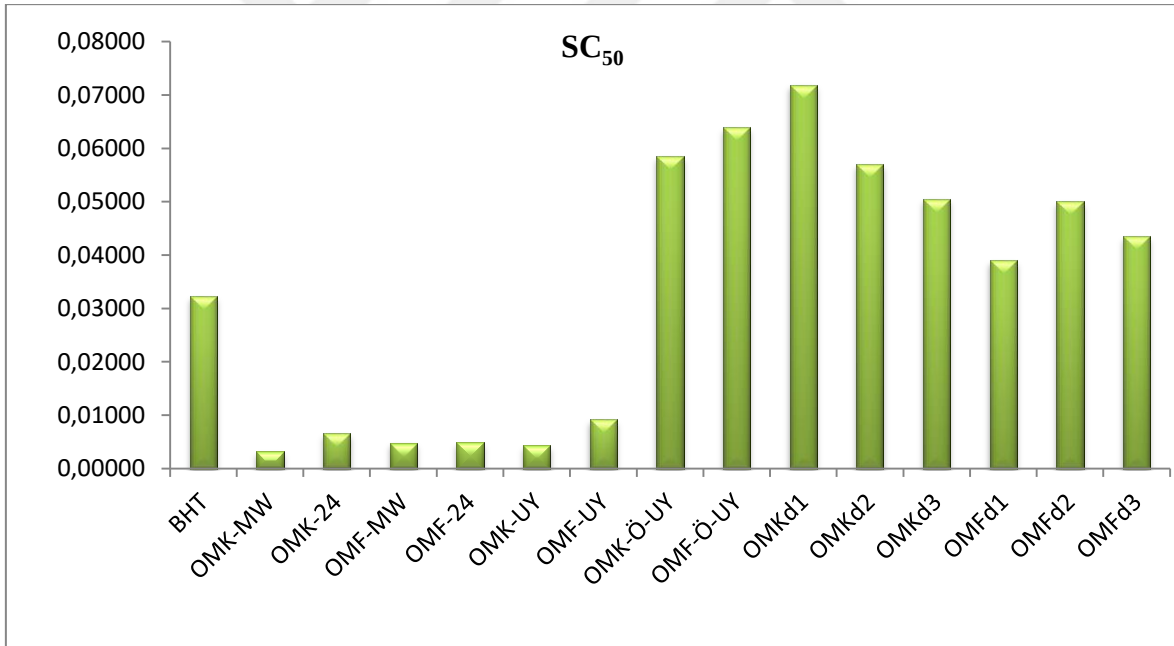


Şekil 28. OMF-d2 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu



Şekil 29. OMF-d3 DPPH radikali süpürme aktivitesi sonucu

Şekil 30'da *Origanum* türlerine ait ekstrelerin DPPH tayini sonuçlarının karşılaştırılmalı sonuçları verilmiştir.



Şekil 30. *Origanum* türlerine ait ekstrelerin DPPH tayini sonuç karşılaştırılması

4.9. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Kullanılan iki *Origanum* türünden elde edilen uçucu yağlar ve ekstrelere ait antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesi için patojen özellikli 1 mantar ve 4 bakteri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.9.1. Agar Kuyucuk Difüzyon Testi Sonuçları

Türlerden elde edilen ekstreler ve uçucu yağlara ait inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçülerek mm olarak kaydedilmiştir. Standart çözücü olarak hem hekzan hem de metanol için inhibisyon zonu ölçülmüş örneklere ait zon çaplarından çıkarılarak sonuçlar verilmiştir.

Tablo 35. Agar kuyucuk metodu ile tespit edilen zon çapları

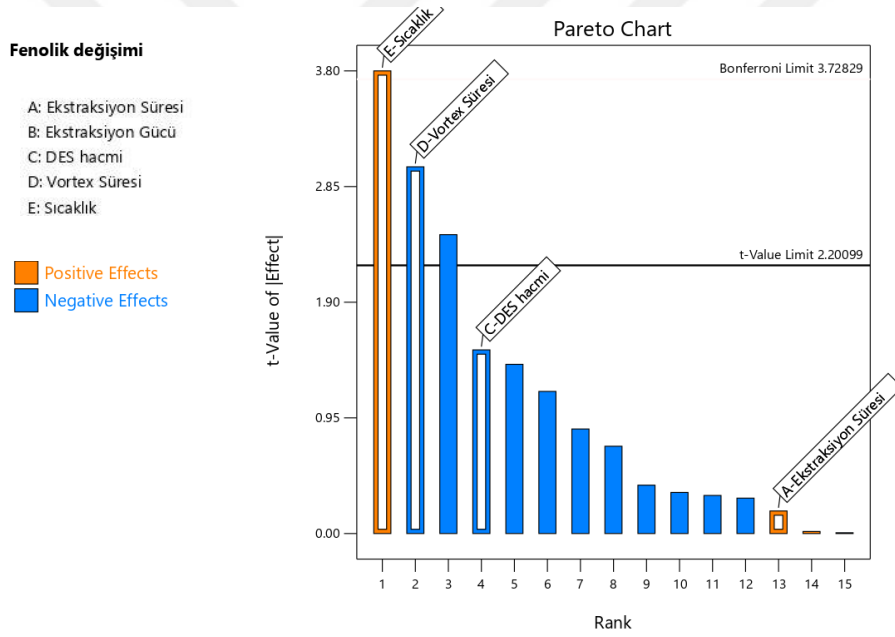
Türler	Bc	Ec	Sa	Se	Ca
döç1	25.0 ± 1.5	23.0 ± 0.9	25.0±1.4	25.5±0.7	36.0±2.1
döç2	20.0 ± 1.0	18.0 ± 1.1	24.0±1.4	23.0±1.4	30.5±0.7
döç3	24.0 ± 0.8	23.0 ± 1.0	18.5 ± 0.7	24.0±1.1	30.5±1.0
OMK24	7.0 ± 0.7	n.d.	10.5 ± 0.6	4.5±0.7	14.0±0.9
OMK M	5.0 ± 0.2	n.d.	5.5 ± 0.7	4.5±0.7	10.5±0.7
OMK d1	21.0 ± 1.5	18.0 ± 1.1	18.5 ± 1.0	26.5±2.1	35.0±3.2
OMK d2	21.0 ± 1.0	26.0 ± 1.4	25.5 ± 1.5	25.5±0.6	34.5±0.7
OMK d3	22.0 ± 0.9	24.5 ± 1.0	32.0 ± 2.8	21.5±0.7	34.5±1.1
OMF24	4.0 ± 0.2	n.d.	5.5±0.7	3.5±0.3	n.d.
OMF M	6.0 ± 0.2	n.d.	6.0±1.4	6.0±1.5	n.d.
OMF d1	17.5 ± 1.1	20.0 ± 1.0	25.0±1.6	21.5±0.8	36.0±2.9
OMF d2	19.0 ± 1.5	18.0 ± 1.1	23.0±1.9	22.0±2.8	34.5±0.8
OMF d3	22.0 ± 1.2	21.0 ± 1.0	28.5±2.1	28.0±2.0	34.0±1.4
OMK-UY*	31.0 ± 1.2	31.0 ± 1.5	34.5±0.7	25.5±1.5	36.5±0.7
OMF-UY*	33.0 ± 1.0	32.0 ± 1.4	34.5±1.0	34.0±1.4	38.5±0.5
OMK Ö-UY*	34.0 ± 0.8	33.0 ± 1.1	42.0±1.4	29.5±0.8	43.0±1.4
OMF Ö-UY*	31.0 ± 1.0	31.0 ± 0.8	33.5±2.5	29.5±0.7	44.5±0.9
Ampisilin	15	10	35	3	n.d.
Flukonazol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25

*ile işaretli 0.5 mL hekzan ile çözündürülmüştür. Diğerleri 0.5 mL metanol eklenerek çözündürülmüştür.
, Ca: *C. albicans*, Sa: *S. aureus* Bc: *B. cereus*, Se: *S. epidermis* ve Ec: *E. coli*

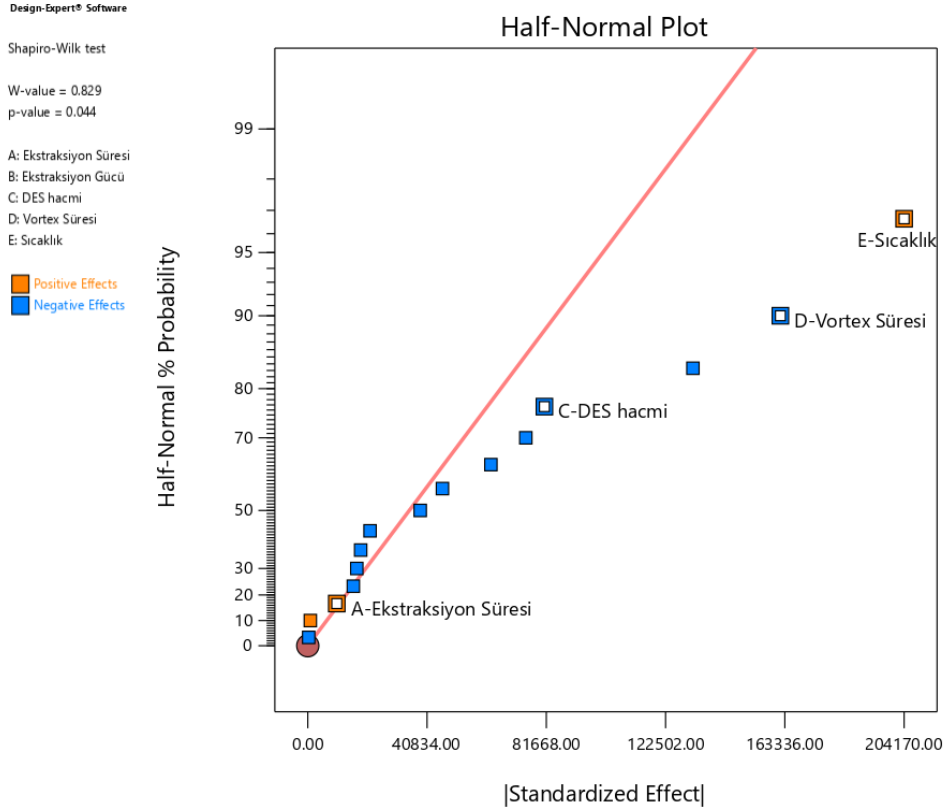
4.10. Fraksiyonel Faktöriyel Analiz Sonuçları

2 seviyeli 6 parametre üzerinde yapılan fraksiyonel faktöriyel dizayn ile en çok etkiye sahip olan parametreleri belirlemek için 32 ayrı rastgele yürütme gerçekleştirildi. Ekstraksiyon sürecine etki eden parametreleri belirlemek için deney tasarımı oluşturuldu ve sonuçlar Design Expert 11.1.2 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak değerlendirildi. Ekstraksiyon sürecine en çok etki eden parametreler DÖÇ hacmi, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık olarak tespit edildi. Fenolik asit olarak *p*-OH Benzoik asit' e ait % alan verileri sisteme cevap olarak girildi.

Elde edilen pareto grafiği en çok etkiye sahip faktörleri ve etki etme seviyelerini vermektedir. Parametre ve etki seviyeleri Resim 42'de verilmiştir.



Resim 42. Faktörlerin Pareto Çizelgesi



Resim 43. Shapiro-Wilk test grafiği

Eğim çizgisi üzerinin haricinde bulunan her nokta etkili olan faktörleri temsil etmektedir. Kırmızı çizginin dışındaki her nokta istatistiksel olarak anlamlı sonuç verenler grubuna dahil edilir.

Tablo 36. Faktöriyel tasarım ANOVA verileri

Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Model	2.981E ⁺¹¹	7.453E ⁺¹⁰	6.44	0.0064	Anlamlı
A-Ekstraksiyon Süresi	3.947E ⁺⁰⁸	3.947E ⁺⁰⁸	0.0341	0.8568	
C-DES hacmi	2.626E ⁺¹⁰	2.626E ⁺¹⁰	2.27	0.1601	
D-Vortex Süresi	1.047E ⁺¹¹	1.047E ⁺¹¹	9.05	0.0119	
E-Sıcaklık	1.667E ⁺¹¹	1.667E ⁺¹¹	14.41	0.0030	
Kalan	1.273E ⁺¹¹	1.157E ⁺¹⁰			
Kor Total	4.254E ⁺¹¹				
R²	0.7008	CV %	23.91	Std.Sapma	1.076E ⁺⁵

4.11.Box- Behnken Optimizasyonu

Merkez noktada 3 tekrarlı 3 parametre için rastgele sırayla toplam 15 deney gerçekleştirilmiştir ve verilere çoklu regresyon analizi uygulanmıştır. Modeli istatistiksel olarak değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Azaltılmış ANOVA karesel model verileri Tablo 36’da gösterilmiştir. *p*-OH benzoik asit fenolik analiz sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Minimum hacimde *p*-OH asit cevabı merkez noktada ve maksimum hacimdeki cevap Resim 44, Resim 45 ve Resim 46’da sırası ile gösterilmiştir.

Tablo 37. Box-Behnken ANOVA karesel model verileri

Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama Kare	F-değeri	p-değeri	
Model	2859.65	357.46	26.76	0.0004	Anlamlı
A-Sıcaklık	17.70	17.70	1.33	0.0935	
B-Hacim	221.55	221.55	16.58	0.0066	
C-Süre	578.00	578.00	43.27	0.0006	
AC	462.25	462.25	34.60	0.0011	
BC	240.25	240.25	17.98	0.0054	
A ²	737.98	737.98	55.24	0.0003	
B ²	686.70	686.70	51.40	0.0004	
C ²	62.45	62.45	4.67	0.0739	
Kalan	80.15	13.36			
Uyum Eksikliği	80.15	20.04			
Saf Hata	0.0004	0.001			
Kor Toplam	2939.81				
R²	0.9727	CV %	5.08	Std.Sapma	3.66

Factor Coding: Actual

3D Surface

p-OH Benz

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

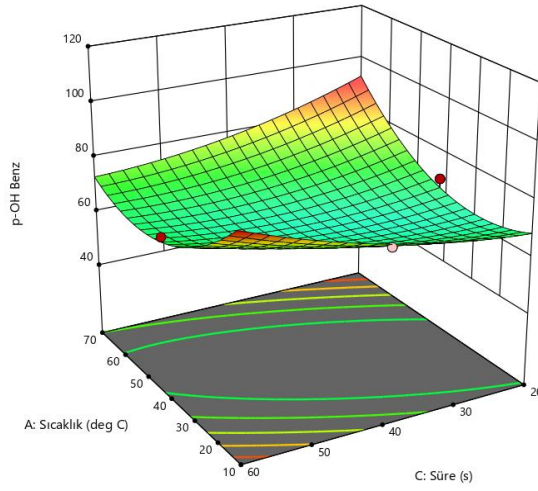
50  91.1

X1 = A

X2 = C

Actual Factor

B = 100



Resim 44. Hacim minimum noktada *p*-OH model diyagramı

Factor Coding: Actual

3D Surface

p-OH Benz

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

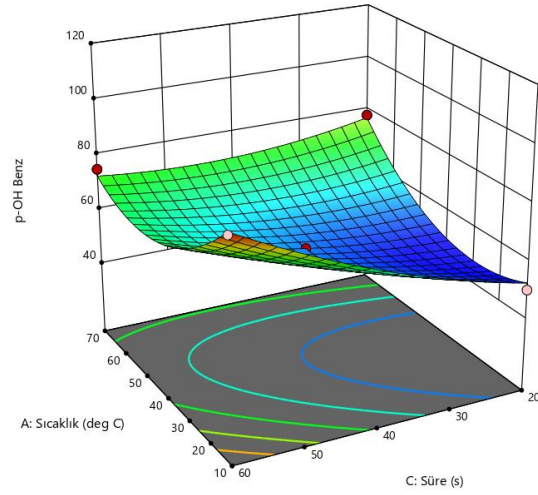
50  91.1

X1 = A

X2 = C

Actual Factor

B = 125



Resim 45. Hacim merkez noktada *p*-OH model diyagramı

Factor Coding: Actual

3D Surface

p-OH Benz

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

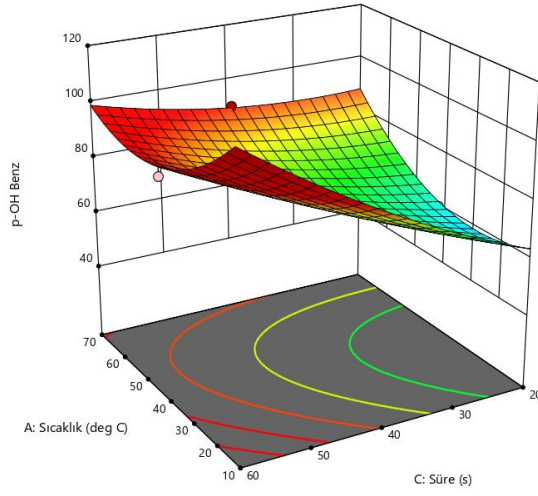
50 91.1

X1 = A

X2 = C

Actual Factor

B = 150



Resim 46. Hacim maksimum noktada *p*-OH model diyagramı

Factor Coding: Actual

Interaction

p-OH Benz

● Design Points

--- 95% CI Bands

X1 = A

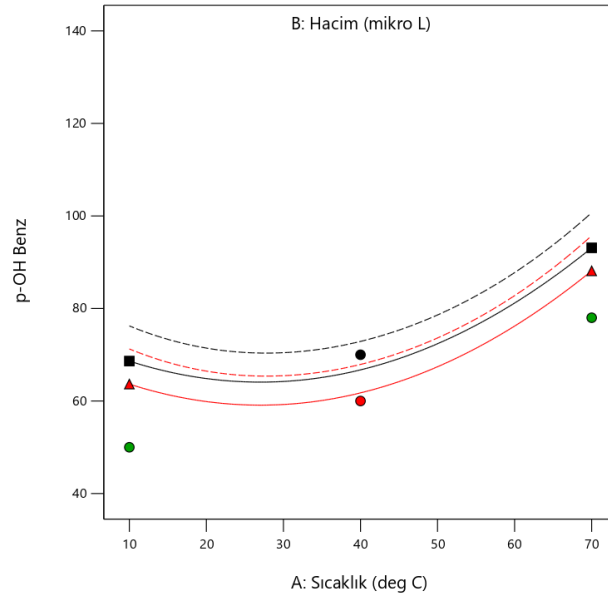
X2 = B

Actual Factor

C = 20

■ B- 100

▲ B+ 150



Resim 47. Süre faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği

Factor Coding: Actual

p-OH Benz

● Design Points

--- -95% CI Bands

X1 = A

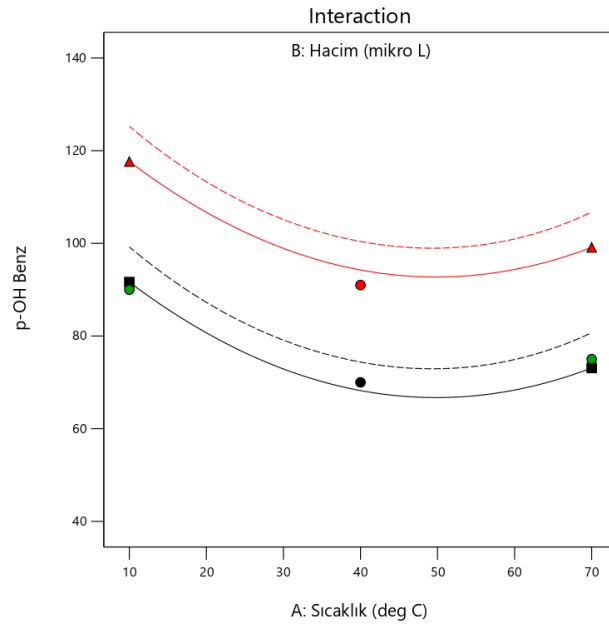
X2 = B

Actual Factor

C = 60

■ B- 100

▲ B+ 150



Resim 48. Süre faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği

Factor Coding: Actual

p-OH Benz

● Design Points

--- -95% CI Bands

X1 = A

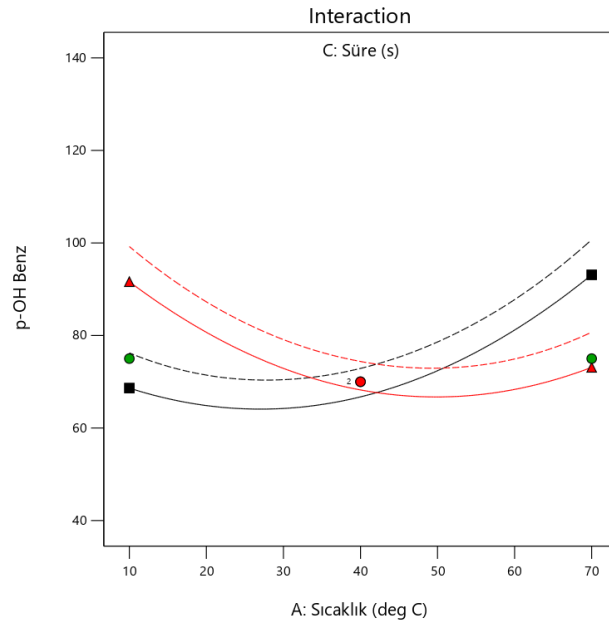
X2 = C

Actual Factor

B = 100

■ C- 20

▲ C+ 60



Resim 49. Hacim faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği

Factor Coding: Actual

p-OH Benz

● Design Points

--- 95% CI Bands

X1 = A

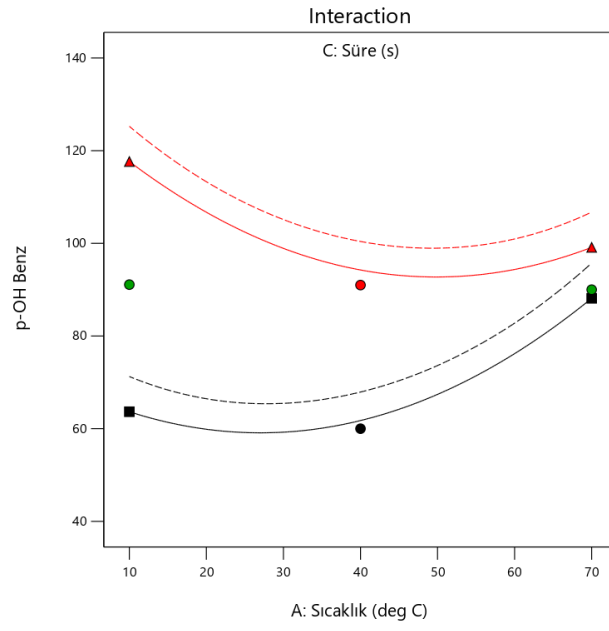
X2 = C

Actual Factor

B = 150

■ C- 20

▲ C+ 60



Resim 50. Hacim faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği

Factor Coding: Actual

p-OH Benz

● Design Points

--- 95% CI Bands

X1 = B

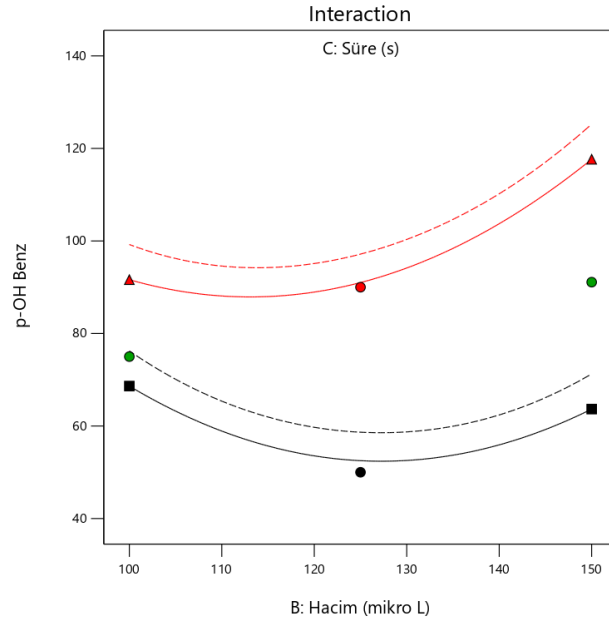
X2 = C

Actual Factor

A = 10

■ C- 20

▲ C+ 60



Resim 51. Sıcaklık faktörü minimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği

Factor Coding: Actual

p-OH Benz

● Design Points

--- -95% CI Bands

X1 = B

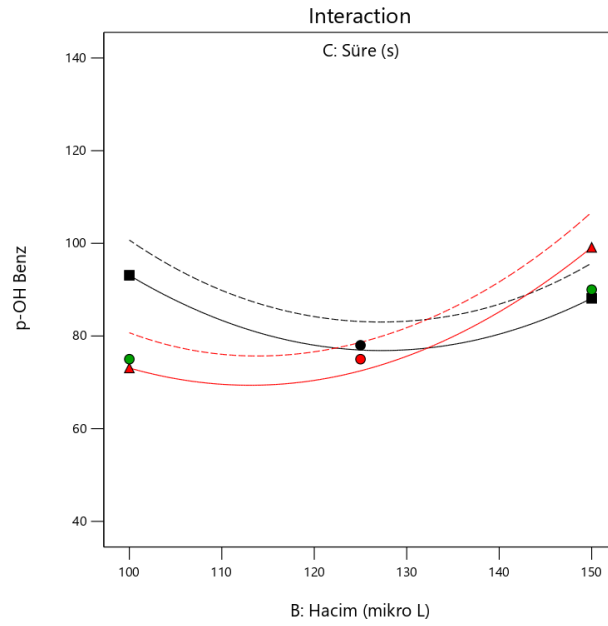
X2 = C

Actual Factor

A = 70

■ C- 20

▲ C+ 60



Resim 52. Sıcaklık faktörü maksimum olduğunda parametreler arası etkileşim grafiği

Tablo 38. Box-Behnken optimizasyonu p değerleri tablosu

	A	B	C	AB	AC	BC	A ²	B ²	C ²
p-değerleri	0.0935	0.0066	0.0006		0.0011	0.0054	0.0003	0.0004	0.0739

A:Sıcaklık, B:Süre, C: Hacim değerleri ise ortak etkileşimleri temsil etmektedir.

Kodlanmış faktörler cinsinden denklem, her faktörün verilen seviyeleri için tepki hakkında tahminlerde bulunmak için kullanılabilir. Varsayılan olarak, faktörlerin yüksek seviyeleri +1 ve düşük seviyeleri -1 olarak kodlanmıştır. Kodlanmış denklem, faktör katsayılarını karşılaştırarak faktörlerin göreceli etkisini belirlemek için kullanışlıdır. Kodlanmış Faktörler Açısından Denklem Tablo 39’da verilmiştir

Gerçek faktörler açısından nihai denklem Tablo 40’da verilmiştir. Gerçek faktörler cinsinden denklem, her faktörün verilen seviyeleri için tepki hakkında tahminlerde bulunmak için kullanılabilir. Burada her faktör için özgün birimlerde düzeyler belirtilmelidir. Katsayılar her faktörün birimlerini barındıracak şekilde ölçeklendirildiğinden ve kesişme noktası tasarım alanının merkezinde olmadığından, bu denklem her faktörün göreceli etkisini belirlemek için kullanılmamalıdır.

Tablo 39. Gerçek faktörler açısından nihai denklem

<i>p</i> -OH Benz	=
+441.05833	
-0.490417	Sıcaklık
-5.86450	Hacim
-1.61833	Süre
-0.017917	Sıcaklık * Süre
+0.015500	Hacim * Süre
+0.015708	Sıcaklık ²
+0.021820	Hacim ²
+0.010281	Süre ²

Tablo 40. Gerçek faktörler açısından nihai denklem (simgesel)

<i>p</i> -OH Benz	=
+55.00	
+1.49	A
+5.26	B
+8.50	C
-10.75	AC
+7.75	BC
+14.14	A ²
+13.64	B ²
+4.11	C ²

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkileri üzerinde yeni sentezlenen DÖÇ'lerin uygulamalarının incelenmesi için öncelikle bitkiler temin edildikten sonra, DÖÇ' sentezi tasarlandı. 24 farklı birleşim (Tablo 13) denemesi gerçekleştirildi. Sıvı formunu koruyan DÖÇ'lerin karakterizasyonları yapıldıktan sonra hem uçucu yağ analizi etkisinin hem de fenolik bileşiklerin ekstraksiyonun etkisinin incelenmesi için birkaç seri deney yürütüldü. Uçucu yağ analizleri GC-MS ile analizlendi, fenolik bileşikler ise HPLC analizi yapılarak gerçekleştirildi.

DÖÇ sentezi için Gallik Asit, Sinamik Asit, Şiririk Asit, *p*-Kumarik Asit, 1-Hegzadekanol, 1-Oktadekanol hidrojen bağı donörü, Timol, Mentol, Rezorsinol ve tert-Bütil Amonyum Bromür hidrojen bağı akseptörü olarak seçildi (Tablo 12). 1:1 ile 1:10 oranında fraksiyonlar içeren 240 adet DÖÇ sentezi denendi (Tablo 21). Bunlardan 51 tanesi sıvı formda kalmış, diğer 189'u ise bir süre bekledikten sonra çökmüştür.

Sentezlenen DÖÇ'lerin özkütle değerleri gravimetrik yöntemle tespit edilmiş olup Tablo 23'de verilmiştir. Doğal maddeler kullanılarak sentezlenen DDÖÇ'lere ait özkütle değerlerinin 1 g mL⁻¹'den düşük olduğu literatürde görülmüş olup (30) aynı şekilde 1 g mL⁻¹'den düşük değerlerde yeni DÖÇ'ler sentezlenmiştir. Diğer bir karakterizasyon parametresi infrared spektrumlarının karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Hidrojen bağı etkileşimlerinin gücünü analiz etmek ve hidrojen bağı donörü (HBD) ile hidrojen bağı alıcısı (HBA) arasındaki DÖÇ'lerin yapısını belirlemek için karakteristik bir tekniktir. Önce saf maddelerin infrared spektrumları alınmış sonra sentezlenen DÖÇ'lerin infrared spektrumlarının karşılaştırılması ile bağ değişim kontrol edilmiştir. Bu çalışmada, IR spektral yanıtı, spektral kaymalara dayalı olarak DÖÇ çözeltileri ile gerçekleşen hidrojen bağı etkileşimlerini elde etmek için kullanılmıştır. Saf maddelere ait infrared spektrumları (Resim 30–Resim 38) arasında verilmiştir. Çalışmada kullanılan DÖÇ'lere ait Infrared spektrumları (Resim 39-Resim 41) arasında verilmiştir. Polar olmayan çözünenlerle karışımlarda, su, kendisi ile entalpik olarak olumlu rekabet eden etkileşimler nedeniyle çözünen madde ile moleküller arası temas alanlarını en aza indirmeye çalışır. Solvofobik etki DÖÇ'lerin miselleşmesine neden olur. Moleküller arası hidrojen bağı etkileşimi, miselleşme sürecini desteklemek için olumlu bir rol oynar (138). Su yüzeyinde toplaşan DÖÇ bileşenlerinin H bağı oluşumlarıyla desteklendiği literatür verileriyle uyumlu görülmüştür.

Timol saf maddesine ait IR spektrumu Resim 35’ de verilmiştir ve maddeye ait IR bantları sırasıyla 3311 cm^{-1} , 2960 cm^{-1} , 1618 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} ve 1055 cm^{-1} ‘dir. Tert-butil amonyum bromür saf maddesine ait IR spektrumu Resim 38’ de verilmiştir ve maddeye ait IR bantları sırasıyla 2958 cm^{-1} , 2872 cm^{-1} , 1467 cm^{-1} ‘dir. 1-oktadekanol saf maddesine ait IR spektrumu Resim 30’ da verilmiştir ve maddeye ait IR bantları sırasıyla 3319 cm^{-1} , 2914 cm^{-1} , 2846 cm^{-1} ve 1665 cm^{-1} ve 1062 cm^{-1} ’dir. 1-hegzadekanol saf maddesine ait IR spektrumu Resim 31’de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3317 cm^{-1} , 2916 cm^{-1} , 2946 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} ve 1062 cm^{-1} ‘dir. *p*-Kumarik asit saf maddesine ait IR spektrumu Resim 33’ de verilmiştir. Maddeye ait IR bantları sırasıyla 3379 cm^{-1} , 1800 cm^{-1} ’li bölgedeki dalgalanma, 1668 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , 1213 cm^{-1} ve 829 cm^{-1} dir.

Sentezlenen DÖÇ’lerin Infrared spektrumlarına bakınca; 1-Oktadekanol-timol için elde edilen bantların (Resim 39) 2964 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} ve 2866 cm^{-1} olduğu görülmektedir. Timol yapısında ve 1- Oktadekanol yapısında bulunan –OH kovalent bağının şiddetinin oldukça azaldığı spektrumdan görülmektedir. Infrared spektroskopisinde sinyal şiddetinin dipol momente bağlı olduğu bilinmektedir. –OH bağlarının birbirleri arasında hidrojen bağı yapabilme kapasiteleri oksijen ve hidrojen kovalent bağı arasındaki dipol momenti düşürmektedir. Dolayısı ile bu bağların oluşumu bağlar arasındaki mesafeyi haliyle titreşim gerilmelerini de etkileyecektir. Bu bağlamda sinyalin kaybolması moleküller arası hidrojen bağının oluştuğunu da desteklemektedir.

p-kumarik asit-tert-butil amonyum bromür için elde edilen bantlar (Resim 40) 2958 cm^{-1} , 2872 cm^{-1} ve 1467 cm^{-1} ’dir. *p*-kumarik asit maddesinde görülmesi beklenen -C=O sinyali 1668 cm^{-1} ’de kuvvetli bir sinyal şeklinde görülmüş olup, sentezlenen DÖÇ’e ait Infrared spektrumunda ise 1697 cm^{-1} ’de küçük ve şiddeti azalmış bir şekile dönüşmüştür. H bağı yapma kapasitesi bulunan bağlar -C=O, ve benzen halkanın para pozisyonunda bulunan molekül uçlarındaki –OH molekülleridir. Saf moleküllere ait -C=O, -OH kovalent bağlarının şiddetinin görünür bir şekilde azalması oluşan DÖÇ’de hidrojen bağı oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir.

1-Hekzadekanol-timol için elde edilen bantlar (Resim 41) 2954 cm^{-1} , 2916 cm^{-1} ve 2846 cm^{-1} olarak elde edilmiştir. Aynı 1-Oktadekanol-timol karışımında olduğu gibi bağ oluşturma kapasitesi bulunan bağlar-OH bağlarıdır. Sentezlenen karışımda, yapısında bulunan –OH kovalent bağlarının şiddetinin oldukça azaldığı görülmektedir.

DÖÇ'lerin karakterizasyon çalışmaları için diferansiyel kalorimetre taramaları, Infrared spektrumları, özkütle tayinleri yapılmıştır. Sentezlenen tüm DÖÇ'ler su üzerinde toplandığı için özkütlelerinin 1 g mL^{-1} 'den düşük olduğu beklendi. Sonuçlara bakıldığında ise sentezlenen derin ötektik çözetilerin hepsinin 1 g mL^{-1} 'den düşük olduğu görülmüştür.

Diferansiyel tarama kalorimetrisi, analizi yapılmak istenen örneğin sıcaklık derecesini artırmak için gereken ısı miktarındaki farkın, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü termoanalitik bir tekniktir. Hal değişimi, faz değişimi, tepkime ısısı gibi ısı işlemleriyle ilgili ölçümler bu yöntem ile belirlenebilir. Bu tez çalışmasında DSC analizlerinin yapılmasının amacı oluşan DÖÇ'ün beklenildiği şekilde kendini oluşturan maddelerin erime noktasından daha düşük bir erime sıcaklığında eriyip erimeyemediğini belirlemektir. Bu amaçla çalışmada kullanılan DÖÇ'lere ait DSC analizleri yapılmış ve maddelere ait tarama sonuçları (Şekil 7, Şekil 8, Şekil 9) verilmiştir.

1-Hekzadekanol-timol DÖÇ'ü için kullanılan bileşiklerin erime noktaları sırasıyla $49.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $51 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Isıtma yönünde yapılan taramada önce DÖÇ derin dondurucuda dondurulmuş sonra analiz edilmiştir. $33.7 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de erime noktası tespiti yapılmıştır. Soğutma yönünde yapılan taramada $29.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de donduğu gözlemlenmiştir. Erime noktasında gerçekleşen düşüş DÖÇ'ün ötektik bölgede olduğu göstermektedir (60).

p-kumarik asit-TBAB derin ötektik çözücüsü için kullanılan bileşiklerin erime noktaları sırasıyla 213°C ve 103°C 'dir. Isıtma yönünde yapılan taramada önce derin ötektik çözücü derin dondurucuda dondurulmuş sonra analiz edilmiştir. *p*-kumarik asit-TBAB derin ötektik çözücüsü için herhangi bir faz değişim sonucu alınamamış ancak, erime yönünde yapılan analizde $71 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de faz değişimine uğradığı tespit edilmiştir.

1-Oktadekanol-timol derin ötektik çözücüsü için kullanılan bileşiklerin erime noktaları sırasıyla $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $51 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Isıtma yönünde yapılan taramada önce derin ötektik çözücü derin dondurucuda dondurulmuş sonra analiz edilmiştir. $49.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de erime noktası tespiti yapılmıştır. Soğutma yönünde yapılan taramada $30.4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de donduğu gözlemlenmiştir. Erime noktasında gerçekleşen düşüş DÖÇ'ün ötektik bölgede olduğu göstermektedir.

Tez çalışmasında hem fenolik bileşen hemde uçucu yağ analizi çalışmaları yapılacağından kullanılacak DÖÇ'ün analize girişim yapabilme durumu düşünülerek çözücü tercihi yapılmıştır. Timol, Mentol gibi uçucu bileşenlerden sentezlenen ötektik çözücüler GC-MS analizlerinde kullanılamayacağı için doğal olarak elenmiştir. Aynı

şekilde Şiririk asit, *p*-Kumarik asit, Gallik asit, Sinnamik asit içeren DÖÇ'lerde fenolik asit tayinlerin tayininde kullanılmamıştır. Her iki çalışmada girişim yapmayan DÖÇ'ler tercih edilerek çalışmalar sürdürülmüştür. Fenolik bileşenlerin tespiti için kullanılan DÖÇ'ler 1-hekzadekanol-timol ve 1-Oktadekanol-timol karışımlarından oluşmaktadır. Uçucu yağların tespiti için ise kullanılan DÖÇ Sinnamik asit – tert-butil amonyum bromür, Şiririk asit- tert-butil amonyum bromür ve *p*-kumarik asit- tert-butil amonyum bromür çözücülerinden biri seçilerek gerçekleştirildi. *p*-kumarik asit- tert-butil amonyum bromür uçucu yağ analizi için önmuamele çözücüsü olarak tercih edilmiştir.

Mikrodalga ışıması, dipol dönüşü ve iyon iletimi prensibi aracılığıyla ekstraksiyon sürecini veya kimyasal reaksiyonu teşvik ettiğinden, mikrodalga destekli ekstraksiyonun en umut verici yöntemlerden biri olmasını sağlar. Mikrodalga destekli avantajlarına dayanarak teknolojiler şu şekilde uygulanmıştır. Uçucu yağ profilinin derin ötektik çözücü muamelesiyle nasıl değişeceğini tespit etmek için mikrodalga fırında su subuharı destilasyonu ve bitkilerin DÖÇ'ler ile ön muamelesinin yapılmasından sonra su buharı destilasyonunun gerçekleştirilip gaz kromatografisi ile değişiminin nasıl olduğu incelenmiştir. *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkileri uçucu içeriğini bozmayacak uygun DÖÇ ile mikrodalga fırında ısıtma muamalesine tabi tutulmuştur. Bitkilerin clevenger ekstaksiyonu sonucu toplanan uçucu yağlar; nemsiz bazda yağ verimi *O. micranthum* için % 0.19 ve *O. minutiflorum* için % 0.21 olarak hesaplandı. Elde edilen yağların GC-MS sonuçlarına bakıldığında ön muamele yapılmadan 20 ve 27, ön muamele yapılarak elde edilen uçucu bileşen sayısı ise 52 ve 58 olarak tespit edilmiştir. DÖÇ ile ön muamele yapılarak uçucu bileşen sayısının ve yağ veriminin kısmen arttığı literatürde görülmüştür (3).

Major bileşenlere bakıldığında ise *O. micranthum* bitkisine uygulanan yöntemi sonucunda 20 uçucu yağ bileşeni saptanmıştır ve elde edilen deneysel retention indeksler ve alev iyonlaştırmalı dedektörde elde edilen % alan verileri eşleştirilerek (Tablo 24) sunulmuştur. Elde edilen yağ içeriğinin % 85.5909'u aydınlatıldı. Bunlar; 10 monoterpen, 9 monoterpenoid ve 1 adet diğer uçucu yağ türüdür. *O. minutiflorum* Bitkisinin ekstraksiyon sonucu elde edilen uçucu yağ GC-MS analizine tabii tutulmuş ve elde edilen sonuçlar (Tablo 25) verilmiştir. Elde edilen deneysel retention indeksler ve alev iyonlaştırmalı dedektörde elde edilen % alan verileri eşleştirilerek sunulmuştur. Elde edilen yağ içeriğinin % 88.4291 'i aydınlatılmıştır. *O. minutiflorum* bitkisine uygulanan yöntem

sonucunda 27 uçucu yağ bileşeni saptanmıştır. Bunlar; 12 monoterpen, 11 monoterpenoid, 3 seskiterpen ve 1 adet diğer uçucu yağ türüdür.

Anabileşen bakımından değerlendirildiğinde *O. micranthum* bitkisinin ana bileşenleri; terpinen-4-ol (%30.3160), γ -terpinen (% 10.6870), trans-sabinol (% 6.3873) ve α -Terpinen (6.3720)'dir. Anabileşenlerin monoterpenoid ve monoterpen sınıfına ait olduğu görülmektedir. Terpinen, ve α -terpinen monoterpen grubuna ait bileşiklerdir. Ana bileşen olan terpinen-4-ol ve trans-sabinol ise monoterpenoid grubundandır.

O. minutiflorum bitkisinin ana bileşenleri α -terpineol (%24.6102), Linalool (%13.8548), terpinen-4-ol (%8.2174) ve γ -terpinen (%5.3124)'dir. Aynı şekilde ana bileşenlerin monoterpen ve monoterpenoid sınıfına ait olduğu görülmektedir. α -terpineol, Linalool, Terpinen-4-ol bileşikleri monoterpenoid, γ -terpinen bileşiği ise monoterpen grubuna aittir.

Ön muameleye tabi tutulan bitkilerin cleveger ekstaksiyonu sonucu toplanan uçucu yağlar; nemsiz bazda yağ verimi *O. micranthum* için % 0.23 ve *O. minutiflorum* için % 0.22 olarak hesaplandı. Bileşenlerin alıkonma indeksleri literatür verileriyle karşılaştırılarak doğrulandı. *O. micranthum* Bitkisinin yöntem sonucu elde edilen analiz sonucunda 52 adet uçucu bileşen tespit edilmiştir. Bunlar; 13 monoterpen, 18 monoterpenoid, 5 seskiterpen, 6 seskiterpenoid ve 10 adet diğer uçucu yağ türüdür.

O. minutiflorum bitkisinin yöntem sonucu elde edilen analiz sonucunda 58 adet uçucu bileşen tespit edilmiştir. Bunlar; 12 monoterpen, 16 monoterpenoid, 15 seskiterpen, 9 seskiterpenoid ve 6 adet diğer uçucu yağ türüdür.

Anabileşen bakımından değerlendirildiğinde ön muamele yapılan *O. micranthum* bitkisinin ana bileşenleri; Terpeneol (%14.2297), 5-Izopropil-6-Metil-Hepta-3,5-Dien-2-Ol (13.0195), trans-sabinol (8.373), γ -terpinen (4.4807) ve Linalool (%7.7025)'dur. Anabileşenlerin monoterpenoid monoterpen ve diğer sınıfına ait olduğu görülmektedir. γ -terpinen monoterpen grubuna ait, Terpeneol, trans-sabinol ve Linalool monoterpenoid grubundandır. 5-Izopropil-6-Metil-Hepta-3,5-Dien-2-Ol bileşiği diğer sınıfta yer almaktadır. Ana bileşen olan Terpeneol monoterpenoid grubundandır.

Ön muamele yapılan *O. minutiflorum* bitkisinin ana bileşenleri α -terpinil asetat (22.7084), Linalool (%19.9608), Linalil asetat (10.5428) trans-sabinol (8.3235) ve trans-Karyofilen (%4.4497)'dir. Aynı şekilde anabileşenlerin monoterpen ve monoterpenoid

sınıfına ait olduğu görülmektedir. α -terpinil asetat, Linalool, Linalil asetat, trans-sabinol bileşikleri monoterpenoid, trans-Karyofilen bileşiği ise seskiterpen grubuna aittir. Ana bileşen olan α -terpinil asetat monoterpenoid grubundandır.

Pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinin hiperproliferasyonu, hipoksi kaynaklı pulmoner hipertansiyonun pulmoner arteriyel yeniden yapılanmasında çok önemli bir rol oynar. 4-terpineol uygulaması, sıçanlarda HPH'nin ilerlemesini ve zayıflatılmış pulmoner arteriyel yeniden yapılanmasını hafifletmiştir (139). Terpinene-4-ol ve limonenin *Sitophilus zeamais*'e karşı önemli ölçüde insektisidal aktivite gösterdiği daha önceki çalışmalarımızda bildirilmiş olup bunların CYP450 genleri üzerinde güçlü etkileri olduğu değerlendirilmiştir. Yeni botanik pestisitler olarak kullanılan terpinene-4-ol ve limonenin depolama zararlılarını kontrol etme potansiyeli, böylece kimyasal pestisitlerin uygulanmasını azaltmak ve direnç gelişimini geciktirmek için kullanılabilir (140).

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyon prosedürünün optimizasyonu için Design-Expert-13 programı kullanılarak Mikrodalga süresi, mikrodalga sıcaklığı, mikrodalga gücü, kullanılan derin ötektik çözücü hacmi, su hacmi ve vorteks süresi olarak 6 faktör üzerinden fraksiyonel tasarım kullanılarak analiz edildi.

2 seviyeli fraksiyonel faktörel dizayn kullanılarak MD sıcaklığı için 10-70 °C, MD gücü için 300-500 W, Döç hacmi 100-150 μ L, Su hacmi 1-3 mL ve Vorteks süresi olarak 20-60 sn seçildi. Yapılan regresyon analizi sonucunda sisteme en çok etki eden parametreleri belirlemek için pareto eğrileri çizildi. Pareto grafiği en çok etkiye sahip faktörleri ve etki etme seviyelerini vermektedir. Pareto grafiğinin t değerinin üzerinde olan çubuklar % 95 güven seviyesinde istatistiksel olarak önemli etkiye sahiptir. Shapiro-Wilk test grafiği eğim çizgisi üzerinin haricinde bulunan her nokta etkili olan faktörleri temsil etmektedir. Kırmızı çizginin dışındaki her nokta istatistiksel olarak anlamlı sonuç verenler grubuna dahil edilir. Bu grafikten anlaşıldığı üzere DÖÇ hacmi, vortex süresi, sıcaklık sisteme en çok etki eden parametrelerdendir. Shapiro-Wilk test grafiği 0.0500'den küçük P değerleri model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Bu optimizasyon çalışmasında p değeri 0.044 olarak bulunmuştur. Bu DÖÇ hacmi, vortex hücresi, sıcaklık anlamlı model terimlerini temsil etmektedir. 0.1000'den büyük değerler, model terimlerinin anlamlı olmadığını gösterir. Çok sayıda önemsiz model terimi varsa (hiyerarşiyi desteklemek için gerekenler hariç), model azaltma modelinizi geliştirebilmek için oldukça kullanışlıdır.

Bundan sonraki aşamada sisteme etki etmeyen parametreler minimumda tutulup sisteme etki eden parametreler maksimum seviyeye çekildikten sonra, Box-Behnken tasarımı ile merkez noktada 3 tekrarlı 3 parametre için rastgele sırayla toplam 15 deney gerçekleştirilmiştir. Elde edilen model karesel ve anlamlı sonuç vermiştir. Yapılan ANOVA analizine göre R^2 0.9727, CV % 5.08, Std.Sapma 3.66, sinyal/gürültü oranı 14.474 olarak bulunmuştur. Yapılan ANOVA analizine göre R^2 0.9727, CV % 5.08, Std.Sapma 3.66, sinyal/gürültü oranı 14.474 olarak bulunmuştur. Yeterli hassasiyet sinyal-gürültü oranını ölçer. 4'ten büyük bir oran arzu edilir. 14.747 oranımız yeterli bir sinyali gösterir. Bu modelin, tasarım alanında gezinmek için kullanılabilir olduğunu gösterir. 0.0500'den küçük P değerleri (Tablo 37) model terimlerinin anlamlı olduğunu gösterir. Bu durumda B, C, AC, BC, A^2 , B^2 anlamlı model terimleridir. 0.1000'den büyük değerler, model terimlerinin anlamlı olmadığını gösterir.

Model diyagramlarını inceleyince Resim 44, Resim 45, Resim 46 'da hacim'in merkez noktada tutulduğu yerde sıcaklık ve süre etkileşiminin azaldığı görülmekte, ancak hacimin maksimum noktada tutulduğu grafiğe bakınca yüksek etkileşime sahip olduğu görülmektedir. Sıcaklık faktörü incelendiğinde Resim 51, Resim 52 sıcaklık faktörünün maksimum olduğu durumda parametreler arası etkileşimin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Fenolik bileşiklerin analizlerinin yapıldığı HPLC şartları valide edilmiştir. Validasyon işlemleri yapılmadan önce sistemin yeterli bir şekilde çalıştığını kanıtlamak için sistem uygunluk testi yapılır. Bu işlem için aynı standardın 5 tekrarlı enjeksiyonu değerlendirildi. Doğrusallık, LOD ve LOQ, geri kazanım, kesinlik ve seçicilik açısından çalışmalar tamamlandı.

Sistem uygunluk çalışmalarında kuyruklanma faktörü, ayırma gücü ve enjeksiyon kesinliği 7 fenolik için hesaplandı (Tablo 30). Alıkonma zamanı; *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, şiringaldehit, *p*-kumarik asit, sinapik asit, benzoik asit ve kersetin olmak üzere 7 fenolik bileşikleri için sırasıyla 3.844, 4.641, 5.081, 5.489, 6.576, 8.448 13.612 dk olarak bulundu. Kuyruklanma faktörü sırasıyla 1.52, 1.44, 1.48, 1.51, 1.60, 1.44, 1.55 olarak hesaplandı. Kapasite faktörü 2.5593, 3.2972, 3.7046, 4.0824, 5.0889, 6.8222, 11.6037 ve son olarak enjeksiyon kesinliği (%BSS) 0.61, 0.45, 0.58, 0.63, 0.52, 0.64, 0.81 olarak hesaplandı.

Yöntem doğrusallığının belirlenmesi için kromatogramdan alınan pik alanlarının kalibrasyon eğrileri (Tablo 31) elde edilmiştir. Korelasyon katsayıları 0.9998, 0.9994, 0.9995, 0.9999, 0.0998, 0.0998, 0.0998 olarak bulunmuştur.

Fenolik bileşikler için LOD ve LOQ değerleri sinyal-gürültü oranı kullanılarak hesaplanmıştır. LOD değerleri sırasıyla 0.05, 0.08, 0.20, 0.07, 0.25, 0.23, 0.09 olarak bulunmuş, LOQ değerleri ise; 0.17, 0.26, 0.65, 0.22, 0.78, 0.71, 0.27 olarak hesaplanmıştır.

Fenolik bileşikler için geri kazanım değerleri üç farklı konsantrasyonda (5, 25 ve 50 µg/L) kalite kontrol örnekleri çözeltileri hazırlandı ve üç tekrarlı şekilde uygulandı. % geri kazanımlar (Tablo 33) hesaplanarak tablo haline getirildi.

Standart tepe noktaları arasındaki çözünürlüğü karşılaştırılarak yöntem kesinliği değerlendirildi. Fenolik bileşikler, aynı HPLC koşulları kullanılarak belirlendi. Numune pikleri, bilinen fenolik standartların alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak yöntem kesinliği tespit edildi. %1 'in altında olan değerler anlamlı kabul edildi.

O. micranthum ve *O. minutiflorum* bitkilerinden elde edilen hem uçucu yağlar hem de fenolik maddeleri içeren ekstraktların tümü antioksidan ve aktimikrobiyal aktiviteleri bakımından değerlendirildi. Antioksidan testler için CUPRAC, FRAP ve DPPH testleri çalışılmıştır.

Elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri değerlendirildiğinde derin ötektik çözücülerle elde edilen örneklerde aktivite azalması olduğu görülmüştür. 24 saat ve mikrodalga ekstraksiyonu sonucu elde edilen örneklerde ise *O. micranthum* bitkisinin 24 saat ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrenin daha büyük aktiviteye sahip olduğu, ve *O. micranthum* bitkisinin ise MDE ile elde edilen ekstresinin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

CUPRAC testi için; *O. micranthum* bitkisinin derin ötektik çözücülerle yapılan ekstraksiyonu sonucu en yüksek antioksidan aktiviteyi 1-10 oranında 1-hegzadekanol-timol karışımından elde edildiği görülmüştür. *O. minutiflorum* bitkisi içinse en yüksek aktiviteyi 1-5 oranında 1- oktadekanol-timol karışımından elde edildiği tespit edilmiştir.

DPPH testi için *O. micranthum* bitkisinin derin ötektik çözücülerle yapılan ekstraksiyonu sonucu en yüksek antioksidan aktiviteyi 1-5 oranında 1-hegzadekanol-timol karışımından elde edildiği görülmüştür. *O. minutiflorum* bitkisi içinse en yüksek aktiviteyi 1-5 oranında 1- oktadekanol-timol karışımından elde edildiği tespit edilmiştir.

FRAP testi için *O. micranthum* bitkisinin derin ötektik çözücülerle yapılan ekstraksiyonu sonucu en yüksek antioksidan aktiviteyi 1-5 oranında 1-hegzadekanol-timol karışımından elde edildiği görülmüştür. *O. minutiflorum* bitkisi içinse en yüksek aktiviteyi 1-5 oranında 1- hegzadekanol-timol karışımından elde edildiği tespit edilmiştir.

O. micranthum bitkisinden, 1-tetradekanol, ursolik asit ve oleanolik asitten oluşan bir karışım, rosmarinik asit, [4(3,4- dihidroksibenzoiloksimetil)fenil- β -D-glukopiranozit], Salvianic asit A bileşikler izole edilmiştir. Bileşik türleri triterpen, doymuş yağ alkolü ve fenolik bileşiklerden oluşmaktadır. *O. minutiflorum* bitkisinden, 1-tetradekanol, rosmarinik asit, apigenin, visenin-2 izole edilmiştir. Bileşik türleri doymuş yağ alkolü, flavonoit ve fenolik bileşiklerden oluşmaktadır (2). Birçok biyolojik aktiviteye sahip önemli bir fenolik bileşik olan rosmarinik asit, antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, nöroprotektif ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir. Dolayısı ile çalışmada kullanılan bitki türlerinde ve derin ötektik çözücülerle elde edilen ekstraktlarında antioksidan özellik görülmesi beklenen bir durumdur. *O.compactum* bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada uçucu yağ bileşenleri saptanmış ve antioksidan özellikleri incelenmiştir. Karvakrol, *p*-simen, γ -terpinen major uçucu bileşikler oluştururken antioksidan aktivite çalışmaları asit değeri ve peroksit değeri ile tayin edilmiş ve antioksidan aktivitesinin olduğu gözlemlenmiştir (103). *O. vulgare* L. subsp. glandulosum (Desf.) Ietswaart üzerine yapılan çalışmada, 3 ayrı lokasyondan elde edilen türün uçucu yağ analizleri ayrı ayrı gerçekleştirilmiş ve DPPH ile antioksidan tayini yapılmıştır. Çalışmada elde edilen bulgularda iyi bir antioksidan aktivite gösterdiği ve uçucu bileşenlerinin farklı içeriğe sahip olduğu görülmüştür (104). *O. onites* and *O. vulgare* ssp. Hirtum üzerine yapılan çalışmada uçucu yağları elde edilmiş ve β -karoten ağartma testi antioksidan aktivite tayini için kullanılmış olup, antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Uçucu yağ olarak major bileşenler karvakrol (%79.32, %68.19) *p*-simen (%4.32, %6.81) ve γ -terpinen (%3.94, %4.63) oranlarında görülmüştür (105). Uçucu yağlarını tespit ettiğimiz *O. micranthum* ve *O. minutiflorum* bitkilerinin major bileşenleri Terpinen-4-ol (%30.3160) ve α -terpineol (%24.6102) şeklinde bulunmuştur.

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için Agar Kuyucuk Difüzyon Testi uygulanmış örneklerle ait inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçülerek mm olarak kaydedilmiştir. Derin ötektik çözücü ile elde edilen ekstraktlarda DÖÇ'ten kaynaklı bir aktivite oluşumu mümkündür. Kullanılan maddeler doğal ürünlerde bulunan maddeler olduğu için aktiviteye

katkısı olduğu göz alınarak kör olarak sadece DÖÇ çözeltilerinin de aktivitesi değerlendirilmiştir.

Ampisilin standartına karşı yapılan zon ölçümleri *O. micranthum* bitkisi için değerlendirildiğinde metanol ekstrelerinin 24 saatlik ve mikrodalga ekstraksiyonu içeren örneklerde *E. coli* bakterisi üzerinde herhangi bir zon oluşumunun gerçekleşmediği bu bakteri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olmadığı görüldü. Aynı şekilde, *O. minutiflorum* bitkisine ait 24 saatlik ve mikrodalga ekstraksiyonu içeren örneklerde zon oluşumu görülmemiştir. *C. albicans*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. epidermis* mantar ve bakteri türlerinde ise çeşiti derecelerde antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Sade DÖÇ örneklerine bakılınca aktivitenin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Genital bölgede açtığı infeksiyon sebebi ile kısırlığa kadar hastalığı ilerleten *C. albicans* mantarına karşı en iyi aktiviteyi OMK-Ö-UY ve OMF-Ö-UY kodlu ön muamele yapılmış uçucu yağların gösterdiği görülmüştür. DÖÇ'lerle elde edilen fenolik ekstraktlara ait veriler birbirine çok yakın seviyelerde çıkmış olup aktiviteleri de aşağı yukarı aynı seviyelerde görülmüştür. *S. aureus* bakterisinde yine aynı şekilde OMK-Ö-UY kodlu *O. micranthum* bitkisinden elde edilen ön muamele yapılmış yağın en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. OMK-d3 kodlu DÖÇ ile elde edilen fenolik ekstrakt kendi grubu içerisinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahiptir.

B. cereus toprak mahsullerinde görülen sürekli kusma ve ishal şikayetlerine sebep olan günlük hayatın olumsuz etkilenmesine neden olan bakterilerden biridir. Bu bakteriye karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi OMF-UY* OMK Ö-UY* kodlu, ön muamele edilmiş *O. micranthum* ve Ön muamelesiz *O. minutiflorum* bitkilerinden elden edilen uçucu yağların verdiği tespit edilmiştir. OMK-d1, OMK-d2, OMK-d3 kodlu fenolik bileşikler standart maddeye göre oldukça yüksek ve eşit seviyede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. OMF -d3, OMF-d2, OMF-d1 ekstraktlarında en iyi aktiviteyi OMF-d3 göstermiştir.

S. epidermis insana solunum yoluyla bulaşabilen, genellikle cerrahi işlemler omurilik ve beyini kaplayan zarların iltihaplanmasına yol açan hayati risk sebebi olan bakterilerden biridir. Bu türe ait en yüksek direnç sahip tür OMF-UY* Ön muamelesiz *O. minutiflorum* bitkilerinden elden edilen uçucu yağlardan oluşmuştur. Uçucu yağların fenolik bileşenlere göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bariz bir şekilde görülmektedir. Fenolik ekstraktlar yönünden incelendiğinde OMF -d3, OMF-d2, OMF-d1

sırasıyla yüksekten düşüğe gittiği görülmektedir. OMK-d1, OMK-d2,OMK-d3 kodlu ekstraktlarda da aynı sırada yüksekten düşüğe doğru bir aktivite azalması gözlemlenmektedir.



6.SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✚ Bu çalışmada 240 adet yeni DDÖÇ sentezlenmeye çalışılmış, bunlardan 51 tanesi sıvı formda kalmış, diğer 189'u ise bir süre bekledikten sonra çökmüştür. Kullanılan HBD ve HBA çeşitliliği arttırılarak yeni potansiyel çözücülerin sentezlenmesi denenebilir.
- ✚ Sentezlenen çözücülerin, çözücü potansiyelinin değerlendirilebilmesi için hem fenolik ekstraksiyon çözücüsü, hemde uçucu yağ analizlerinden ön deriştirme reaktifi gibi özelliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Uçucu yağ çalışmalarında klasik Clevenger düzeneği mikrodalga fırın içerisinde kombine edilerek kullanılmıştır. Bu durum bize ekstraksiyon verimi üzerinden artış sağlamıştır.
- ✚ Fenolik asitlerin tayini için tek kapta DSSME yöntemi kullanılmış ve etkin sonuçlar elde edilmiştir. Polarite farklılığından kaynaklı miktar azalmaları normal bulunmuştur. Çözücü polaritesi ekstraksiyon verimini büyük ölçüde etkilemektedir.
- ✚ Ekstraksiyon prosedürünün optimizasyon çalışmaları, önce bağımlı değişkenlerin tespiti ile fraksiyonel faktöriyel tasarım ile belirlenmesi ardından, Box-Behnken yüzey yanıt metodolojisi ile optimizasyonu tamamlanmıştır. Bu işlemler için Desing-Expert 11.1.2 programı üzerinden tüm istatistiksel değerlendirmeler yapılmış ekstraksiyona en büyük etkiyi gösteren parametrelerin DÖÇ Hacmi, Ekstraksiyon Sıcaklığı ve Vortex Süresinin olduğu bulunmuştur.
- ✚ Uçucu yağ analizlerinde kullanılan ön deriştirme reaktifi yağ verimi az bir miktarda arttırdıysa da içerik bakımından daha çok çeşitli türlerin tespitine zemin hazırlamıştır.
- ✚ Antioksidan ve antimikrobiyal çalışmalarda yüksek aktivite gözlemlenmiştir. Bu durum doğal bileşenlerden oluşan DÖÇ'lerin yaygınlaşması ve uygun maddelerin yapılarından izole edilebilmesini mümkün kılabilir.
- ✚ Valide ve optimize bir yöntem geliştirilmiş olup başka örneklerle de uygulamaları denenebilir.
- ✚ Yerinde şartlarda gerçekleşen ekstraksiyon yöntemi çok az bir miktar madde yardımı ile bitki profilinin aydınlatılmasında çevreyi kirlletmeme adına büyük rol oynamaktadır.
- ✚ 16 dk içerisinde 7 farklı fenolik bileşiğin eş zamanlı tayini için yöntem geliştirilip valide edilmiştir. Bu şekilde yöntemin uluslararası gereklilikleri yerine getirdiğini göstermiştir.

- ✚ Doğal maddelerden oluşan DÖÇ'ler yeşil kimyanın ve çevre dostu kimyasallar olarak trendlerde yerini alacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Chem Comm 70-71.
2. Karaoğlu ES (2011). Bazı Origanum Türleri Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, Erzurum.
3. Zhao Y, Wang P, Zheng W, Yu G, Li Z, She Y, Lee M (2019). Three-stage microwave extraction of cumin (*Cuminum cyminum* L.) Seed essential oil with natural deep eutectic solvents. Industrial Crops & Products 140 (2019):111660.
4. Naghibi F, Mosaddegh M, Motamed SM, Ghorbani A (2005). Labiatae family in folk medicine in iran from ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2: 63-79.
5. Rivera Nunez D, Obon de Gastro C (1992). Palaeoethnobotanik ve Avrupa ve Yakın Doğu'daki Labiatae'nin arkebotaniği. Harley'de, RM Reynolds, T., Labiatae Biliminde Gelişmeler. Kraliyet Botanik Bahçeleri, Kew, Londra, Sayfa: 437-454.
6. Richardson P (1992). The chemistry of the Labiatae: An introduction and overview. In: Harley RM and Reynolds T. (Eds.) Advances in Labiatae Science. Botanical Garden Kew, Sayfa: 291- 297.
7. Lu Y, Yeap-foo L (2002). Polyphenolics of Salvia- A review. Phytochem 59: 117-140.
8. Zegorka G, Glowniak K (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. J. Pharm. Biomed. Anal 26: 179-187.
9. Ietswaart JHA (1980). Taxonomic Revision of the genus *Origanum* (Labiatae), Leiden Botanical Series, Vol 4, Leiden University Press, The Hague, Netherlands.
10. Taş A (2010). Türkiye’de Yetişen *Origanum* L. (*Labiatae*) Cinsi Üzerine Epidermal İncelemeler. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Malatya.
11. Hedge, C. (1992) A Global Survey of the Biogeography of the Labiatae. In: Harley RM and Reynolds T (Ed), Advances in Labiatae Science, Royal Botanic Gardens, Kew, Sayfa: 7-17.
12. Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC (2000). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 11. (Supplement II). Edinburgh: University Press.

13. Britannica (2022) [online]. Available From: <https://www.britannica.com/plant/Lamiaceae>. [Erişim Tarihi:30 Mart 2022].
14. Davis PH, Mill RR, Tan K (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 10 (Supplement). Edinburgh: University Press.
15. Sadıkoğlu N (2005). Kekik olarak kullanılan türler üzerinde farmasötik botanik araştırmalar. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı. İstanbul.
16. Kıtık A. (1997). Status of cultivation and use of oregano in Turkey. Padulosi S (Ed.). Oregano, Promoting the conservation and use of underutilized neglected crops. 14. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, Rome, 8-12 May 1996, Sayfa:121-131.
17. Oflaz S (2001). Ticari *Origanum* türlerinin farmakognozik araştırması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir.
18. Boydağ İ. (1996). Üç *Origanum* türü; *Origanum majorana* L., *O. minutiflorum* O. Schwarz and PH. Davis ve *Origanum onites* L. uçucu yağlarının fraksiyonlu distilasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Eskişehir.
19. Türkiye Bitkileri Veri Servisi (2022) [online] http://194.27.225.161/yasin/tubives/index.php?sayfa=hizli_ara. [Erişim Tarihi:30 Mart 2022].
20. Tropicos (2022). [online]. <http://legacy.tropicos.org/NameSearch.aspx>. [Erişim Tarihi:30 Mart 2022].
21. Cathcart C (1990). Green chemistry in the Emerald Isle. Chem. Ind 5: 684–687.
22. United States Enviromental Protection Agency (2021). Available From: <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry> . [Erişim Tarihi 1 Eylül 2021].
23. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Vasuki T (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Chem. Communication 70-71

24. Anastas PT, Warner JC (1998). Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press.
25. Ravula S, Larm NE, Mottaleb MA, Heitz MP, Baker GA (2019). Vapor Pressure Mapping of Ionic Liquids and Low-Volatility Fluids Using Graded Isothermal Thermogravimetric Analysis. *Chemengineering*. 3:1-12
26. Wilkes JS (2002). A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. *Green Chemistry*.4: 73-80
27. Francisco M, Van Den Bruinhorst A, Kroon MC (2013). Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angewandte Chemie - International Edition*. 52(11): 3074–3085.
28. Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, Witkamp GJ, Verpoorte R (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology. *Plant Physiology* 156(4):1701–1705
29. Smith EL, Abbott AP, Ryder KS (2006). Design of improved deep eutectic solvents using hole theory. *Chemphyschem* 7: 803-806.
30. Yıldırım S, Sellitepe HE (2021). Vortex assisted liquid-liquid microextraction based on *in situ* formation of a natural deep eutectic solvent by microwave irradiation for the determination of beta-blockers in water samples. *Journal of Chromatography A* 1642 (2021): 462007.
31. Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Gaurina Srček V, Grgas D, Landeka Dragičević T, Redovniković RI (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Environmental Safety* 112: 46–53.
32. Pena-Pereira F, Kloskowski A, Namieśnik J (2015). Perspectives on the replacement of harmful organic solvents in analytical methodologies: A framework toward the implementation of a generation of eco-friendly alternatives. *Green Chemistry* 17(7): 3687–3705.
33. Savi LK, Carpiné D, Waszczynskyj N, Ribani RH, Haminiuk CWI (2019). Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria* 488: 40–47.

34. Dai Y, Verpoorte R, Choi YH (2014). Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry* 159: 116–121.
35. Milano F, Giotta L, Guascito MR, Agostiano A, Sblendorio S, Valli L, Perna FM, Cicco L, Trotta M, Capriati V (2017). Functional Enzymes in Nonaqueous Environment: The Case of Photosynthetic Reaction Centers in Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 5(9): 7768–7776.
36. Xin R, Qi S, Zeng C, Khan FI, Yang B, Wang Y (2017). A functional natural deep eutectic solvent based on trehalose: Structural and physicochemical properties. *Food Chemistry* 217: 560–567.
37. Mano F, Aroso IM, Barreiros S, Borges JP, Reis RL, Duarte ARC, Paiva A (2015). Production of poly(vinyl alcohol) (PVA) fibers with encapsulated natural deep eutectic solvent (NADES) using electrospinning. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 3(10): 2504–2509.
38. Faggian M, Sut S, Perissutti B, Baldan V, Grabnar I, Dall'Acqua S (2016). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) as a tool for bioavailability improvement: Pharmacokinetics of rutin dissolved in proline/glycine after oral administration in rats: Possible application in nutraceuticals. *Molecules* 21(11): 1–11.
39. Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY, Lee J (2017). Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *Journal of Cleaner Production* 151: 87–95.
40. Florindo C, Oliveira FS, Rebelo LPN, Fernandes AM, Marrucho IM (2014). Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 2(10):2416–2425.
41. Dai Y, Van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013). Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: Mixtures of solids as extraction solvents. *Journal of Natural Products* 76(11): 2162–2173.
42. Aroso IM, Paiva A, Reis RL, Duarte ARC (2017). Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine–Physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids* 241:654–661.

43. Cardellini F, Tiecco M, Germani R, Cardinali G, Corte L, Roscini L, Spreti N (2014). Novel zwitterionic deep eutectic solvents from trimethylglycine and carboxylic acids: Characterization of their properties and their toxicity. *RSC Advances* 4(99):55990–56002.
44. Gutiérrez MC, Ferrer ML, Yuste L, Rojo F, Monte FDel (2010) Bacteria incorporation in deep-eutectic solvents through freeze-drying. *Angewandte Chemie - International Edition* 49(12):2158–2162.
45. Bajkacz S, Adamek J (2017). Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta* 168:329–335.
46. Gomez FJV, Espino M, Fernández MA, Silva MF (2018). A greener approach to prepare natural deep eutectic solvents. *Chemistry Select* 3(22):6122–6125.
47. Lapeña D, Lomba L, Artal M, Lafuente C, Giner B (2019). The NADES glycine as a potential Green Solvent: A comprehensive study of its thermophysical properties and effect of water inclusion. *Journal of Chemical Thermodynamics* 128: 164–172.
48. Patil UB, Shendage SS, Nagarkar JM (2013). One-pot synthesis of nitriles from aldehydes catalyzed by deep eutectic solvent. *Synthesis* 45: 3295–3299.
49. Wang L, Dai DY, Chen Q, He MY (2013). Rapid, Sustainable, and Gram-Scale Synthesis of Phenols Catalyzed by a Biodegradable Deep Eutectic Mixture in Water. *Asian J. Org. Chem* 2: 1040–1043.
50. Avalos M, Babiano R, Cintas P, Jimenez JL, Palacios JC (2006). Greener media in chemical synthesis and processing. *Angew. Chem. Int. Ed* 45: 3904–3908.
51. Hayyan M, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM (2010). A novel technique for separating glycerine from palm oil-based biodiesel using ionic liquids. *Fuel Process. Technol* 91:116–120.
52. Shahbaz K, Mjalli F, Hashim M, AlNashef (2011). Using deep eutectic solvents based on methyl triphenyl phosphonium bromide for the removal of glycerol from palm-oil-based biodiesel. *Energy Fuels* 25: 2671–2678
53. Francisco M, van den Bruinhorst A (2013). Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. Ed* 52: 3074–3085.
54. Brett CM (2018). Deep eutectic solvents and applications in electrochemical sensing. *Curr. Opin. Electrochem* 10: 143–148.

55. Nkuku CA, LeSuer RJ (2007). Electrochemistry in deep eutectic solvents. *J. Phys. Chem. B* 111:13271–13277.
56. Durand E, Lecomte J, Baréa B, Piombo G, Dubreucq E, Villeneuve P (2012). Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem* 47: 2081–2089.
57. Radošević K, Ćurko N, Srček VG, Bubalo MC, Tomašević M, Ganić KK, Redovniković IR (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT-Food Sci. Technol* 73: 45–51
58. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp G-J, Verpoorte R, Choi YH (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* 766: 61–68.
59. Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC (2014) Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng* 2: 1063–1071.
60. Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF (2018). Natural deep eutectic solvents: Properties, applications, and perspectives. *J. Nat. Prod* 81: 679–690.
61. Satlewal A, Agrawal R, Bhagia S, Sangoro J, Ragauskas AJ (2018). Natural deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: Recent developments, challenges and novel opportunities. *Biotechnol. Adv* 36 (8): 2032-2050.
62. de los Ángeles Fernández M, Boiteux J, Espino M, Gomez FV, Silva MF (2018). Natural Deep Eutectic Solvents-Mediated Extractions: The way forward for sustainable analytical developments. *Anal. Chim. Acta* 1038: 1-10.
63. Lynam JG, Kumar N, Wong MJ (2017). Deep eutectic solvents' ability to solubilize lignin, cellulose, and hemicellulose, thermal stability, and density. *Bioresour. Technol* 238: 684–689.
64. Vanda H, Dai Y, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chim* 21: 628–638.
65. Oliveira F, Santos F, Duarte Ana Rita C (2021). Therapeutic Deep Eutectic Systems towards the Treatment of Tuberculosis and Colorectal Cancer: Opportunities and Challenges. *Molecules* 26(22): 7022.

66. Craig CC, Fisher R (1936). The Design of Experiments. The American Mathematical Monthly 43(3):180.
67. Antony J (2014). Design of Experiments for Engineers and Scientists. In Design of Experiments for Engineers and Scientists 63-85.
68. Box GEP, Wilson KB (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 13(1): 1-45.
69. PennState. Eberly College of Science (2022). [Online]. Desing of Experiment/ Short History of Design of Experiment <https://online.stat.psu.edu/stat503/lesson/1/1.1> . [Erişim Tarihi:21 Kasım 2022].
70. Taguchi G. (1987). System of Experimental Design 2 Volumes. UNIPUB/Kraus Internation Publications. New York.
71. Çiftçi Aytekin AG.(2010) Kalite Geliştirme Sürecinde Eniyileme Problemlerine Deney Tasarımı Yönteminin Uygulanması. Doktora Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sosyal Bilimleri Enstitüsü, İşletme Anabilim Dalı, İzmir.
72. Suresh KP (2011). An overview of randomization techniques: An unbiased assessment of outcome in clinical research Journal of Human Reproductive Sciences 4(1): 8-11.
73. Savaskan M, Taptik Y, Ürgen M (2004). Deney Tasarımı Yöntemi ile Matkap Uçlarında Performans Optimizasyonu ITÜ Dergisi 3(6): 117-128.
74. Indeed. Career Development (2022). [Online]. <https://www.indeed.com/career-advice/career-development/designing-an-experiment> . [Erişim Tarihi:23 Kasım 2022].
75. Pubrica Knowledge Work (2022) [Online]. <https://pubrica.com/academy/experimental-design/experimental-study-design-research-types-of-design-methods-and-advantages/> [Erişim Tarihi:23 Kasım 2022].
76. Shalab Analysis of Variance (2022). [Online]. <https://home.iitk.ac.in/~shalab/anova/chapter8-anova-factorial-experiment.pdf> . [Erişim Tarihi:24 Kasım 2022].
77. Brown SD, Tauler R, Walczak B (2009). Comprehensive Chemometrics. Chemical and Biochemical Data Analysis. Sayfa 247-250.

78. Myers HR, Montgomery DC, Vining GG, Borror CM, Kowalski SM (2018). Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey. *Journal of Quality Technology* 36 (1) 53-77.
79. National Institute of Standards and Technology (2022). [Online]. Engineering Statistic Handbook. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm> .
[Erişim Tarihi:7 Aralık 2022].
80. National Institute of Standards and Technology (2022). [Online]. Engineering Statistic Handbook. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3362.htm>
[Erişim Tarihi:7 Aralık 2022].
81. National Institute of Standards and Technology (2022). [Online]. Engineering Statistic Handbook. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section7/pri7.htm#Rotatability>
[Erişim Tarihi:7 Aralık 2022].
82. National Institute of Standards and Technology (2022). [Online]. Engineering Statistic Handbook. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3363.htm>
[Erişim Tarihi:7 Aralık 2022].
83. Jackson CM, Esnouf MP, Winzor DJ, Duewer DL (2007). Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. *Accreditation and Quality Assurance* 12: 283–294.
84. Badem M (2019). *Barbarea Auriculata Var. Paludosa, B. Integrifolia ve B. Plantaginea (Brassicaceae)'nın* Biyokimyasal, Fitokimyasal Ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılıkta Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
85. Altan N, Dinçel AS, Koca C (2006). Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Turkish Journal of Biochemistry* 31: 51-56.

86. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry Cell Biology 39: 44-84.
87. Koca N, Karadeniz F (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri Gıda Mühendisliği Dergisi 32-35.
88. Halliwell B, Gutteridge JMC (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press. New York.
89. Commoner B, Townsend J, Pake GE (1954). Free radicals in biological materials. Nature 689-691.
90. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 4: 50-59.
91. Fang YZ, Yang S, Wu G (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 18: 872-879.
92. Fridovich I. (1989). Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. J Biol Chem 264:7761–7776.
93. Dai J, Mumper RJ (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15: 7313–7352.
94. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. Angew Chemie-Intl Ed 50: 586–621.
95. de Oliveira Silva E, Batista R (2017). Ferulic acid and naturally occurring compounds bearing a feruloyl moiety: a review on their structures, occurrence, and potential health benefits. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 16 (4): 580-616.
96. Ulaş N (2014). *Salvia staminea* bitkisinin uçucu bileşenlerinin GC-MS, headspace yöntemleri yoluyla analizi ve karşılaştırması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.
97. Albayrak S, Sağdıç O, Aksoy A (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 26: 401-409.

98. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity Food Science and Technology 28: 25-30.
99. Sanchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols Journal of the Science of Food and Agriculture. 76: 270-276.
100. Benzie IFF, Strain JJ (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology 299:15-27.
101. Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. Journal of agricultural and food chemistry 52(26): 7970-7981.
102. Özyürek M, Güçlü K, Apak R (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. TrAC Trends in Analytical Chemistry 30(4): 652-664.
103. Charai M, Faid M (1999). Chaouch A. Essential oils from aromatic plants as natural antioxidants for olive oil. J Essent Oil Res 11: 517-521.
104. Mechergui K, Coelho JA, Serra MC, Lamine SB, Boukhchina S, Khauja ML (2010). Essential oil of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* Ietswaart from Tunisia: Chemical composition and antioxidant activity. J Sci Food Agr 90: 1745-1749.
105. Sarac N, Ugur A, Duru ME, Varol O (2009). Antimicrobial activity, antioxidant activity and chemical composition of *Origanum onites* L. and *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (link) Ietswaart from Mugla (Turkey). Acta Hort 826: 397-403.
106. Dorman HJD, Bachmayer O, Kosar M, Hiltunen R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. J Agr Food Chem 52: 762-770.
107. Gest H (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, fellows of the royal society. Notes Rec. R. Soc. Lond 58(2): 187–201.

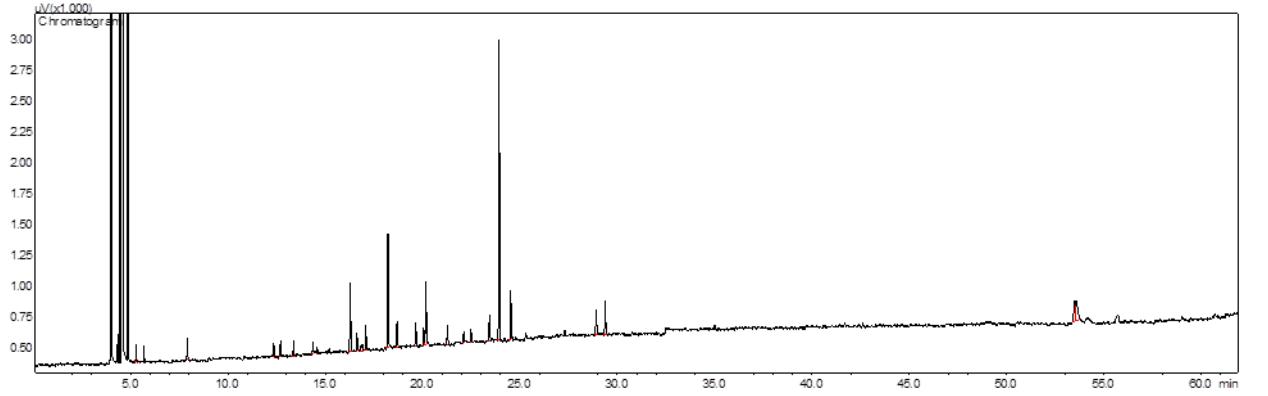
108. Hooke R (1665). Micrographia: or some Physiological Descriptions of Minute Bodies made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries thereupon. Printers to the Royal Society, London.
109. Leeuwenhoe AV (1696). The discovery of unicellular life The Collected Letters of Antonivan Leeuwenhoek 1673–1696.
110. Our World In Data (2022). [Online]. <https://ourworldindata.org/covid-deaths>. [Erişim Tarihi:6 Ocak 2023].
111. Kumar A, Schweizer HP (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. Advanced Drug Delivery Reviews 57: 1486–1513.
112. Microbiologics (2022) [Online]. https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=1758034&c=915960&h=f555e1fdf60b6138d07&_xt=.pdf .[Erişim Tarihi:6 Ocak 2023].
113. Özmen Süzme N (2016). Mikrobiyolojik disk difüzyon yöntemi ile elde edilen görüntülerin gerçek zamanlı görüntü işleme teknikleri ile analizi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elektrik Elektronik Mühendisliği, Afyon.
114. Sarer E, Pancali S, Yildiz S (1996). Chemical composition and antimicrobial properties of the essential oil of *O. minutiflorum* O.Schwarz et P.H. Davis. Ankara Üniversitesi Derg 25: 29-38.
115. Aslim B, Yucel N (2008). In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *O. minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* ssp. Food Chem 107: 602-606.
116. Dadalioglu I, Evrendilek GA (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish Oregano, Bay Laurel, Spanish Lavender and Fennel on common food borne pathogens. J Agr Food Chem 52: 8255-8260.
117. Oke F, Aslim B (2010). Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *O. minutiflorum*. Food Chem Toxicol 48: 1728-1733.
118. Penalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. APMIS 113: 1-6.

119. Baydar H, Sagdic O, Ozkan G, Karadogan T (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. Food Control 15: 169-172.
120. Sartorius (2023). [Online]. <https://www.sartorius.com/en/knowledge/science-snippets/the-history-of-chromatography-1101798#> [Erişim Tarihi 1.1.2023].
121. Curling J, Gottschalk U (2007). Process chromatography: Five decades of innovation. BioPharm International 20(10): 70–94.
122. StudiousGuy (2023). [Online]. <https://studiousguy.com/gas-chromatography-gc-working-principle-and-applications/> . [Erişim Tarihi: 3.01.2023].
123. McMaster MC (2008).GC/MS. A practical user's guide. Second Edition. John Wiley & Sons Inc.Canada. Sayfa 26.
124. Shimadzu (2023). [Online]. <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamentals/columns.html#:~:text=Two%20types%20of%20columns%20are%20packed%20columns%20and%20capillary%20columns.> [Erişim Tarihi: 3.01.2023].
125. Reliance Precision Austria (2023). [Online]. <https://www.relianceprecision.com.au/quadrupole-mass-filters>. [Erişim Tarihi: 3.01.2023].
126. Harley J, Nel W, Pretorius V (1958). Flame Ionization Detector for Gas Chromatography. Nature 181: 177-178.
127. McWilliam IG (1959). The comparison of detectors for gas chromatography 9(7): 379-388.
128. Harris DC (2010). Quantitative Chemical Analysis. Sekizinci Baskı. W. H. Freeman and Company. California. Sayfa 595-560.
129. Yıldırım S (2020). Yeni Nesil Kolonlar Kullanılarak Bazı Florokinolon Grubu Antibiyotiklerin Biyolojik Sıvılarda Eş Zamanlı Tayini İçin Sıvı Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Trabzon.

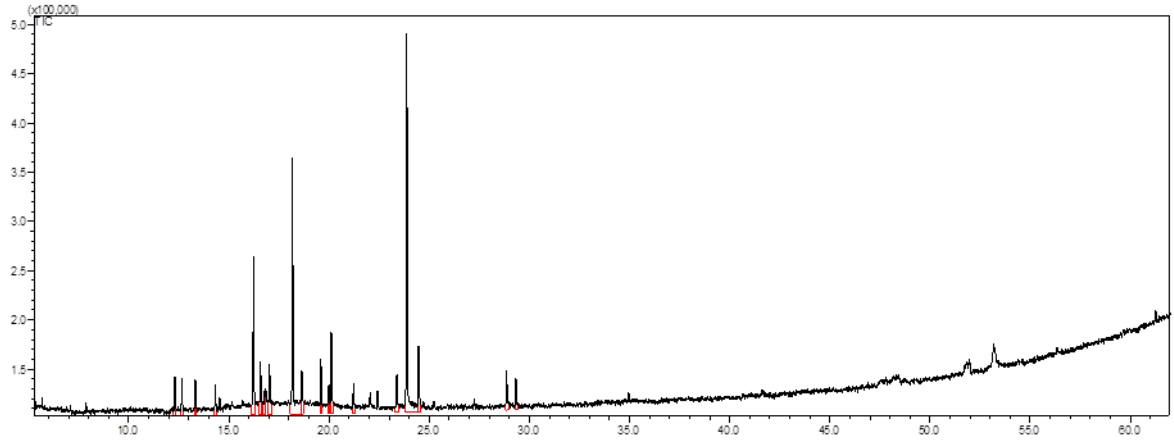
130. Brown JN, Hewins M, Van Der Linden JHM, Lynch RJ (1981). Solvent degassing and other factors affecting liquid chromatographic detector stability. *J Chromatogr A* 204: 115-122.
131. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW (2010). Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. John Wiley & Sons Publication, New Jersey; Sayfa: 88-196.
132. Aquadevice. Defoaming, Degassing Pump (2023). [Online]. https://www.aquadevice.com/english/03pump_asp1.htm . [Erişim Tarihi: 3.01.2023].
133. Fanali S, Haddad PR, Poole CF, Schoenmaker P, Lloyd D (2013). Liquid chromatography fundamentals and instrumentation. 1st ed. Elsevier, Massachusetts; Sayfa: 2-13.
134. LC Source. Getting Started in HPLC. (2023). [Online]. <http://www.lcresources.com/resources/getstart/o.htm> . [Erişim Tarihi: 3.01.2023].
135. Venn RF (2008). Principles and practice of bioanalysis. 2nd ed. CRC Press, Florida; Sayfa: 41-69.
136. Wysocki J, Dong MW (2019). Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America* 37(10):750-759.
137. ChromTech (2023).HPLC Columns [Online]. <https://www.chromtech.com/959990-902-eclipse-plus-c18-46x250mm5um> [Erişim Tarihi: 3.01.2023].
138. Bunjare MK, Behera K, Satnami ML, Pandey S, Ghosh KK (2018). Self-assembly of a short-chain ionic liquid with in deep eutectic solvents. *RSC Advance* 8: 7969-7979.
139. Gu C, Yang Z, Su S, Ma K, Nan X, Li Z, Lu D (2023). 4-Terpineol attenuates pulmonary vascular remodeling via suppressing PI3K/Akt signaling pathway in hypoxia-induced pulmonary hypertension rats. *Toxicology and applied pharmacology* 473:116596.
140. Zhao X, Wu H, Yue S, Chen X, Huang Y, Cao H, Liao M (2023). Role of CYP6MS subfamily enzymes in detoxification of Sitophilus zeamais after exposure to terpinen-4-ol and limonene. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 193: 105426.

EKLER

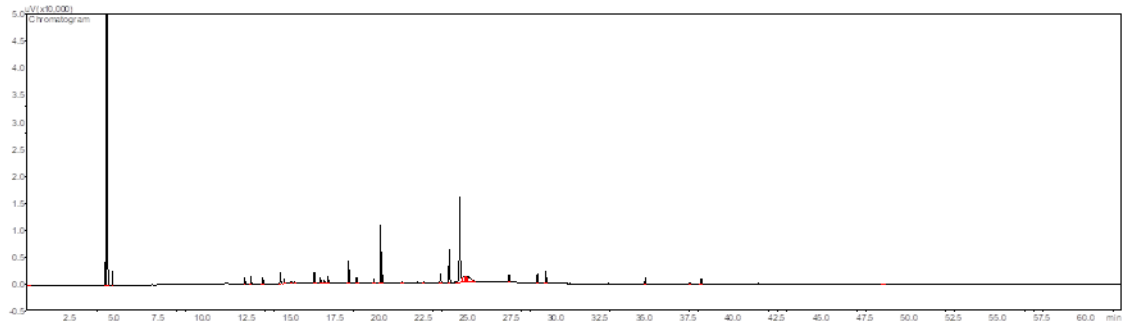
EK 1. *O. micranthum* Bitkinin FID Kromatogramı



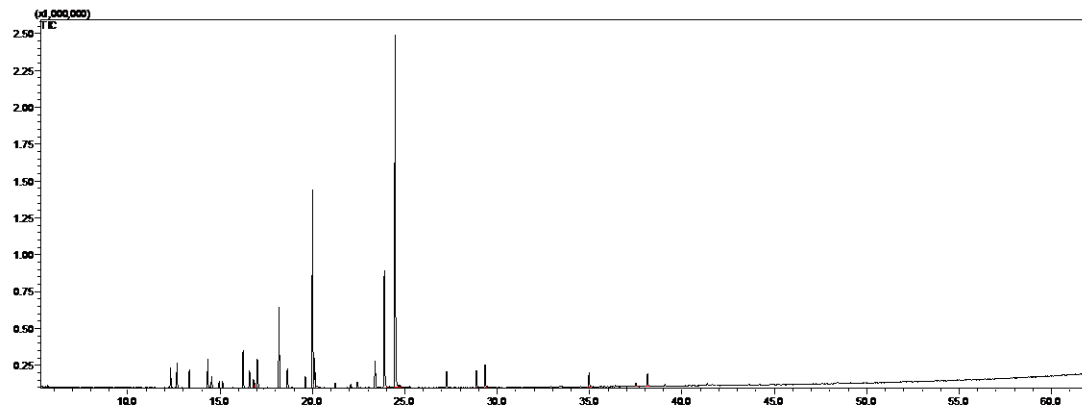
EK 2. *O. micranthum* Bitkinin MS Kromatogramı



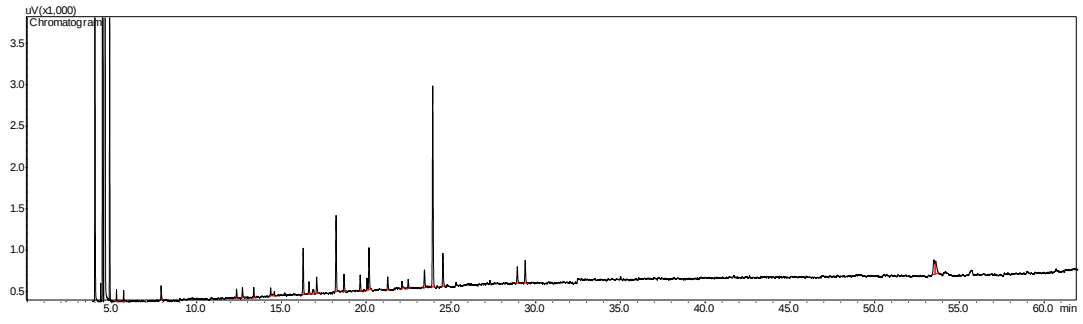
EK 3. *O. minutiflorum* O. Schwarz & PH. Davis Bitkisinin FID Kromatogramı



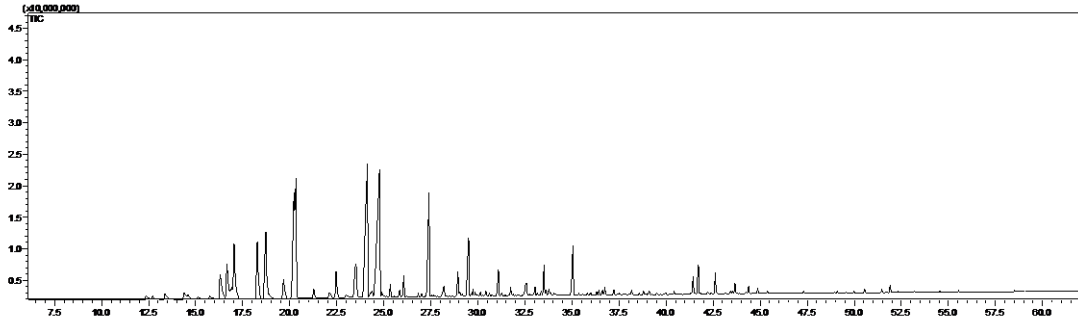
EK 4. *O. minutiflorum* O. Schwarz & PH. Davis Bitkisinin MS Kromatogramı



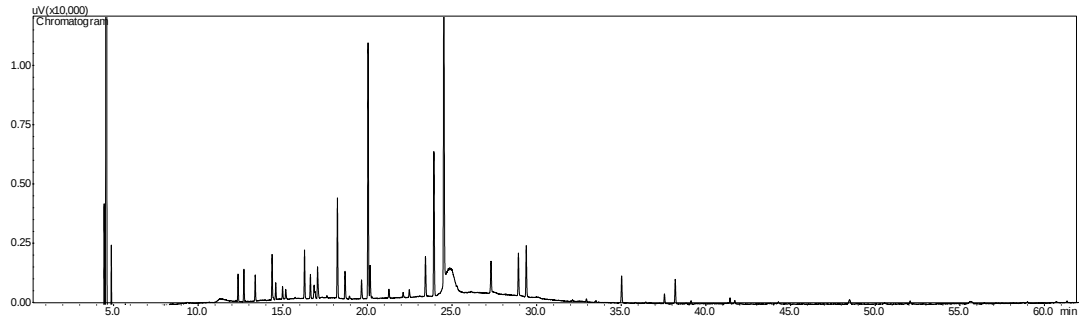
EK 5. Ön Muameleli *O. micranthum* Bitkinin FID Kromatogramı



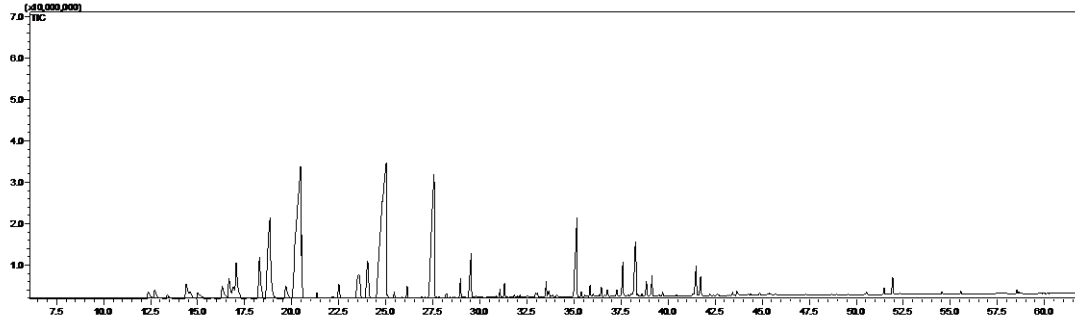
EK 6. Ön Muameleli *O. micranthum* Bitkinin MS Kromatogramı



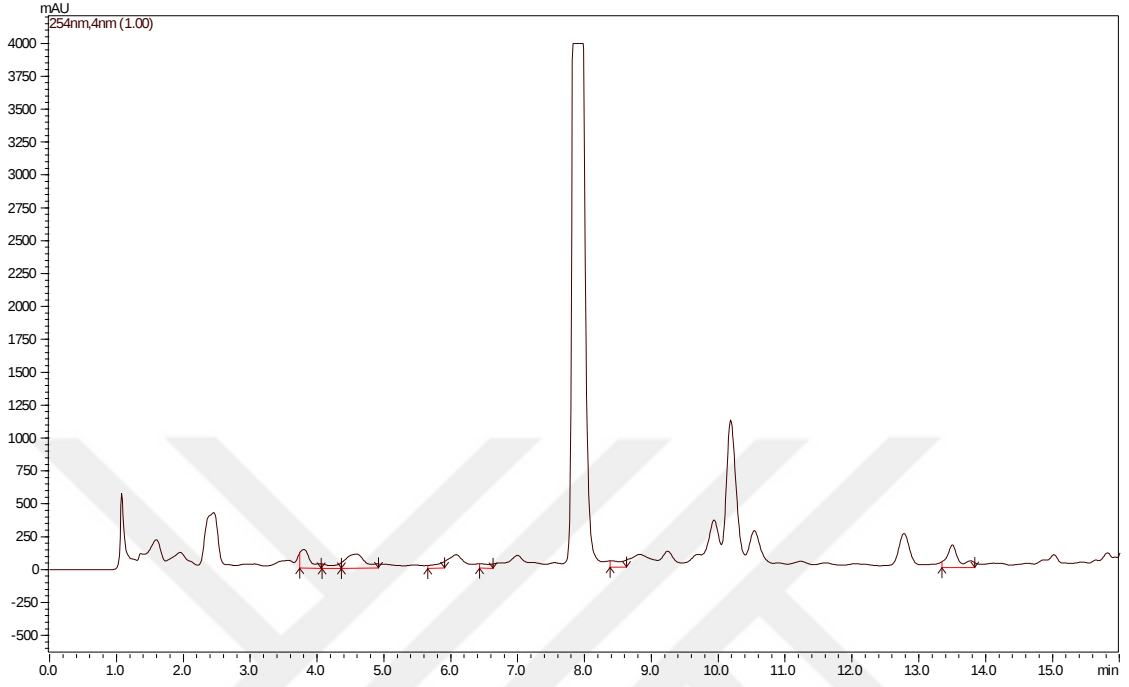
**EK 7. Önmüameleli *O. minutiflorum* O.Schwarz & PH Davis Bitkisinin FID
Kromatogramı**



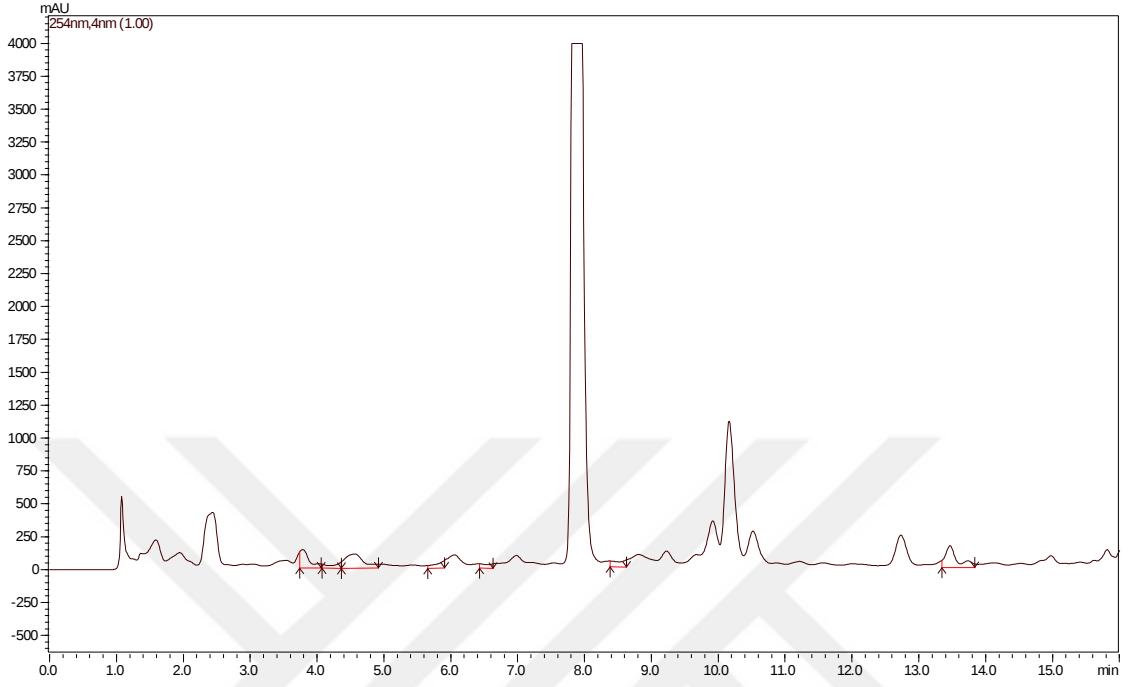
**EK 8. Önmüameleli *O. minutiflorum* O.Schwarz & PH Davis Bitkisinin MS
Kromatogramı**



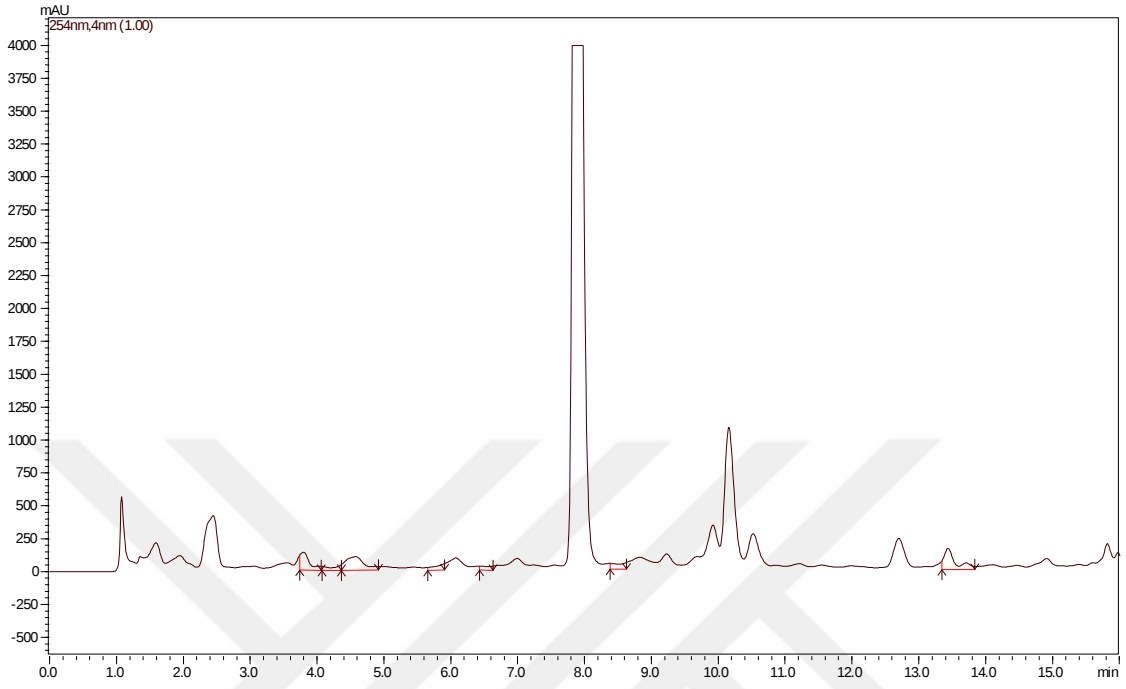
EK 9. *O. micranthum* Bitkisinin d1 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



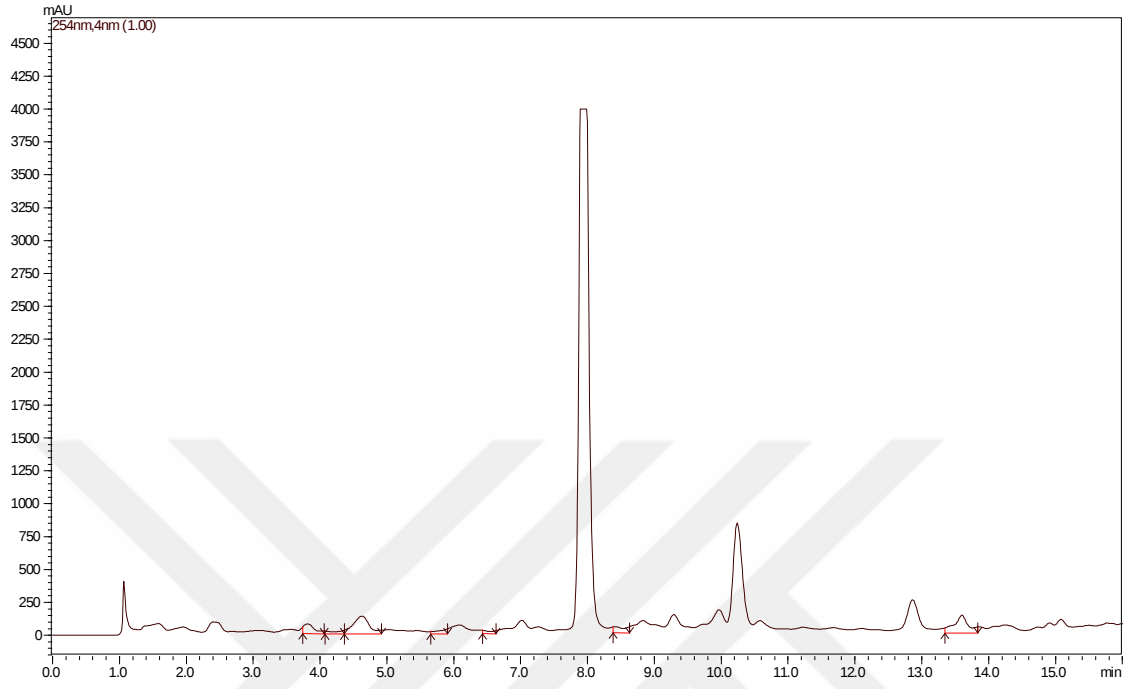
EK 10. *O. micranthum* Bitkisinin d2 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



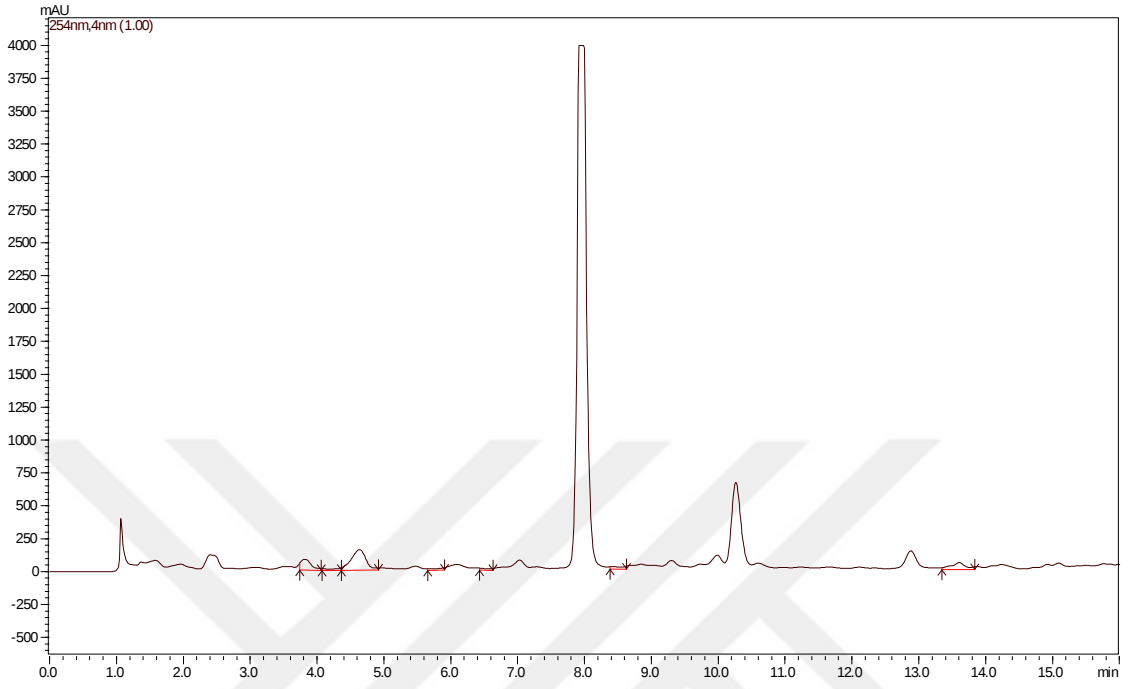
EK 11. *O. micranthum* Bitkisinin d3 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



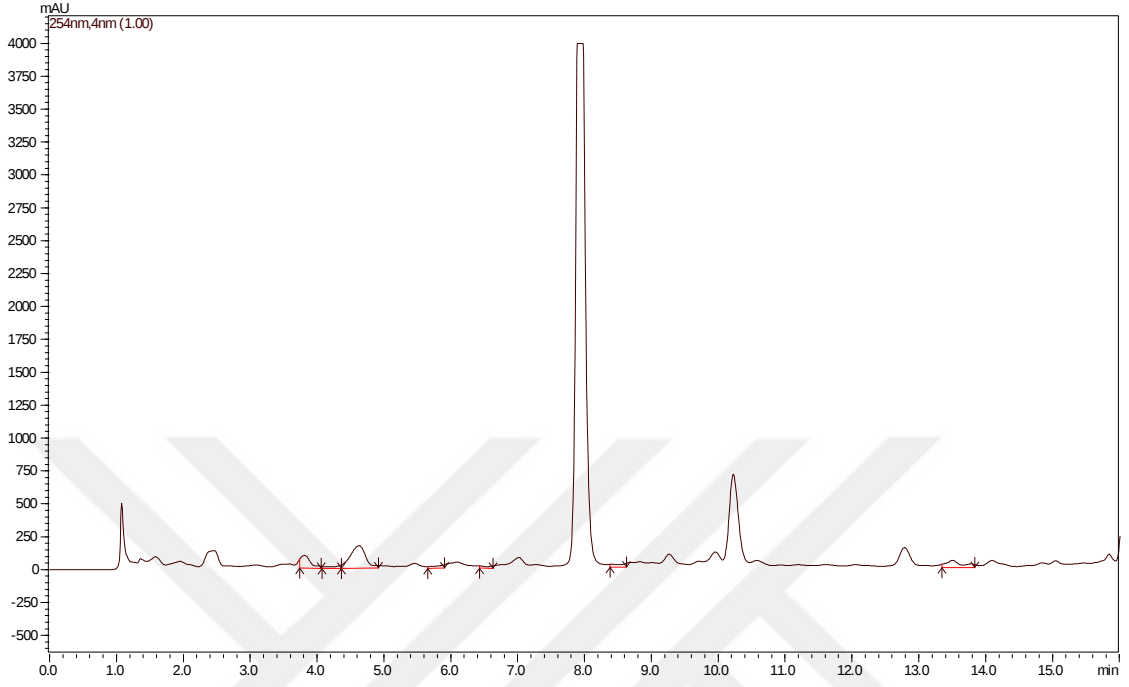
EK 12. *O. micranthum* Bitkisinin 24 Saat Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



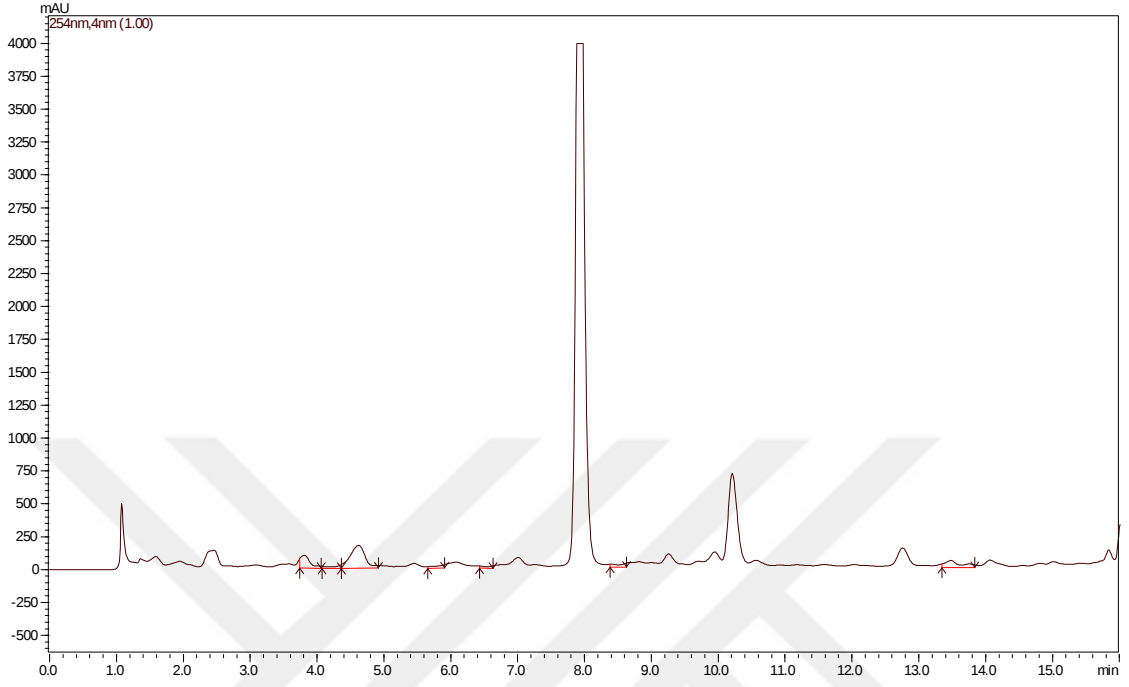
EK 13. *O. micranthum* Bitkisinin MW Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



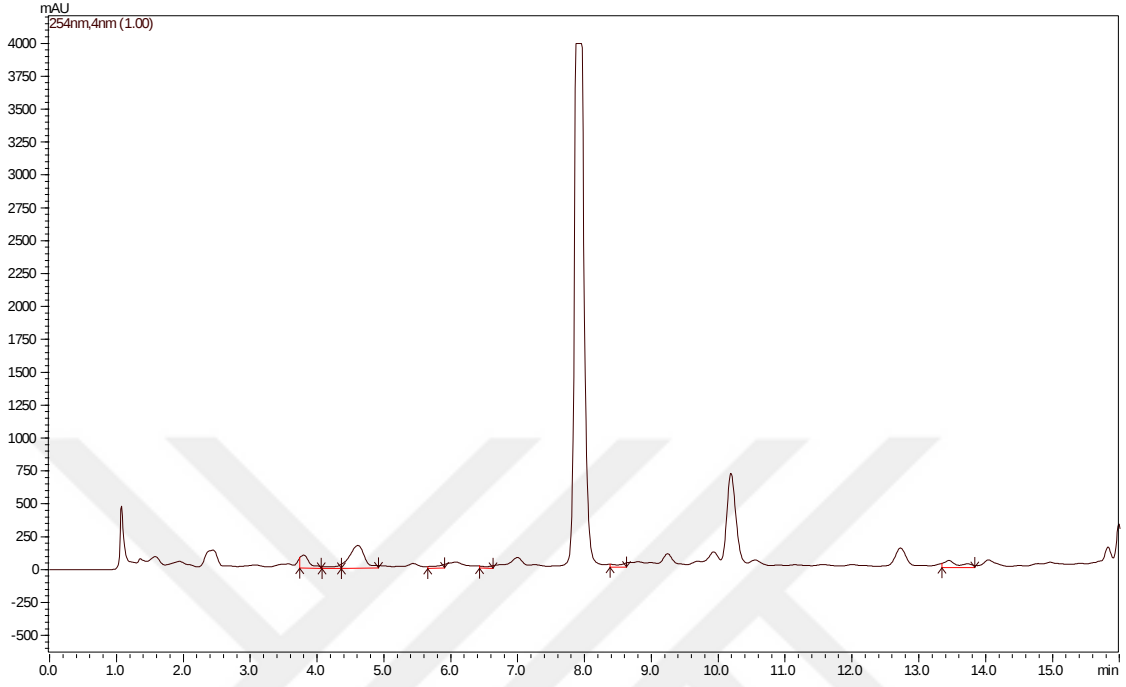
EK 14. *O. minutiflorum*'in Bitkisinin d1 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



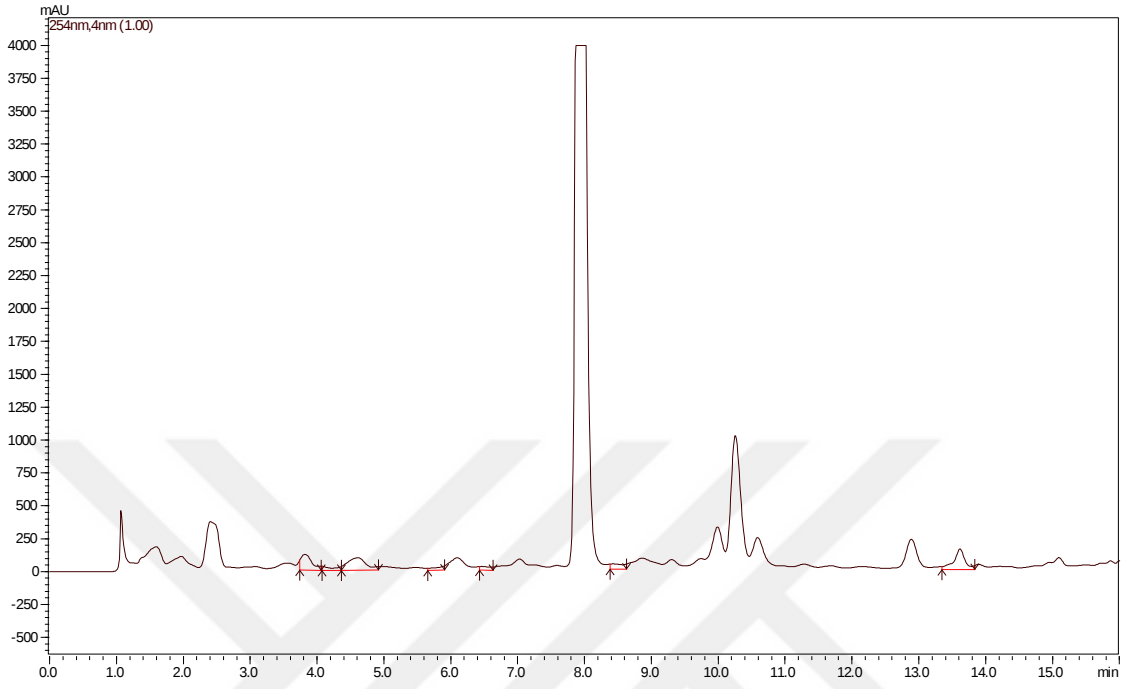
EK 15. *O. minutiflorum*'in Bitkisinin d2 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



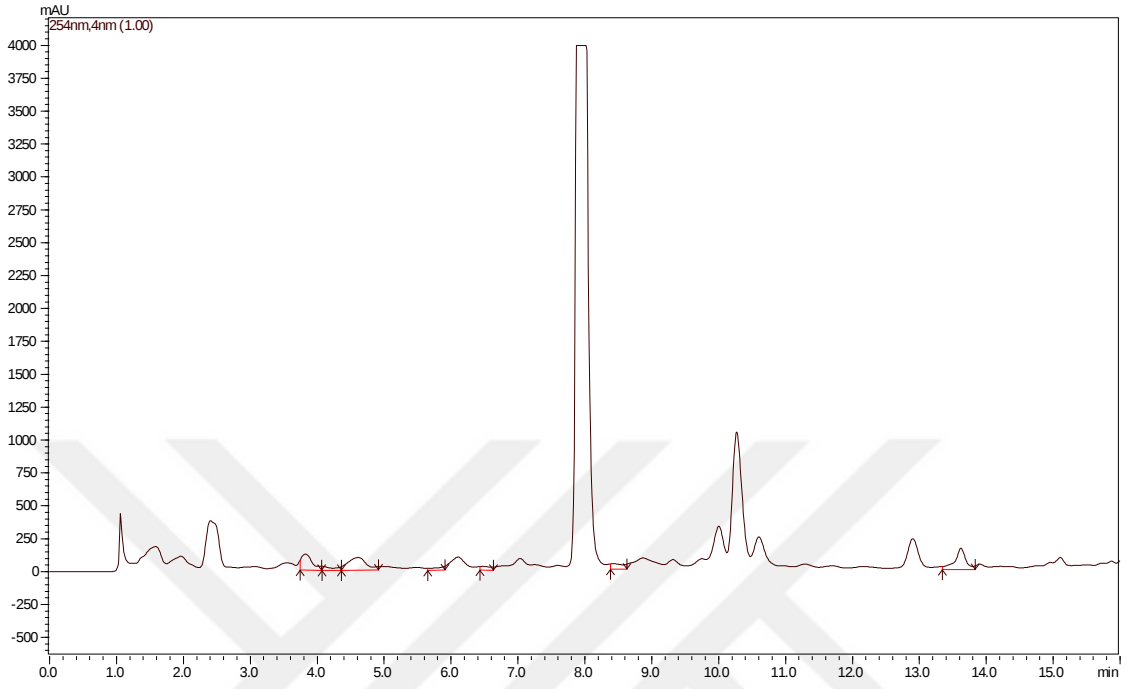
EK 16. *O. minutiflorum*'in Bitkisinin d3 Kodlu Derin Ötektik Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



EK 17. *O. minutiflorum*'in Bitkisinin 24 Saat Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



EK 18. *O. minutiflorum*'in Bitkisinin MW Kodlu Çözücüyle Elde Edilen Ekstrelerin HPLC Kromatogramı



Technologies 41: 66–72.

- 3 Çolak NU, Yıldırım S, Bozdeveci A, Yaylı N, Çoşkunçelebi K, Fandaklı S, Yaşar A (2018). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia staminea*. Records of Natural Products 12: 86–94.
- 4 Kanbolat Ş, Korkmaz N, Şener SÖ, Badem M, Ulas Colak N, Abudayyak M, Aliyazıcıoğlu R, Özgen U, Kandemir A, Karaoğlu SA (2018) Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, Anticholinesterase, Antityrosinase Activities and Characterisation of Volatile Compounds of *Verbascum oocarpum* by SPME and GC-FID/MS Journal Of Pharmaceutical Research International, 24 (4):1-12
- 5 Fandaklı S, Yaylı N, Kahriman N, Uzunalioglu E, Ulaş Çolak N, Yıldırım S, Yasar A (2019). The Chemical Composition of Volatile Oil and Biological Activity of *Rhododendron caucasicum*. Records of Natural Products 13: 316–323.
- 6 Yıldırım B, Aydın BM, Ulaş Çolak N, Altay A, Yaşar A (2022). Fluorescence interactions of a novel chalcone derivative with membrane model systems and human serum albumin. Biophysical Chemistry 290:106879.
- 7 Şener SÖ, Badem M, Catalbaş M, Kanbolat Ş, Özgen U, Ulas Colak N(2023). Investigation of the Therapeutic Value of *Verbascum pyramidatum* Bieb. for Obesity. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry.

BİLDİRİLER

- 1 Özgen U, Aliyazıcıoğlu R, Şener SÖ, Badem M, Yıldırım S, Ulaş N (2015). HPLC fingerprint analysis and quantification of phenolic compounds in some endemic *Cirsium* species. International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 9-12 Haziran 2015, 389-390.
- 2 Ulaş Çolak N, Yaşar A, Çoşkunçelebi K(2016). Trabzon Yöresinde Yetişen *Primula* Türlerinin Uçucu Bileşenlerinin GCMS-Head Space-SPME ile Belirlenmesi. 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Isparta, Türkiye, 30 Mayıs - 03 Haziran 2016, cilt.8, ss.134.
- 3 Fandaklı S, Ulaş Çolak N, Barut B, Yaşar A, Kahriman N, Özel A, Yaylı N (2016). *Senecio macrophyllus* M. Bieb. Bitkisinin GC-MS ve GC-FID Analizi, Uçucu Yağ, Metanol ve Sulu ekstraktlarının Biyolojik aktivitelerinin incelenmesi. 22. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Trabzon, Türkiye, 31 Ağustos 2016 - 05 Şubat 2017, cilt.22, ss.75.
- 4 Yaşar A, Ulaş Çolak N, Yıldırım S (2016). DNA'nın Ant Boyar Maddesi ile

Boyanması. 16. Kromatografi Kongresi, Malatya, Türkiye, 31 Ağustos - 02 Eylül 2016,41.

- 5 Yıldırım S, Ulaş Çolak N, Yaşar A (2017). Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of donepezil in urine by HPLC using a core-shell column. 3rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, Erzurum, 5-7 Ekim 2017, 82.
- 6 Kar T, Cüce E, Kaygusuz K, Ulaş Çolak N (2022). Biomass-lignite gasification; analysis of liquid by-products. 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022), November 23-25,370
- 7 Ulaş Çolak N, Kanbolat Ş, Badem M, Şener SÖ, Özgen U, Yaşar A (2023). Two-step Microwave Extraction with NADES and Biological Activity Comparison of Origanum michrantum and Origanum minutiflorum Plants. 33rd International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2023), July 2-6, 88.

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

-

HOBİLER

Sinema, Tiyatro

Piknik, Ailemle kaliteli zaman geçirmek.