

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



**BİBERİYENİN YAĞ BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI
BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

ENGİN NARLIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Baki ÇİÇEK (Tez Danışmanı)
Öğr. Gör. Dr. Ümit ÇALIŞIR (Eş Danışman)
Prof. Dr. Akın AZİZOĞLU
Prof. Dr. Gani KOZA

BALIKESİR, HAZİRAN - 2024

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımda hazırlanan “**Biberiyenin yağ bileşenlerinin belirlenmesi ve bazı biyolojik özelliklerinin incelenmesi**” başlıklı tezde;

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

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

Engin NARLIOĞLU

ÖZET

**BİBERİYENİN YAĞ BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ENGİN NARLIOĞLU
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR.BAKİ ÇİÇEK)
(EŞ DANIŞMAN: ÖĞR. GÖR. DR. ÜMİT ÇALIŞIR)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2024**

Biberiye Orta Çağdan günümüze başta tıp olmak üzere parfüm, gıda, ilaç, vb. birçok alanda kullanıldığı tarihi kaynaklardan bilinmektedir. Özellikle tıpta antioksidan, antikanser, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antifungal, yara iyileştirici, vb. birçok kullanımı mevcuttur. Biberiyenin birçok kullanımı antioksidan özelliklerinin sayesinde gerçekleşmektedir. Antioksidan özelliklerinin kaynakları arasında ise içerdiği, karnosik asit, karnosol, kafeik asit, rosmarinik asit sebebiyle gerçekleşmektedir. Biberiyenin yağları ise oldukça popüler olup, başlıca antioksidan olarak kullanıma sahiptir. Bu çalışma kapsamında Bandırma- Balıkesir yöresinden Eylül ayı içerisinde toplanan biberiye örneklerinin sabit yağları ve uçucu yağları soxhlet ve Clevenger ekstraksiyon sistemleri kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen yağların karakterizasyonu GC-MS yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Biyolojik özelliklerinin incelenmesi ise DNA koruma aktivitesi tespiti, antioksidan analizleri; DPPH yöntemi, toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarı, CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışma, Fitokimya literatürüne birçok konuda yararlı katkılar sağlamıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Biberiye, Sabit yağ, Uçucu yağ, Soxhlet ekstraksiyonu, DNA Koruma Aktivitesi, GC-MS, Antioksidan

ABSTRACT

DETERMINATION OF OIL COMPONENTS OF ROSEMARY AND EXAMINATION OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES

MSC THESIS

ENGİN NARLIOĞLU

**BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY**

(SUPERVISOR: PROF. DR. BAKİ ÇİÇEK)

(CO-SUPERVISOR: LECTURER DR. ÜMİT ÇALIŞIR)

BALIKESİR, JUNE - 2024

Rosemary has been used in medicine, perfume, food, medicine, etc. from the Middle Ages to the present day. It is known from historical sources that it is used in many areas. Especially in medicine, it is used as antioxidant, anticancer, antidiabetic, anti-inflammatory, antimicrobial, antifungal, wound healing, etc. It has many uses. Many uses of rosemary are thanks to its antioxidant properties. Among the sources of its antioxidant properties are the carnosic acid, carnosol, caffeic acid and rosmarinic acid it contains. Rosemary oils are very popular and are used primarily as antioxidants. Within the scope of this study, volatile oils and essential oils of rosemary samples collected from Bandırma-Balıkesir region in September were obtained using soxhlet and Clevenger extraction systems. Characterization of the obtained oils was carried out by GC-MS methods. Examination of biological properties includes DNA protection activity detection, antioxidant analysis; The amount of total phenolic substances total flavonoids, DPPH radical assay and the CUPRAC method. This study has made useful contributions to the Phytochemistry literature on many subjects.

KEYWORDS: Rosemary, Essential oil, Volatile oil, Soxhlet extraction, DNA Protection Activity, GC-MS, Antioxidant.

Science Code / Codes : 20114, 20107

Page Number : 65

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL ve KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
1. GİRİŞ	1
2. BİBERİYE (<i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i>) VE ÖZELLİKLERİ.....	2
2.1 Biberiye Bitkisi ve Özellikleri	2
2.2 Biberiye Yağı ve Özellikleri	3
2.2.1 Biberiye Yağı Bileşenleri	3
2.2.2 Uçucu Yağ Bileşenleri	4
2.3 Biberiyenin Antioksidan Etken Bileşenleri	6
2.3.1 Biberiyenin Antioksidan Aktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar	8
2.4 DNA Koruma Aktivitesi İle İlgili Yapılan Çalışmalar	11
2.6 GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi) Analiz Metodu.....	12
2.7 Uçucu Yağların Bileşenlerin Analizinde GC-MS Yöntemi	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1 Materyal	15
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Numunelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	15
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Alet Ekipmanlar	15
3.2 Yöntem.....	16
3.2.1 Bitkisel Materyalin Hidrodistilasyonu	16
3.2.2 Bitkisel Materyalin Ekstraksiyonu	17
3.2.3 GC-MS Analizi	19
3.2.3.1 Uçucu Yağ Bileşenleri Tayini	19
3.2.3.2 Sabit Yağ Bileşenleri Tayini	19
3.2.4 DNA Koruma Aktivitesi Tayini	20
3.2.5 Antioksidan Aktivitesi Tayin Yöntemleri	20
3.2.5.1 DPPH Radikalini Radikal Süpürme Yöntemi	20
3.2.5.2 Toplam Fenolik Madde Analizi	21
3.2.5.3 Toplam Flavonoid Analizi.....	21
3.2.5.4 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	22
4. BULGULAR.....	23
4.1 Elde Edilen Uçucu Yağ Ve Sabit Yağ Miktarları	23
4.1.1 Uçucu Yağ Verimi	23
4.2 GC-MS ANALİZİ.....	24
4.2.1 Uçucu Yağ Bileşenleri Analizi.....	24
4.2.2 Sabit Yağ Bileşenleri Analizi	34
4.3 Elde Edilen Sabit Yağ ve Uçucu Yağ Numunelerinin DNA Koruma Etkisi.....	46
4.4 Antioksidan Aktivite Tayini	47
4.4.1 DPPH Yöntemi	47

4.4.2 Toplam Flavonoid Analizi	47
4.4.3 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini	48
4.4.4 Toplam Fenolik Madde Analizi	49
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	50
6. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Biberiyenin antioksidan etkili bileşenleri.	7
Şekil 2.2: Biberiye yapraklarında bulunan ana bileşiklerin kimyasal yapıları, antioksidanlar (rosmarinik asit, karnosik asit ve karnosol) ve uçucu yağlara (kafur, 1,8-sineol, α -pinen, borneol ve α -terpineol) bölünmüştür. a) Antioksidan, b) Esansiyel yağ.....	9
Şekil 2.3: DPPH radikali (mor) ile nötrleştirilmiş DPPH molekülünü (turuncu) veren bir antioksidan arasındaki reaksiyon. Karşılık gelen UV/VIS spektrumları da gösterilmektedir. Reaksiyon sırasında 518 nm'de absorbansta önemli bir azalma görülür ve reaksiyonu takip etmek için kullanılabilir.	11
Şekil 2.4: Gaz kromatografisinin bölümleri.....	13
Şekil 3.1: Toplanan biberiye numuneleri.	15
Şekil 3.2: Toplanan biberiyenin öğütülmesi.	16
Şekil 3.3: Clevenger cihazında safsu ile biberiye örneği.	17
Şekil 3.4: Sokslet ekstraktöründe sabit yağların eldesi.....	18
Şekil 3.5: Biberiye sabit yağı-hegzan karışımı evaporasyon işlemi.	18
Şekil 3.6: DPPH• radikalının indirgenmesi ile serbest radikal giderimi.	21
Şekil 4.1: Biberiye uçucu yağ GC-MS kromatogramı.	24
Şekil 4.2: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan α -pinen bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	25
Şekil 4.3: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan 2,4(10)-Thujadien bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	25
Şekil 4.4: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan β -Pinen ve β -Mirsen bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	26
Şekil 4.5: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan α -terpinen ve/veya α -Terpineol bileşeninin GC-MS kromatogramı.	27
Şekil 4.6: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan 1,8-Sineol bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	27
Şekil 4.7: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan o-Simen ve p-Simen bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	28
Şekil 4.8: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan kafur bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	29
Şekil 4.9: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan karyofililen bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	29
Şekil 4.10: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan borneol bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	30
Şekil 4.11: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan levoverbenon bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	31
Şekil 4.12: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan α -terpinen bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	34
Şekil 4.13: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan 1,8-sineol bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	35
Şekil 4.14: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan p-simen bileşeninin GC-MS kromatogramı.....	36
Şekil 4.15: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan kafur bileşeninin GC-MS kromatogram.....	37

Şekil 4.16: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan karyofililen bileşenin GC-MS kromatogramı.....	38
Şekil 4.17: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan dokozen bileşenin GC-MS kromatogramı.....	39
Şekil 4.18: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan palmitik asit metil ester (C16:0) bileşenin GC-MS kromatogramı.	40
Şekil 4.19: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan palmitoleik asit metil ester (C16:1) bileşenin GC-MS kromatogramı.	41
Şekil 4.20: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan oleik asit metil ester bileşenin GC-MS kromatogramı.....	42
Şekil 4.21: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan linoleik asit ester bileşenin GC-MS kromatogramı.....	43
Şekil 4.22: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan γ -linoleik asit metil ester bileşenin GC-MS kromatogramı.....	44
Şekil 4.23: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan heptakosan bileşenin GC-MS kromatogramı.....	45
Şekil 4.24: Agaroz jel elektroforezi ile H ₂ O ₂ kaynaklı Plazmid DNA hasarı analizinde biberiye sabit yağlarının ve uçucu yağlarının etkisi (1; negatif (plazmit + su), 2; pozitif (plazmit + su + fenton), 3; 1 mg mL ⁻¹ kuersetin, 4; 1 mg mL ⁻¹ kuersetin + fenton, 5; 1 mg mL ⁻¹ uçucu yağ, 6; 1 mg mL ⁻¹ uçucu yağ + fenton, 7; 1 mg mL ⁻¹ sabit yağ, 8; 1 mg mL ⁻¹ sabit yağ + fenton.	46
Şekil 4.25: DPPH antioksidan analizinde kullanılan askorbik asit ve troloks için standart kalibrasyon eğrileri.	47
Şekil 4.26: Toplam flavonoid analizi kuersetin standart kalibrasyon eğrisi.	47
Şekil 4.27: CUPRAC yöntemi: Toplam antioksidan analizi askorbik asit ve troloks kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.28: Toplam fenolik madde analizi gallik asit standart kalibrasyon eğrisi.	49

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Yağ eldesinde kullanılan yöntemler.	4
Tablo 3.1: Biberiye bitkisi miktarına göre kullanılan saf su miktarı.	17
Tablo 4.1: Biberiye bitkisi miktarına göre elde edilen sabit yağ miktarı ve kullanılan çözücü.	23
Tablo 4.2: Biberiye bitkisi miktarına göre elde edilen uçucu yağ miktarı.	23
Tablo 4.3: Biberiye bitkisinin uçucu yağ GC-MS bileşenleri.	32
Tablo 4.4: Uçucu yağ kimyasal bileşenleri molekül şekilleri.	33
Tablo 4.5: Biberiye bitkisinin sabit yağ GC-MS bileşenleri.	46
Tablo 4.6: Örneklerin DPPH yöntemi ile elde edilen antioksidan miktarları	47
Tablo 4.7: Örneklerin toplam flavonoid miktarı, antioksidan miktarı.....	47
Tablo 4.8: Örneklerin antioksidan aktivitesi (Cu (II) İyonu İndirgeyici antioksidan kapasite, CUPRAC).	48
Tablo 4.9: Örneklerin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan miktarı.	49

SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ

Semboller:

kg	: Kilogram
g	: Gram
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
l	: Litre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
rpm	: Revolution per minute
°C	: Celcius derecesi

Kısaltmalar:

REO	: Biberiye esansiyel yağı
EMA	: Avrupa ilaç ajansı
DPPH	: 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil
AOA	: Antioksidan aktivite
AO	: Antioksidan
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
MDA	: Malondialdehit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
UV	: Ultraviyole
DMBA	: 7,12-dimetil benzantrasen
CAc	: fenolik diterpen karnosik asit
RAc	: fenolik rosmarinik asit
CA	: Karnosol
BER	: Baz eksizyon onarımı
NER	: Nükleotid eksizyon onarımı

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinden başlayarak, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam danışmanım Prof. Dr. Baki ÇİÇEK'e teşekkür, sevgi, saygı ve hürmetlerimi sunuyorum.

Tez süresince çalışmalarımı takip eden ve yönlendiren Öğr. Gör. Dr. Ümit ÇALIŞIR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen Kurtsan İlaçları A.Ş.'ye teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Biberiye bitki numuneleri sınıflandırılmasında bilgi ve birimlerinden faydalandığım Doç. Dr. Taner Özcan'a teşekkürlerimi iletirim.

Akademik anlamda yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan değerli eşim Sinem NARLIOĞLU'na, manevi desteklerini her zaman hissettiğim kızım Elif Ada'ya ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Balıkesir, 2024

Engin NARLIOĞLU

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihi boyunca yapısında uçucu yağ bulunan bitkiler genel olarak gıdaların raf ömrünü uzatmak ve saklamak için tercih edilmiştir. Son zamanlarda ise gıdalara tat ve koku vermesi açısından kullanılmıştır. Bilim geliştikçede saklama koşulları, gıdaların raf ömürlerini uzatma konuları araştırılmıştır [1]. Bitki özleri ve baharatlar, antikanser, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleriyle insan yaşam kalitesini ve sağlığını iyileştirmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Gıda sektöründe, koruyucu etkilerinden dolayı her geçen gün ilgi odağı olmaktadır. Bitkilerden elde edilen uçucu yağların çoğunun böcek öldürücü, antifungal özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle farmakoloji, farmasötik botanik, tıbbi ve klinik mikrobiyoloji, fitopatoloji ve gıda muhafaza alanlarında yoğun bir şekilde uygulanmaktadır [2]. Biberiye yoğun, aromatik ve yaprak dökmeyen çok yıllık küçük bir çalıdır. Anavatanı Akdeniz bölgeleridir. Anaromatik bir tür olan biberiye, kullanılan kısımlar arasında yapraklar ve uçucu yağ bulunur [3]. Biberiye şifalı bitki olarak, etkinliği büyük ölçüde kabul edilen ve aslında birçok ülkenin resmi Farmakopesi'nde listelenen şifalı bitkiler havuzunda yer almaktadır. Biberiye; hafızayı iyileştirici bir araç, nörodejeneratif hastalıklara [4] ve hipertansiyona karşı bir ajan [5], antidepresan [6], antikanser, antiinflamatuvar [7], antimikrobiyal [3, 8, 9, 10], antioksidan [11, 12], vb. çeşitli farmakolojik özellikler sergilemektedir. Bu son özelliğe ilişkin olarak, biberiye, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yağ ve suyla karışabilen formülasyonlar halinde pazarlanan, ticari antioksidan türevlerinin kaynağı olarak kullanılan tek bitki türüdür [13].

2. BİBERİYE (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) VE ÖZELLİKLERİ

2.1 Biberiye Bitkisi ve Özellikleri

Latince adı: *Rosmarinus officinalis*

İngilizce adı: *Rosemary leaf*

Familyası: *Lamiaceae* (Ballıbabagiller)

Orijin ülke: Anayurdu Akdeniz Bölgesidir. Portekiz, Fransa ve bazı Avrupa ülkelerinde bulunur. Lamiaceae/Labiatae familyasının önemli bir türü olan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisi, Akdeniz bölgesinde doğal olarak yetişen tıbbi ve aromatik bir bitkidir [14, 15]. *Rosmarinus* cinsi dünyanın farklı yerlerinde yayılış gösteren *R. officinalis*, *R. laxiflorus*, *R. eriocalyx* ve *R. lavandulaceus* türlerine sahiptir. *R. officinalis*'in *erectus*, *humilis* ve *albiflorus* çeşitleri vardır [16]. Biberiye, güçlü bir ana kök ve 50-100 cm bitki boyu, iğne şeklinde yaprakları ve soluk mavi çiçekleri olan, her zaman yeşil kalan, çok yıllık, çalı formunda ve çapraz döllenme bitkisidir [17]. Biberiye bitkisinin yaprakları baharat ve bitkisel çay karışımları olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda biberiyeden elde edilen uçucu yağ parfüm, gıda ve ilaç sanayinde kullanılmaktadır [18]. Ayrıca biberiye aromaterapi ve halk hekimliğinde yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra dünyanın farklı bölgelerinde süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır [19, 20]. Biberiye, farmakolojik özellikleri iyi tespit edilmiş tıbbi bir bitkidir. Antioksidan, anti-kanser, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antifungal, antimutajenik, antispazmodik, yara iyileştirici, saç kılcal damarlarını güçlendiren ve karaciğeri koruyan bir maddedir [18, 21]. Yunanistan, Portekiz, İspanya, Fransa gibi ülkelerde, uçucu yağların gıda, parfüm, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanım talebini karşılamak amacıyla biberiye yetiştirilmektedir [18]. Pek çok ülke biberiye ihtiyacını doğal bitkilerden toplayarak karşılamaktadır. Türkiye'de Mersin ve Adana'nın doğal bitki örtüsünden toplanan biberiye iç ve dış pazara sunulmaktadır. Biberiye, bitkiden elde edilen uçucu yağa yönelik endüstriyel talep nedeniyle son yıllarda önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olarak dikkat çekmektedir. Biberiyenin hem uçucu yağına hem de ilaçlı yapraklarına olan bu talebin karşılanması amacıyla bitkinin tarla koşullarında yetiştirilmesi giderek önem kazanmaktadır. Geleneksel tıpta biberiye, uyarıcı ve hafif bir analjezik olarak kullanılmış olup, baş ağrısı, zayıf kan dolaşımı, iltihabi hastalıklar ve iltihapların tedavisinde en etkili bitkilerden biri olarak kabul edilmiştir. Biberiye aynı zamanda halk hekimliğinde koleretik ve hepatoprotektif bir ajan olarak ampirik olarak da kullanılmıştır [22].

2.2 Biberiye Yağı ve Özellikleri

Biberiyenin farmakolojik etkilerinin çoğu, karnosol, karnosik asit, ursolik asit, rosmarinik asit ve kafeik asit gibi ana kimyasal bileşenlerinin yüksek antioksidan aktivitesinin sonucudur.

Biberiye esansiyel yağı, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle, gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatabilir ve depolama sırasında kalitesini koruyabilir. Bu nedenle gıda endüstrisinde biyokoruyucu olarak halihazırda kullanılmaktadır [23].

2.2.1 Biberiye Yağı Bileşenleri

Biberiye esansiyel yağlarının kimyasal bileşiminde coğrafi kökene bağlı olarak önemli farklılıklar olduğu rapor edilmiştir [24]. Ayrıca, doğal popülasyonlardan elde edilen biberiye yağlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinde de farklılıklar tespit edilmiştir. Son varyasyonların bölgesel, çevresel ve tarımsal koşullara, hasat zamanına, bitkilerin gelişim aşamasına, ekstraksiyon yöntemine ve bunların değerlendirilmesinde kullanılan metodolojilere bağlı olduğu bulunmuştur [25, 26, 27].

Biberiyenin farmakolojik olarak onaylanmış tıbbi özellikleri arasında antibakteriyel ve antioksidan [28, 29], antiviral, antiinflamatuvar [30], antifungal, antidepresan [31] ve kanser hücrelerine karşı antiproliferatif etkiler, genotoksisitenin olmaması ve trombin süresini uzatma yeteneği yer alır [32]. Spesifik olarak esansiyel yağların eklenmesi, salam ve taze tavuk gibi et ürünlerinin işlenmesinde ve depolanmasında oksidatif süreçleri etkili bir şekilde engelleyebilir ve ürünün organoleptik özelliklerini koruyabilmektedir [33]. Biberiye ekstraktlarına gelince, antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler; fenolik asitler, flavonoidler ve terpenoidler ve özellikle karnosik asit ve rosmarinik asitler içermektedir [34, 35].

Biberiye yağı içerisinde, sinematoliferum (1,8-sineolde yüksek içerik), kamforiferum (kafur; %20) ve verbenoni-ferum (verbenon; %15) başlıca bileşenleri içermektedir. Diğer bileşenler ise α -pinen, mirsen, vb. olarak verilebilir [36, 37]. Biberiye esansiyel yağı (REO), bitkinin karakteristik kokusuna sahip, soluk sarı veya renksiz bir sıvıdır ve genellikle kafur, 1,8-sineol ve α -pinen gibi monoterpenlerden oluşmaktadır [38].

Uçucu yağların elde edilmesi su buharı distilasyonu ve ekstraksiyon işlemi ile sağlanır. Bitkilerin çeşitli bölgelerinden üretilen karışımlardır. Uçucu yağlar, oda koşullarında sıvı, genelde açık sarı renkli, keskin kokulu doğal yağlardır. Su ile karışımlarında suyun üst

kısmında bir tabaka oluştururlar. Su ile hareket edebilir. Sulu etanolde çözülebilmeleri sebebiyle diğer yağlardan ayrılan bir özelliğindedir [39].

Esansiyel yağ eldesinde kullanılan yöntemler Tablo 2.1’de verilmiştir [40, 41].

Tablo 2.1: Yağ eldesinde kullanılan yöntemler.

1. Damıtma (destilasyon) yöntemi: Bileşenleri kaynama noktaları arasındaki farklardan yararlanarak ayırma işlemidir.	a) Su ile damıtma (Hydro distillation) b) Su buharında damıtma (Steam distillation) c) Vakum altında damıtma (Vacuum distillation)
2. Ekstraksiyon yöntemi: Yağın bir çözücü içerisinde çözüldürülerek alınması işlemidir.	a) Çözücü ekstraksiyonu (Solvent extraction) b) Süperkritik sıvı ekstraksiyonu (Supercritical fluid extraction) c) Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon (Microwave-assisted extraction) d) Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu (Pressurised solvent extraction) e) Katı faz mikro ekstraksiyon (Solid phase microextraction) f) Çok yönlü ekstraksiyon (Simultaneous distillation extraction)
3. Presleme yöntemi (mekanik ekstraksiyon): Ürünün bez torba içerisinde hidrolik pres altında sıkılmasıyla yağlarının alınması işlemidir.	

2.2.2 Uçucu Yağ Bileşenleri

Bitkiler enfeksiyonlardan ve parazitlerden korunmak ve strese yanıt olarak karışımına uçucu yağlar adı verilen düşük moleküler uçucu terpenoidleri sentezler. Birçok bitkinin uçucu yağları güçlü ve hoş bir aromaya sahiptir ve biyolojik olarak aktiftir [42, 43]. Bu özelliklerinden dolayı uçucu yağlar tıp ve ilaç endüstrilerinde, aromaterapi ve kozmetolojide ve kozmetikte aktif olarak kullanılmaktadır. Doğal gıda aromalarının üretimi kural olarak, uçucu yağlar, başta terpenoidler olmak üzere farklı fonksiyonel gruplara sahip organik maddelerin karmaşık bir karışımıdır [44]. Esansiyel yağların bileşimi onların organoleptik özelliklerini ve antioksidan dahil biyolojik aktivitelerini belirler [45, 46]. Farklı uçucu yağların bireysel bileşenlerinin incelenmesi, birçok terpenin antiradikal ve antioksidan aktiviteye (AOA) sahip olduğunu ve iki çift bağa sahip siklik monoterpen hidrokarbonların aktivitesinin, fenol ve α -tokoferolün AOA'sı ile

karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir [47, 48]. Böylece, α - ve γ -terpinenler ve karyofillen dahil seskiterpen hidrokarbonlar, metil linoleatın oksidasyonunu inhibe etmiştir [49, 50]. α -terpinolen, Sabinen, α - ve γ -terpinenler ve antiradikal aktivitenin tahmininde kullanılan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikaline göre aktif hidrojen donörleridir [51]. Birçok uçucu yağda bulunan sitronelal, neral ve sardunya antiradikal aktiviteye sahiptir.

Son zamanlarda uçucu yağlar ve bunların aktif bileşikleri, farmakolojik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Esansiyel yağlar, çeşitli bitki organlarında sentezlenen ve çeşitli ekolojik işlevlere sahip, güçlü kokuya sahip uçucu bileşiklerin karışımlarıdır [16].

Biyolojik aktivitelerinden dolayı uçucu yağların gıda muhafazasında, koku endüstrisinde ve aromaterapide faydalı olduğu rapor edilmiştir [52].

Biberiye esansiyel yağı (REO), bitkinin karakteristik kokusuna sahip, renksiz veya soluk sarı bir sıvıdır ve çoğunlukla 1,8-sineol, kafur ve α -pinen gibi monoterpenlerden oluşur [22].

Birçok çalışma, uçucu yağların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini ele almış olmasına rağmen, belirli bileşiklerin varlığı ve içeriği ile bunların aktiviteleri ve etki mekanizmaları arasındaki ilişki araştırılmamıştır [53, 54]. Biberiyenin güçlü antioksidan özellikleri temel olarak içindeki temel diterpenlere, karnosol ve karnosik asitin yanı sıra uçucu yağ bileşenlerine atfedilmektedir [55].

Biberiye bitkisinde morfojenetik ve ontogenetik varyabilitenin uçucu yağ ve antioksidan içeriği üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Denemede bitkinin herba, yaprak, sap ve çiçek örnekleri üç farklı dönemde (sonbahar, çiçeklenme başlangıcı ve tam çiçeklenme) hasat edilmişlerdir. Denemede en yüksek uçucu yağ oranı sonbahar döneminde alınan yaprak örneklerinde %0,78 olarak belirlenmiştir. Bu oranı %0,58 ile çiçeklenme başlangıcı ve %0,49 ile tam çiçeklenme dönemi yaprak uçucu yağ oranları izlemiştir. Uçucu yağın temel bileşenleri genel olarak borneol, 1,8 cineole ve kafur olarak bulunmuştur. En yüksek borneol oranı %23,52 ile tam çiçeklenme döneminde çiçeklerden elde edilen hasadından elde uçucu yağda bulunurken, bunu %20,91 ile tam çiçeklenme dönemi ve %20,45 ile sonbahar dönemi herba uçucu yağları izlemiştir. En yüksek antioksidan içeriği 25,29 mmol Fe⁺²/kg ile sonbahar döneminde hasat edilen bitkilerin yapraklarından elde edilmiştir [56].

Yang ve ark (2011), biberiye uçucu yağının bileşikleri için yapılan araştırmada yağda 27 bileşiğin %97,41'i karakterize edilmiştir. Uçucu yağın en yüksek bileşikleri %26,54 1,8-sineol ve %26,54 α -pinen olduğu saptanmıştır [57].

Salido ve ark (2003), biberiyeden oluşan uçucu yağ bileşenleri mevsimlere göre değiştiğini belirten araştırmada 12 numune araştırılmıştır. En fazla yağ veriminin (%1,6-1,8) yaz aylarında toplanan biberiyeden elde edilmiştir. Ayrıca diğer dönemlerde toplanan yağların bileşiklerin kafur (%17,2-34), α -pinen (%10,2-21,6), 1,8-sineol (%12,1-14,4), kamfen (%5,2-8,6), borneol (%3,2-7,7), β -pinen (%2,3- 7,5), verbenon (%2,2-5,8), β -karyofilen (%1,8-5,1), limonen (%2-3,8), α -terpineol (%1,2-2,5), mirsen (%0,9-4,5), p-simen (%0,2-3,4), bornil asetat (%0,2-2,3), linalol (%0,3-1) ve terpinen-4-ol (%0,4-0,9) olarak saptanmıştır. Bu durumun farklı dönemlerde toplanmalarından dolayı olduğunu bildirmişlerdir [58].

Conde-Hernandez ve ark (2017), biberiye yağının verimine baktıklarında en düşük verimi %0,35 ile su distilasyonundan olduğu en fazla verimi %2,35 ile buhar distilasyonundan olduğunu belirtmişlerdir. Biberiye yağı'nın en çok bileşikleri olan 1,8-sineol süper kritik karbondioksit koşullarında %10,60 iken buharlı distilasyonda %15,36, su buharı distilasyonun da ise %12,59 olduğunu belirtmişlerdir [59].

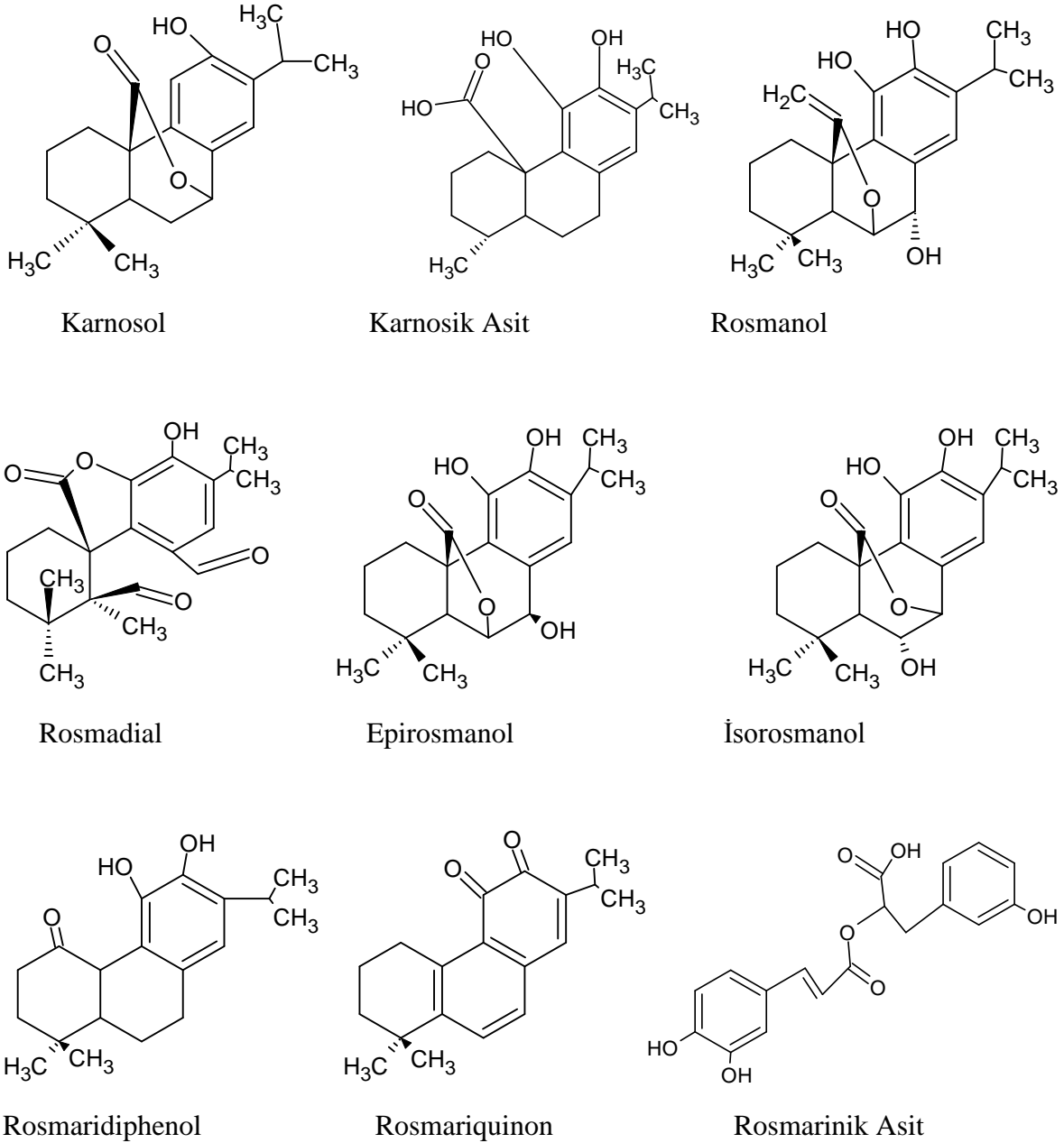
Boutekedjiret ve ark (1999), Buharlı distilasyon ile %1,2 verim, su buharı distilasyonu ile %0,44 verim olduğunu belirtmişlerdir. Buharlı distilasyonda sırayla % 52,4 1,8-sineol, %12,6 kafur, %2,1 α -terpineol tespit edilirken, su buharı distilasyonunda sırayla %31,9 1,8-sineol, % 19,7 kafur, %12,18 α -terpineol olduğunu belirtmişlerdir [60].

Uçucu yağların içerik bakımından 4 gruba ayrılabilir. Bunlar terpenik maddeler (%90), aromatik maddeler, düz zincirli hidrokarbonlar, kükürt ve azot içeren bileşiklerdir.

2.3 Biberiyenin Antioksidan Etken Bileşenleri

Biberiye bitkisinden elde edilen esansiyel yağ ve ekstresinin kimyasal bileşenleri farklılık göstermektedir. Yapılan araştırmalarda biberiye esansiyel yağının ana bileşenleri verbenon, kafur, 1,8-sineol, α -pinen, sabinen, kamfen, borneol, β -karyofilen, α -terpineol, karnosol, karnosik asit, bornil asetat, linalol, limonen, [61]; biberiye ekstresinin ise isorosmanol, rosmadial, rosmanol epirosmanol, rosmaridifenol, rosmariquino ve rosmarinik asit olarak bulunmuştur [62]. Biberiye ekstresindeki 9 fenolik bileşik antioksidatif etkide olup kimyasal bileşen yapıları Şekil 2.1'deki gibidir [63]. Bazı araştırmacılar tarafından biberiye

esansiyel yağının antioksidatif etki özellikleri belirlenmiş olmasına rağmen kafur, α -pinen, 1,8-sineol ve verbenon gibi esansiyel yağ kimyasal bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitesinin fazla olduğunu söylemişlerdir [17]. Biberiye bitkisinden elde edilen esansiyel yağ ve metanol ekstralarının antimikrobiyal etki özelliklerinin incelendiği araştırmalarda, metanol ekstresinin esansiyel yağa göre daha az antimikrobiyal etki özelliği gösterdiğini belirtilmiştir.



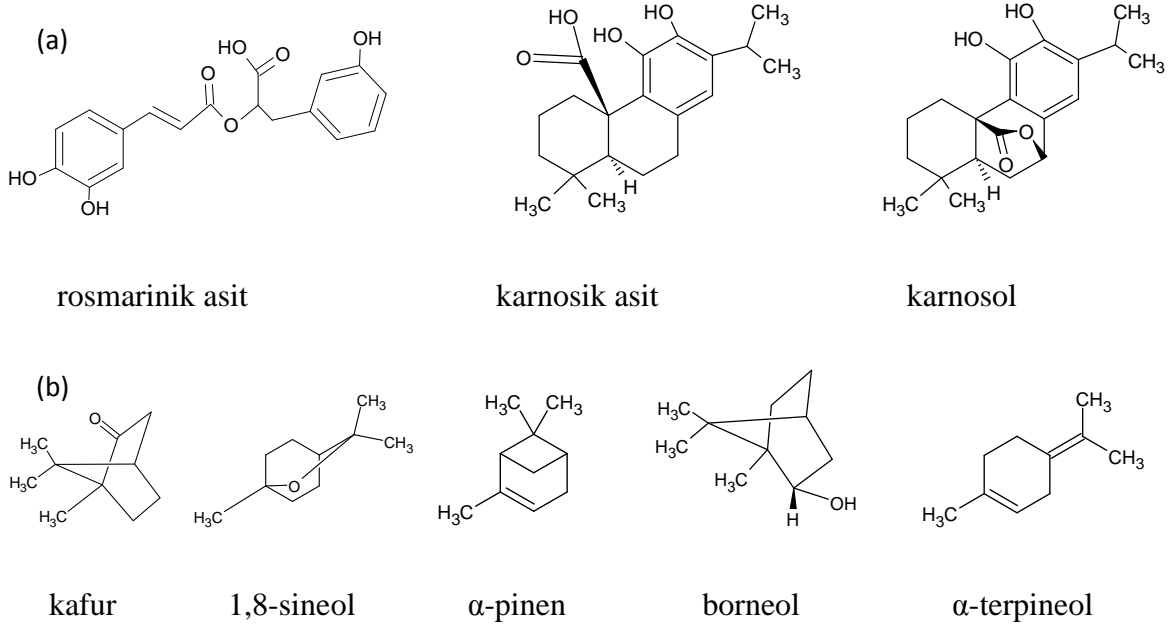
Şekil 2.1: Biberiyenin antioksidan etkili bileşenleri.

Biberiye bitkisinin farmakolojik etmenlerinin çoğunluğu, rosmarinik asit, karnosol, ursolik asit, karnosik asit ve kafeik asit gibi ana kimyasal bileşiklerinin yüksek antioksidatif

etkisinin sonucudur. Biberiyenin güçlü antioksidan özellikleri temel olarak içindeki ana diterpenlere, karnosol ve karnosik asitin yanı sıra uçucu yağ bileşenlerine de atfedilmektedir. DNA koruyucu etkisi önemli farmakolojik etkilerdendir [64]. Biberiye metanol ekstraktı, karbon tetraklorürün (CCl₄) neden olduğu akut karaciğer hasarına karşı etkili olmuştur [65] ve biberiye suyu ekstraktı, sıçanlarda azatioprin kaynaklı akut karaciğer hasarını önleyebilmektedir. Biberiyenin metanol ekstraktı aynı zamanda CCl₄'ün neden olduğu karaciğer sirozunun hem önlenmesi hem de geri döndürülmesi deneysel modellerinde hepatotoksisiteyi önleyebilmektedir [66].

2.3.1 Biberiyenin Antioksidan Aktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Birçok diterpen molekülü ve türevlerini içeren biberiye ekstraktı, yiyecek ve içeceklerde, kişisel bakım ürünlerinde ve hayvan yemlerinde sıvı ve katı yağları stabilize etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Bitki metabolitleri arasında karnosik asit ana aktif bileşik olarak kabul edilmektedir [67]. Altı biberiye klonal soyundan elde edilen farklı bitki metabolit havuzları, karnosik asit içeriğinin belirleyici etken olduğunu araştırmak için değerlendirilmiştir. Ek olarak, biberiye ekstraktından karnosik asidin seçici olarak uzaklaştırılmasıyla, karnosik asitten ve biberiye ekstraktının karnosik asit içermeyen kısmından gelen bireysel katkılar ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini değerlendirmek amacıyla birçok in vitro metod geliştirilmiştir. İn vitro yöntemler, yeni antioksidan içerikleri taramak ve ilk fonksiyonel bilgileri elde etmek için harika araçlar olsa da, bu yöntemler normalde bileşenlerin gıdalardaki lipit oksidasyonunu yavaşlatma yetenekleriyle iyi bir korelasyona sahip değildir [68]. Belirli bir gıda sistemindeki bileşenlerin çözünürlüğü, bileşenlerin oksidasyona yatkın bölgelerdeki yerel konsantrasyonları, bileşen etkileşimleri, ışığa/oksijene maruz kalma seviyeleri ve kötü koşullar altında kimyasal stabilite gibi diğer faktörlerin tümü performansı etkileyeceğinden biberiye ekstraktı ve karnosik asidin antioksidan aktiviteleri bu amaçla kullanılmıştır [69]. Doğal antioksidan ürünler, özellikle fitokimyasallar, etkinlikleri ve güvenlikleri nedeniyle dünya çapında popülerlik kazanmış ve çeşitli patolojik karaciğer durumlarını tedavi etmek için daha yaygın kullanılmaya başlanmıştır [70].

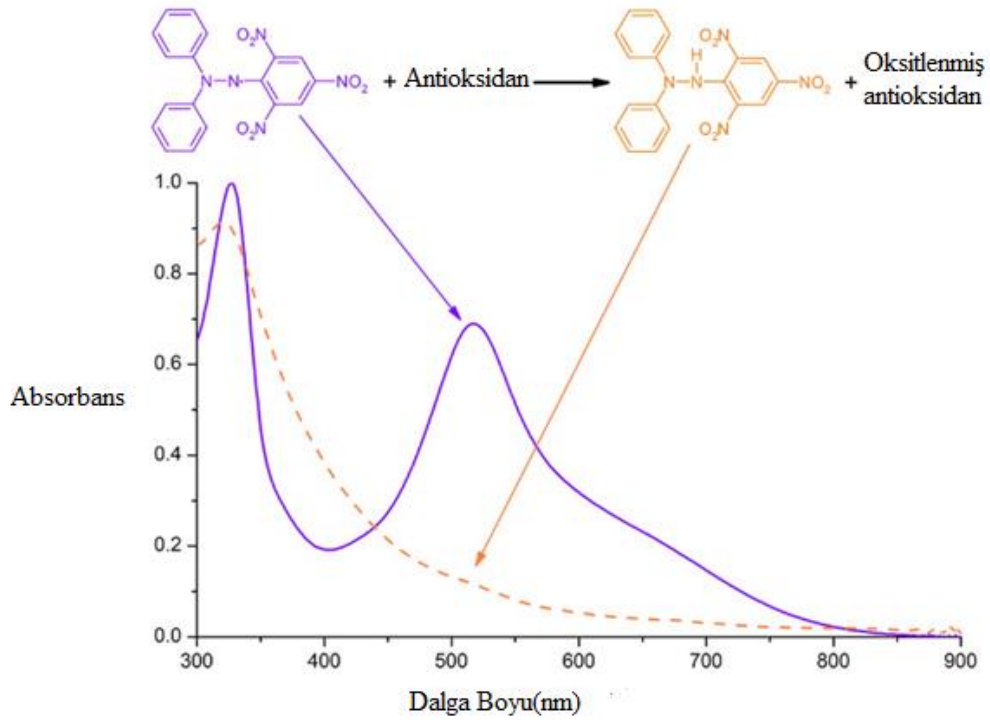


Şekil 2.2: Biberiye yapraklarında bulunan ana bileşiklerin kimyasal yapıları, antioksidanlar (rosmarinik asit, karnosik asit ve karnosol) ve uçucu yağlara (kafur, 1,8-sineol, α -pinen, borneol ve α -terpineol) bölünmüştür. a) Antioksidan, b) Esansiyel yağ

Antioksidanlar (AO), lipidlerin ve diğer biyomoleküllerin oksidasyonunu inhibe edebilen veya geciktirebilen bileşiklerdir. Radikaller tarafından oksitleyici bir zincir reaksiyonunun başlatılmasını engeller veya yayılmayı söndürürler. Bu reaksiyonlar insan vücudunda kanser veya kardiyovasküler hastalıklar gibi fonksiyonel hasarlara neden olabilir. Antioksidanlar indirgeyici davranışları, hidrojen verici veya singlet oksijenin söndürülmesi gibi redoks özelliklerinden dolayı bu süreci önleyebilmektedir [71]. Karnosol (CA) ve rosmanol, karnosik asidin oksidatif parçalanmasıyla oluşur ve başlangıçta yapraklarda bulunmaz. Dolayısıyla bu bileşikler ekstraksiyon sürecinin yapay ürünleridir. Bu antioksidanların kimyasal yapıları Şekil 2.2'de gösterilmektedir [72]. Yapraklardaki bu antioksidanların içeriği mevsimsel değişikliklere, çevresel etkilere, türlere ve büyüme kökenine göre değişiklik göstermektedir. Literatürde karnosik asit içeriği 1 g biberiyede 4 ile 30 mg arasında değişmektedir. Yapraklardaki rosmarinik asitin kütle konsantrasyonu 2 ile 25 mg/g arasındadır [73]. Ancak bu bileşikler sadece antioksidan aktivite göstermezler. Rosmarinik asit ayrıca antiviral, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve kemo-koruyucu özellikleriyle de bilinir. 2010 yılından bu yana biberiye ekstraktları Avrupa Komisyonunca gıda katkı maddesi olarak sınıflandırılmakta ve E392 numarası verilmektedir. Gıda katkı maddeleri açısından kısmen kısıtlanan yapay antioksidanlara alternatif olabilirler. Butillenmiş hidroksianizol (BHA; E320) ve butillenmiş hidroksitoluen (BHT; E321) gibi sentetik antioksidanlar zararlıdır ve potansiyel kanserojenlerdir [74]. Bu nedenle doğal

bitki ekstraktlarının gıda endüstrisinde doğal antioksidan olarak kullanılması önem teşkil etmektedir.

Maddelerin toplam antioksidan aktivitesini belirlemek için çeşitli prosedürler vardır. Örneğin; DPPH tahlilleri [75], Folin-Ciolteau tahlilleri [76] ve diğerleri gibi spektrofotometrik yöntemler. Toplam antioksidan süpürme aktivitesini araştırmak için hızlı ve kolay bir yöntem olması nedeniyle 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) analizleri seçilmiştir. Ayrıca deneysel prosedür, analiz deneylerine göre kolayca ve hızlı bir şekilde ayarlanabilir ve özelleştirilebilir. İlk olarak Blois tarafından bileşiklerin toplam antioksidan aktivitesini belirlemek için geliştirilmiştir. DPPH, metanol veya etanolde çözünebilir, serbest radikal moleküllerinden meydana gelen koyu renkte bir tozdur. Eşlenmemiş bir elektronun varlığından dolayı 515 nm civarında bir dalga boyunda güçlü bir absorpsiyon maksimumuna sahiptir. Bu elektron bir antioksidanın (hidrojen donörü) varlığında eşleştiğinde emilim gücü azalır. Mordan sarıya doğru bir renk değişimi gözlemlenebilir (Şekil 2.3). Absorbanstaki değişime bağlı olarak oluşan bu renk değişimi, bileşiklerin antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılabilir [77]. Tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için DPPH ve antioksidanın reaksiyon kinetiğini araştırmak önemlidir. Reaksiyonun kararlı duruma ulaşması için geçen süre antioksidan bileşiğe bağlıdır [75].



Şekil 2.3: DPPH radikali (mor) ile nötrleştirilmiş DPPH molekülünü (turuncu) veren bir antioksidan arasındaki reaksiyon. Karşılık gelen UV/VIS spektrumları da gösterilmektedir. Reaksiyon sırasında 518 nm'de absorbansta önemli bir azalma görülür ve reaksiyonu takip etmek için kullanılabilir [78].

2.4 DNA Koruma Aktivitesi İle İlgili Yapılan Çalışmalar

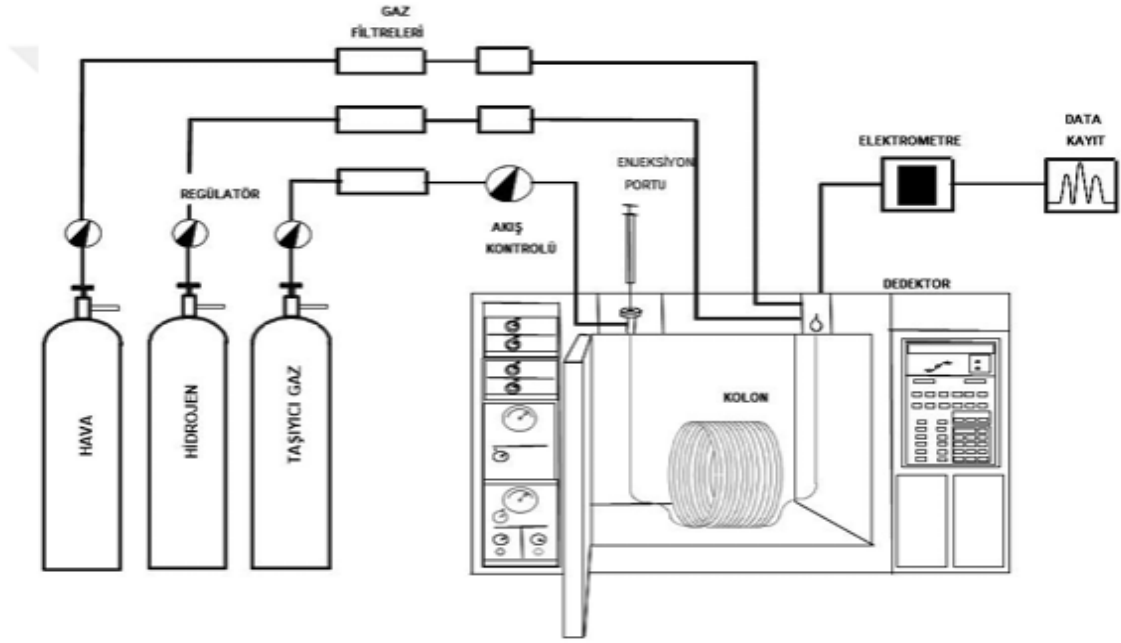
Canlı hücrelerde, hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumu, hücrelerin antioksidan kapasitesini aştığında oksidatif stres ortaya çıkabilir ve bunun sonucunda proteinler, lipitler ve DNA gibi hücresel makromoleküller zarar görebilir [79]. DNA, hücresel homeostazı bozabilecek kümülatif mutasyonlar yaratma potansiyeli nedeniyle özellikle hassas bir hücresel hedefdir. Bu durumda reaktif oksijen cinsleri tek ve çift zincir kırılmalarının oluşmasına neden olabileceği gibi pürin ve pirimidin bazlarında ve ayrıca 2-deoksiribozda kimyasal ve yapısal modifikasyonlara neden olabilir [80, 81]. Oksidatif DNA hasarı, normal yaşlanma sürecinde rol oynamasının yanı sıra, kanserin önemli bir tetikleyicisi olarak kabul edilmektedir [82]. Rosmarinik asit, biberiye gibi birçok bitkide bulunur ve tedavi edici değeri, antioksidan, antiinflamatuvar, anti-bakteriyel ve anti-viral özelliklerine atfedilmektedir [83]. Bu bileşiklerin tümü için nöroprotektif etkiler araştırılmıştır [84]. Bu durum fitokimyasalların potansiyel koruyucu rollerini açığa çıkarmaktadır. Ayrıca, bu bileşiklerin bazılarını kullanan çalışmalar, bunların farklı hücre tiplerini oksidatif DNA hasarına karşı koruma yeteneklerini ortaya koymuştur [85]. Bununla birlikte, DNA onarımını güçlendirerek mi yoksa sadece oksidatif DNA hasarını önleyerek mi hareket

ettikleri hala bilinmemektedir. Comet tahlilini kullanarak bu polifenolik bileşiklerin PC12 hücrelerini oksidatif DNA hasarına karşı koruma potansiyeli değerlendirilmiştir [86].

2.6 GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi) Analiz Metodu

GC-MS sıvı, gaz veya katı numuneleri incelemek için kullanılabilir. Analiz, numunenin etkili bir şekilde gaz fazına buharlaştırıldığı ve sabit (sıvı veya katı) bir fazla kaplanmış bir kılcal kolon kullanılarak çeşitli bileşenlerine ayrıldığı gaz kromatografi ile başlar. Bileşikler helyum, hidrojen veya nitrojen gibi inert bir taşıyıcı gaz tarafından itilir. Karışımın bileşenleri ayrılırken her bileşik, kaynama noktası ve polaritesine bağlı olarak kolondan farklı bir zamanda ayrılır. Elüsyon süresi bir bileşiğin alıkonma süresi olarak anılır. GC, yüzlerce bileşik içeren karmaşık karışımları veya örnek ekstraktları çözme kapasitesine sahiptir. Bileşenler GC kolonunu terk ettikten sonra, elektron veya kimyasal iyonizasyon kaynakları kullanılarak kütle spektrometresi tarafından iyonize edilir ve parçalanır. İyonize moleküller ve parçalar daha sonra cihazın genellikle dört kutuplu veya iyon tuzağı olan kütle analizörü aracılığıyla hızlandırılır. İyonların farklı kütle-yük (m/z) oranlarına göre ayrıldığı yer burasıdır. GC-MS veri toplama, geniş bir m/z oranı aralığını kapsayacak şekilde tam tarama modunda veya belirli ilgilenilen kitleler için veri toplamak amacıyla seçilmiş iyon izleme (SIM) modunda gerçekleştirilebilir. Sürecin son adımları, m/z oranlarının bir fonksiyonu olarak ortaya çıkan parçalanmış iyonlarla iyon tespitini ve analizini içerir. Bu arada pik alanları karşılık gelen bileşiğin miktarıyla orantılıdır. Karmaşık bir numune GC-MS ile ayrıldığında, gaz kromatogramında birçok farklı tepe noktası üretilir ve her tepe noktası, bileşiğin tanımlanması için kullanılan benzersiz bir kütle spektrumu üretecektir. Ticari olarak temin edilebilen kapsamlı kütle spektrumu kütüphaneleri kullanılarak, bilinmeyen bileşikler ve hedef analitler belirlenebilir ve ölçülebilir. Örnek hazırlanması, GC-MS analizlerine yönelik numunelerin genellikle gaz kromatografina yerleştirilmeden önce karmaşık ve kirli matrislerden ayrılması gerekir. Gaz kromatografisinden önce sıklıkla farklı manuel ve otomatik numune ekstraksiyon işlemleri kullanılır. Bu işlemler numune matrisine, gereken seçicilik derecesine ve numunelerin başlangıçtaki temizliğine bağlı olarak farklılık gösterir. Bir GC-MS'e numune enjeksiyonu ile otomatik çevrimiçi numune hazırlama, birçok temel ve daha karmaşık manuel numune işleme operasyonunun yerini alabilecek robotik otomatik numune alma cihazları aracılığıyla mümkündür. Gaz kromatografi kolonu, GC sütunları, bir gaz kromatografi analizinin sabit fazını ve ayırma aracını temsil eder. Sabit faz, farklı bileşiklerin kolondan farklı zamanlarda yeterli şekilde ayrılmasını ve elüsyonunu sağlar. Uçucu organik

bileşiklerin (VOC'ler) veya dioksinlerin belirlenmesi gibi farklı uygulamalar için farklı sabit fazlara sahip farklı tipte kolonlar kullanılabilir. Polar veya polar olmayan bileşikleri ayırmak veya numuneleri farklı hızlarda işlemek için tasarlanabilirler. Sütunların sabit faz bileşiklerini salmaması önemlidir, bu nedenle ortaya çıkan kromatogramda bazen düşük sızıntı olarak anılan minimum arka plan sinyali sağlanır. GC kolon malzemesinin inertliği de numuneyle istenmeyen kimyasal etkileşimleri önlemek amacıyla dikkate alınması gereken kritik bir faktördür. Gaz kromatografisi uygulama alanları, GC-MS, gıdalardaki potansiyel toksik kimyasalların tespitinden sudaki organik kirletici maddelerin miktarının belirlenmesine veya petrol işleme sırasında petrol ürünlerinin analizine kadar çeşitli uygulamalar için kullanılabilir. GC-MS analizi, yediğimiz yiyeceklerin ve içtiğimiz içeceklerin güvenliğini ve orijinalliğini sağlamanın ayrılmaz bir parçasıdır. Şekil 2.4'te gaz kromatografisi ekipmanları gösterilmiştir [87].



Şekil 2.4: Gaz kromatografisinin bölümleri [87].

2.7 Uçucu Yağların Bileşenlerin Analizinde GC-MS Yöntemi

GC-MS yöntemi kromatografik bir analiz metodudur. Kromatografi, karışık kimyasal bileşimlerin birbirinden ayrılması, tespiti ve tanınmasında çok kullanılan bir methodur. Bu metodlar GC-MS yöntemi uygunluk, duyarlılık, tekrarlılık ve sonuçların hızlı elde edilebilmesi gibi, diğer metodlara göre üstün yanları vardır. Ayrıca nanogram seviyesinde bile miktar analizi yapılabilmesinden dolayı hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik ortamlarda miktar tayinlerinde kullanılmaktadır. Gaz kromatografisi metodu,

uçucu olan maddelerin belirli bir sıcaklıkta, taşıyıcı bir gaz ile sabit faz içinde ayrılmaları esasına dayanır. Hareketli fazın amacı sadece maddeleri taşımasıdır. Sabit faz ise bir katı veya bir katı yüzeyine adsorplanmış sıvı olabilir [87].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Numunelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Balıkesir'in Bandırma ilçesinde eylül ayı 2023 yılında doğal olarak yetişen biberiye bitkisi toplanmıştır. *Rosmarinus officinalis* biberiye bitkisi türü Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen Bilimleri Eğitim Bölümü Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Taner ÖZCAN tarafından belirlenmiştir [88]. Toplama işlemi sırasında bitkinin sürdürülebilirlik ilkesi gereğince floraya hasar vermeden yapılmış ve biberiyenin kullanacağımız kısımlarının zarar görmemesi adına dikkatli davranılmıştır. Her bölgede toplanan biberiye numuneleri 100-200 gr arasındadır. Toplanan biberiyeler kök kısmındaki topraklar temizlendikten sonra zemine yayılarak uygun koşullarda (oda sıcaklığında ve gölgede) kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.1). Kurutulan biberiye numuneleri yapılacak laboratuvar araştırmalarına kadar ağzı klipsli şeffaf numune poşetlerinde muhafaza edilmiştir. Bitki materyallerinin toplandığı yerde GPS yardımı ile yerin enlem ve boylamı 40.27952, 28.05145 olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.1: Toplanan biberiye numuneleri.

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Alet Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Hegzan, kloroform, DPPH (1,1-difenil 2-pikril hidrazil), vb. Sigma Aldrich Co. firmasından temin edilmiştir. Clevenger ve sokslet cihazı (İldam N.S 45/40 250 Ml Boro 3.3), yüksek hızlı rotorlu öğütücü (RETSCH ZM 200), Rotary Evaporatör (heidolph Laborota 4001), İnfrared (IR) spektroskopisi

(Perkin Elmer Bx 2 Ftir), Elisa okuyucu (multiskan go), GC-MS kromatografi cihazı (THERMO, Triplus RSH Trace1310-ISQ LT), Agaroz Kromatografisi (Major Science), jel yazıcısı(Sony), Etüv (Memmert), Hassas Terazi (Sartorius Te214s).

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitkisel Materyalin Hidrodistilasyonu

Kurutulan bitki örnekleri yüksek hızlı rotorlu öğütücü (RETSCH ZM 200) yardımı ile 12000 rpm de daha küçük parçalar haline getirilmiştir (Şekil 3.2). Toz biberiye numuneleri 1000 ml hacimli cam balona alınıp üzerine saf su eklenmiş ve biberiye numunesinin saf su ile daha iyi karışması amacıyla balon iyice çalkalanmış ve clevenger cihazına yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Toz biberiye numunelerine eklenen saf su miktarları Tablo 3.1’de verilmiştir. Cam balonun yerleştirildiği ısıtıcı mantonun (Isolab, Wertheim, Almanya) sıcaklık değeri 250°C’ye ayarlanmıştır. Ortalama 5 saat boyunca su buhari distilasyon tekniği ile özütlenerek, uçucu yağların elde edilmesi sağlanmıştır. Distilasyon işlemi sonlandıktan sonra Clevenger aparatının bölmesinde biriken uçucu yağlar eppendorf tüplerine alınmıştır ve kalsiyum klorür ile kurutulmuştur. Elde edilen uçucu yağ tüpün üst kısmında toplanmış ve bir pasteur pipet yardımı ile başka bir eppendorf tüpüne aktarılmıştır. İn vitro ortamda kimyasal bileşiminin, karakterizasyonunun ve bazı biyolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla +4°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.2: Toplanan biberiyenin öğütülmesi.



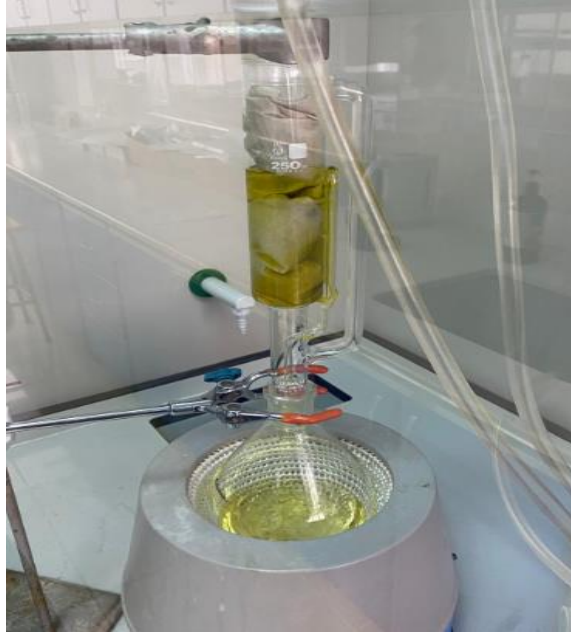
Şekil 3.3: Clevenger cihazında safsu ile biberiye örneği.

Tablo 3.1: Biberiye bitkisi miktarına göre kullanılan saf su miktarı.

Biberiye Bitkisi Miktarı (g)	Uçucu Yağ Eldesinde Kullanılan Safsu Miktarı(ml)
112 g	560 ml
82 g	415 ml
88 g	440 ml
98 g	490 ml
105 g	525 ml
102 g	510 ml

3.2.2 Bitkisel Materyalin Ekstraksiyonu

Kurutulmuş ve öğütülerek çok küçük parçalar haline getirilen biberiye örnekleri belirli miktarlarda tartılarak süzgeç kağıdı 40x40cm ile sarılmıştır. Süzgeç kağıdının üst ve alt kısımları sıkı bir şekilde katlanarak sokslet cihazına yerleştirilmiştir. Cam balona 250 ml çözücü (hegzan, kloroform) eklenerek ısıtıcı mantonun (Isolab, Wertheim-Almanya) sıcaklık değeri 250°C'ye getirilmiştir. Yaklaşık 5 saat boyunca ekstraksiyon yöntemi ile özütlenerek, sabit yağlar elde edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Sokset ekstraktöründe sabit yağların eldesi.

Cam balonda toplanan sabit yağ-çözücü karışımı evaporasyon işlemine tabi tutularak çözücüsü buharlaştırılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Biberiye sabit yağı-hegzan karışımı evaporasyon işlemi.

3.2.3 GC-MS Analizi

3.2.3.1 Uçucu Yağ Bileşenleri Tayini

Uçucu yağ numunesi kalsiyum klorür kurutucu ajan içeren şırınga içerisinden diklorometan ile geçirildi. Son hacim 2 ml'ye tamamlanarak GC-MS cihazına (THERMO, Triplus RSH Trace1310-ISQ LT) yüklendi.

Analiz, "Thermo Trace 1310 GC ISQ Single quadrapol kütle spektroskopisi (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX) ile gerçekleştirilmiştir. Örneklem Parametreleri: Örnek hacmi (μ l): 1,000, piston vuruşları: 2, hava ve dolum hacmi: otomatik. Enjeksiyon öncesi yıkama parametreleri: Çözücü döngüleri: 3 ve çözücü hacmi (μ l): 1,700. Örnek yıkama parametreleri: Durulama döngüleri: 3, Durulama hacmi (μ l): 1,700, GC fırın sıcaklık programı: 80 °C'de 2 dakika bekletildikten sonra sıcaklık dakikada 4 °C artırılarak 240 °C'ye çıkarıldı. 240°C'de 50 dakika beklenerek analiz sonlandırıldı. Akış hızı: Helyum 1,2 ml/dak. Kolon bilgisi: Thermo TG-WAXMS GC kolonu (60m x 0,25mm ID x 0,25 μ m). MS koşulları: İyon kaynağı ve dedektör sıcaklığı 250 °C, kütle tarama aralığı 55–550 (amu). Analizden elde edilen zirveleri belirlemek için Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST), Wiley 9, Redlip, Mainlip ve WinRI kütüphaneleri kullanıldı.

3.2.3.2 Sabit Yağ Bileşenleri Tayini

Türevlendirme: Gaz kromatografisi ile yağ asitlerinin tayin edilebilmesi için bileşenlerin uçucu forma dönüştürülmesi, yani metil ester türevlerine dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu sebeple, analizi gerçekleştirilecek sabit yağ numuneleri, metilasyon reaksiyonu ile uçucu forma getirilmiştir. 0,1-0,3 ml yağ numunesi, 15 ml'lik cam kapaklı deney tüpüne alınmış, üzerine 10 ml n-hekzan ilave edilmiştir. Deney tüpü vorteks ile kuvvetlice karıştırılmıştır. Deney tüpü içerisine metanol içerisinde hazırlanmış 2M potasyum hidroksit çözeltisinden yaklaşık 0,5 ml ilave edilmiştir. Deney tüpü vorteks ile şiddetli bir şekilde karıştırılarak 2 faz oluşumu beklenmiştir. Tüpün içerisinde oluşan üst organik fazdan 0,5 ml alınarak 1,5 ml hegzan içeren 2 ml vial alınmıştır. Vorteks ile iyice karıştırılan vial GC-MS cihazına (THERMO, Triplus RSH Trace1310-ISQ LT) yüklenmiştir.

Analiz, "Thermo Trace 1310 GC ISQ Single quadrapol kütle spektroskopisi (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX) ile gerçekleştirilmiştir. Örneklem Parametreleri: Örnek hacmi (μ l): 3,000, piston vuruşları: 2, hava ve dolum hacmi: otomatik. Enjeksiyon Öncesi yıkama parametreleri: Çözücü döngüleri: 3 ve çözücü hacmi (μ l): 3,500. Örnek yıkama parametreleri: Durulama döngüleri: 3, Durulama hacmi (μ l): 3,000, GC fırın sıcaklık

programı: 80 °C'de 2 dakika bekletildikten sonra sıcaklık dakikada 4 °C artırılarak 240 °C'ye çıkarıldı. 240°C'de 45 dakika beklenerek analiz sonlandırıldı. Akış hızı: Helyum 1,2 mL/dak. Kolon bilgisi: Thermo TG-WAXMS GC kolonu (60m x 0,25mm ID x 0,25µm). MS koşulları: İyon kaynağı ve dedektör sıcaklığı 250 °C, kütle tarama aralığı 55–550 (amu). Analizden elde edilen zirveleri belirlemek için Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST), Wiley 9, Redlip, Mainlip ve WinRI kütüphaneleri kullanıldı.

3.2.4 DNA Koruma Aktivitesi Tayini

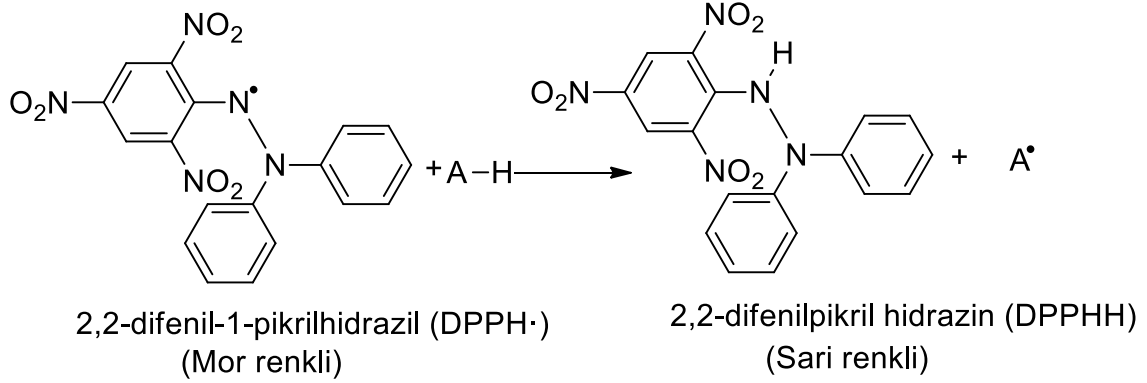
DNA koruma aktivitesi, Akkemik ve arkadaşları tarafından kullanılan yönteme göre gerçekleştirilmiştir. pBR322 plazmid DNA'sı, Fenton çözeltisinin zararlı etkilerini ve biberiye sabit yağlarının ve uçucu yağlarının DNA konformasyonu üzerindeki koruyucu etkisini tespit edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Her bir yağ numunesinin 1 mg ml⁻¹'lik dimetilsülfoksit çözeltileri hazırlandı. Her bir yağ numunesi için tek farklı konsantrasyon (1 mg ml⁻¹) uygulanarak deney tasarımı için negatif (sadece plazmid DNA) ve pozitif kontrol (Fenton + plazmid DNA) grupları oluşturuldu. Karşılaştırılan sonuçlara ek olarak, biyolojik aktiviteleri bilinen, kuersetin bileşiği ticari olarak satın alındı ve 1 mg ml⁻¹ konsantrasyonda kullanıldı. Buna göre inkübe edilecek reaksiyon karışımları 3 µl pBR322 plazmid DNA, 5 µl Fenton solüsyonu (30 mM H₂O₂, 50 mM askorbik asit ve 80 mM FeCl₃) ve farklı konsantrasyonlardan 5 µl (1000 mg/l ve 10 mg/l) biberiye sabit yağlarının ve uçucu yağlarının çözeltisi alınarak son hacim distile su ile 20 µl'ye tamamlandı. Daha sonra bu karışım 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından reaksiyon karışımına 5 µl 6x yükleme boyası ilave edildi. Karışımın 10 µl'si alındı ve EtBr (etidyum bromür) ile lekelenmiş %0,8 agaroz jeline yüklendi. Agaroz jeli 100 volta 60 dakika çalıştırıldı. Daha sonra jel görüntüleme cihazı ile jel görüntüsü alındı [89].

3.2.5 Antioksidan Aktivitesi Tayin Yöntemleri

3.2.5.1 DPPH Radikalini Radikal Süpürme Yöntemi

DPPH aktivitesi Villana ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Her bir numunenin (mono-di-tri-tetra) 1 mg/ml çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler seyreltilerek farklı konsantrasyonlardaki aktiviteleri çalışılmıştır. Numune çözeltisinden 50 µl ve 0,01 mM DPPH'den 250 µl (metanol içinde çözülmüş) karıştırıldı. 30 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Karışım bir mikropipet yardımıyla 96'lık plate içerisine alındı. Ayrıca numune içermeyen kör numune hazırlandı. Referans amaçlı da troloks ve askorbik asit de benzer işlemlerden geçirilerek plate içerisine alındı. Karışımların absorbansı bir Multiscan Go Elisa okuyucu spektrofotometre ile 517 nm'de ölçüldü.

Standart çözeltiler için 0,2; 0,5; 1; 2; 4 µg askorbik asit ve troloks içeren çözeltiler hazırlandı. Aşağıda DPPH• radikalının indirgenmesi ile serbest radikal gideriminin reaksiyon şeması verilmiştir.



Şekil 3.6: DPPH• radikalının indirgenmesi ile serbest radikal giderimi.

3.2.5.2 Toplam Fenolik Madde Analizi

Fenolik bileşik içeriği için Folin-Ciocalteau (FCR) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı [90]. Toplam fenolik içerik deneyleri için reaksiyon ortamına, 10 µl numune (0,5 mg/ml) eklendi. Sırasıyla 133,3'er µl FCR (0,5 N) reaktifi ve Na₂CO₃ (%10) ilave edildi ve son hacim 500 µl'ye saf su ile tamamlandı. Daha sonra karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 760 nm'deki absorbans spektroskopik olarak kaydedildi. Kör çözelti için 133,3 µl FCR +133,3 µl %10 Na₂CO₃ eklendi ve son hacim 500 µl'ye saf su ile tamamlandı. Standart çözeltiler için 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 µg gallik asit içeren çözeltiler hazırlandı. Tüm örnekler 2 tekrarlı analiz edildi.

3.2.5.3 Toplam Flavonoid Analizi

Bu teknik; Singleton ve arkadaşları tarafından toplam fenoldeki antioksidanların seviyesini ölçmek amacıyla oluşturulmuştur [91]. Yöntemin temel fikri, elektronların fenolik ve diğer indirgeyici kimyasallardan molibdene taşınmasıdır. 750–765 nm'de mavi kompleks üretimi spektrofotometrik olarak ölçülür [92]. Son çalışmalar gallik asit yerine tannik asit, klorojenik asit, kafeik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferulik asit ikame etmiştir; buna rağmen gallik asit sıklıkla referans bileşen olarak kullanılmakta ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak verilmektedir [76]. FCR yöntemi, bir gıdanın veya bitki ekstraktının antioksidan içeriğini değerlendirmenin basit, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yoludur. Ticari

FCR reaktifine erişilebilir. Rutin uygulamalarda zorluk oranının yavaş olması, sulu fazda bulunması nedeniyle lipofilik bileşiklere uygulanamaması ve fenolik bileşiklerin sadece bazik ortamda reaksiyona girmesi yöntemin dezavantajlarıdır [93].

Herbir yağ numunesinde toplam flavonoid miktarları Gülçin vd. tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır [94]. Sabit ve uçucu yağ çözeltileri (1 mg/ml'lik çözeltiden 25 µl), %10 alüminyum klorür ve %5'lik sulu sodyum nitrit ve 1 N sodyum hidroksit içeren çözelti karışımı reaksiyon ortamında hazırlandı. Oda sıcaklığında 40 dakika inkübasyonun ardından absorban, 415 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Toplam flavonoid konsantrasyonu, standart olarak kuarsetin kullanılarak hesaplandı. Yağ numunelerindeki toplam flavonoid içerikleri, kuersetin kullanılarak hazırlanan ve kuersetin eşdeğerlerinin mikrogramları olarak ifade edilen standart eğriden hesaplandı. Hazırlanan kuersetin standart çözeltileri, 1; 2,5; 5; 10; 20; 40; 60; 80 µg kuersetin içermektedir.

3.2.5.4 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

İlk olarak Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem temel olarak 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neocuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm' de maksimumu absorban veren bakır (I)- neocuproin (Cu(I)-Nc) çelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır [177]. CUPRAC metodunun toplam antioksidan kapasite (TAC) analizinde diğer elektron transferi (ET) yöntemlerinden ayırıcı avantajı pH'ın kolay ayarlanabilmesi, rejanların kolay kullanılabilmesi ve stabil olması, basit, düşük maliyetli olması ve hidrofilik antioksidanların yanında lipofilik antioksidanlara uygulanabilmesidir [95].

Deney tüpüne bakır (II) klorür çözeltisi (2×10^{-2} M), Neocuproine (Nc) çözeltisi; ($1,5 \times 10^{-2}$ M) ve amonyum asetat tampon çözeltisi (pH=7) aktarıldı. Yağ numunesi (40 µl) eklenerek son hacim 500 µl olacak kadar saf su eklendi. Tüpler kapatılarak 1 saat bekletildi. Kuartz küvetler kullanılarak, 450 nm'de absorbanı spektroskopik olarak ölçüldü. Her antioksidan bileşiğinin standart kalibrasyon eğrisi, 0,3; 0,6; 1; 1,4; 1,8; 2,4; 3; 6 µg/µl askorbik asit ve troloks standart maddeleri ile absorban-konsantrasyon şeklinde bu şekilde oluşturuldu. Her bir analiz iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi [96].

4. BULGULAR

4.1 Elde Edilen Uçucu Yağ Ve Sabit Yağ Miktarları

Tablo 4.1: Biberiye bitkisi miktarına göre elde edilen sabit yağ miktarı ve kullanılan çözücü.

Biberiye Bitkisi Miktarı (g)	Elde Edilen Sabit Yağ Miktarı (g)	Kullanılan Çözücü	% Yağ
47,8 g	4,5 g	Hegzan	9,4
42,5 g	3,2 g	Hegzan	7,5
44,5 g	3,4 g	Hegzan	7,6
45,2 g	2,8 g	Kloroform	6,1

4.1.1 Uçucu Yağ Verimi

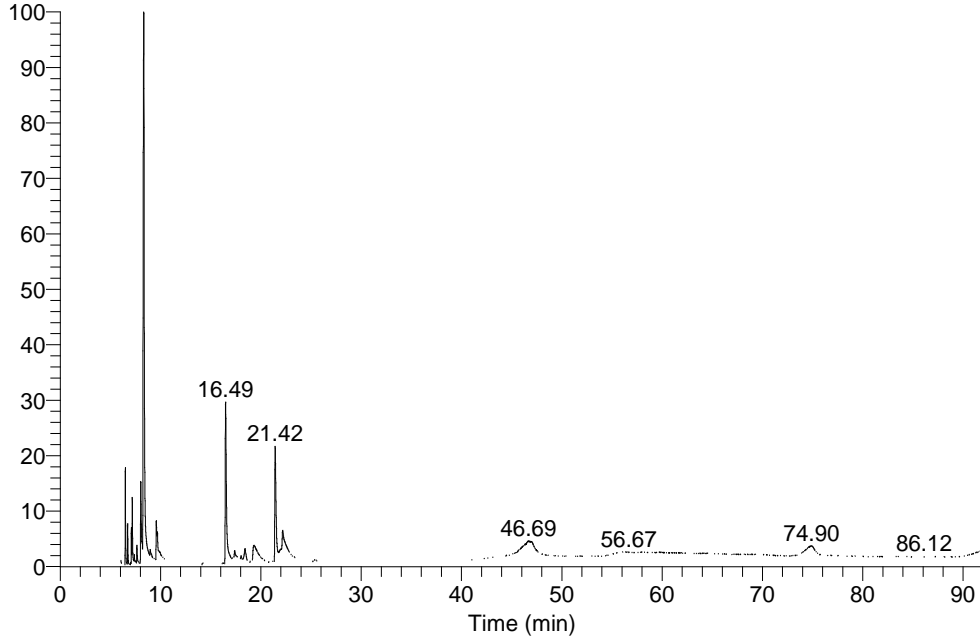
Tablo 4.2: Biberiye bitkisi miktarına göre elde edilen uçucu yağ miktarı.

Biberiye Bitkisi Miktarı (g)	Elde Edilen Uçucu Yağ Miktarı (g)	% Uçucu Yağ
112 g	0,87 g	0,77
82 g	0,64 g	0,77
88 g	0,68 g	0,77
98 g	0,79 g	0,80
105g	0,87 g	0,82
102g	0,92 g	0,89
127 g	1,21 g	0,95
208 g	2,22 g	1,06

4.2 GC-MS ANALİZİ

4.2.1 Uçucu Yağ Bileşenleri Analizi

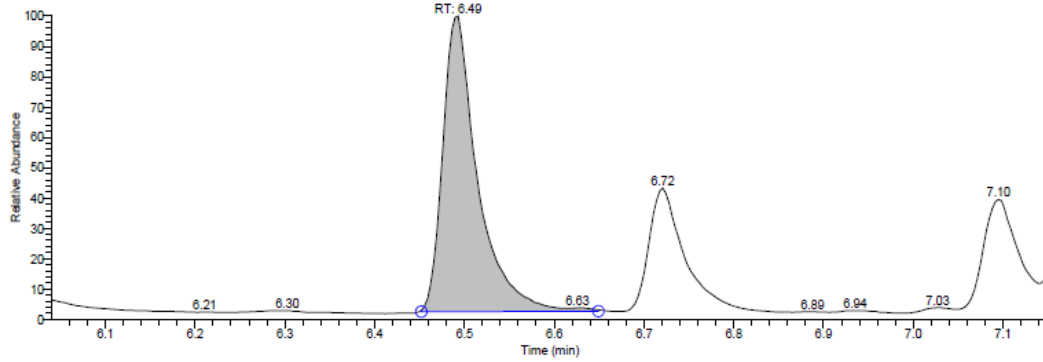
RT: 0.00 - 92.12



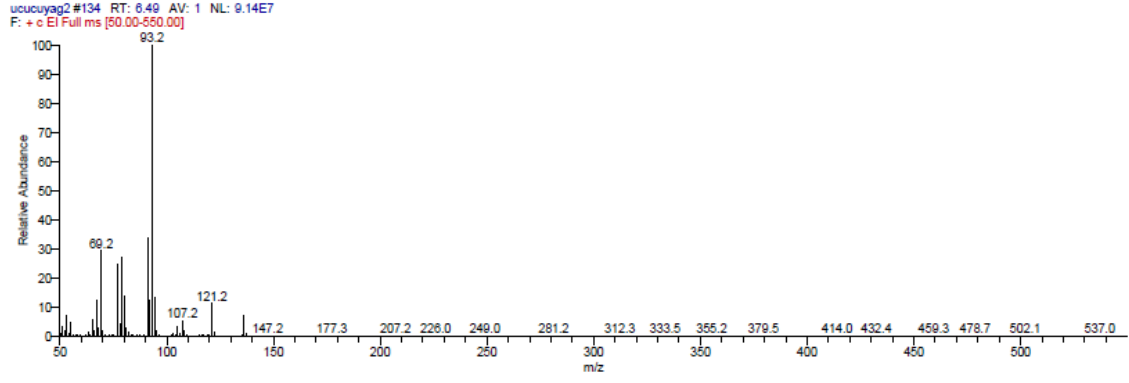
NL:
1.77E9
TIC MS
ucucuyag2

Şekil 4.1: Biberiye uçucu yağ GC-MS kromatogramı.

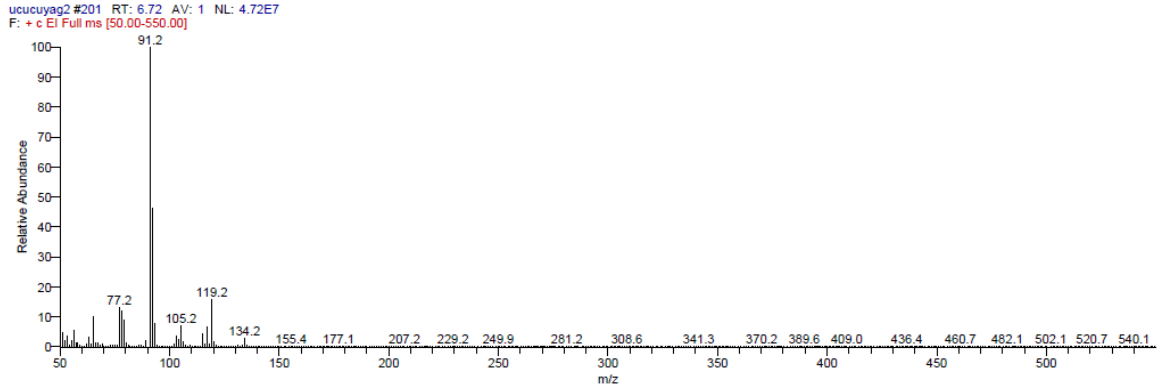
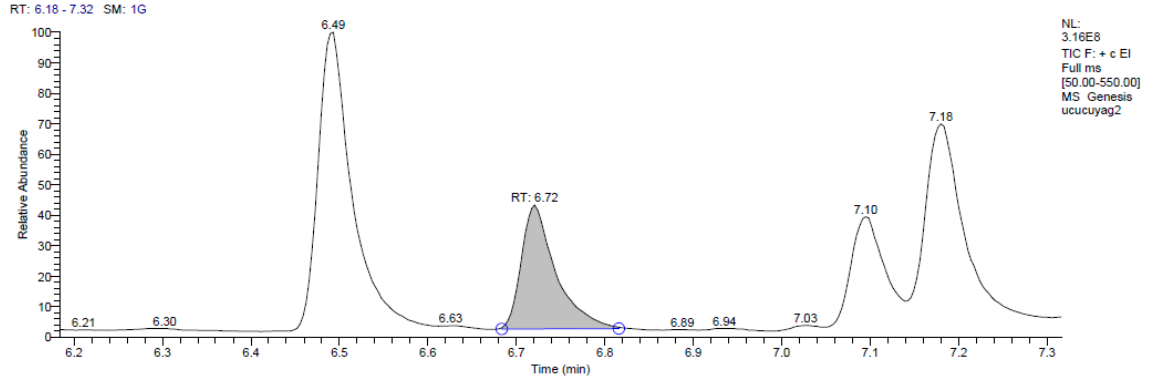
RT: 6.04 - 7.15 SM: 1G



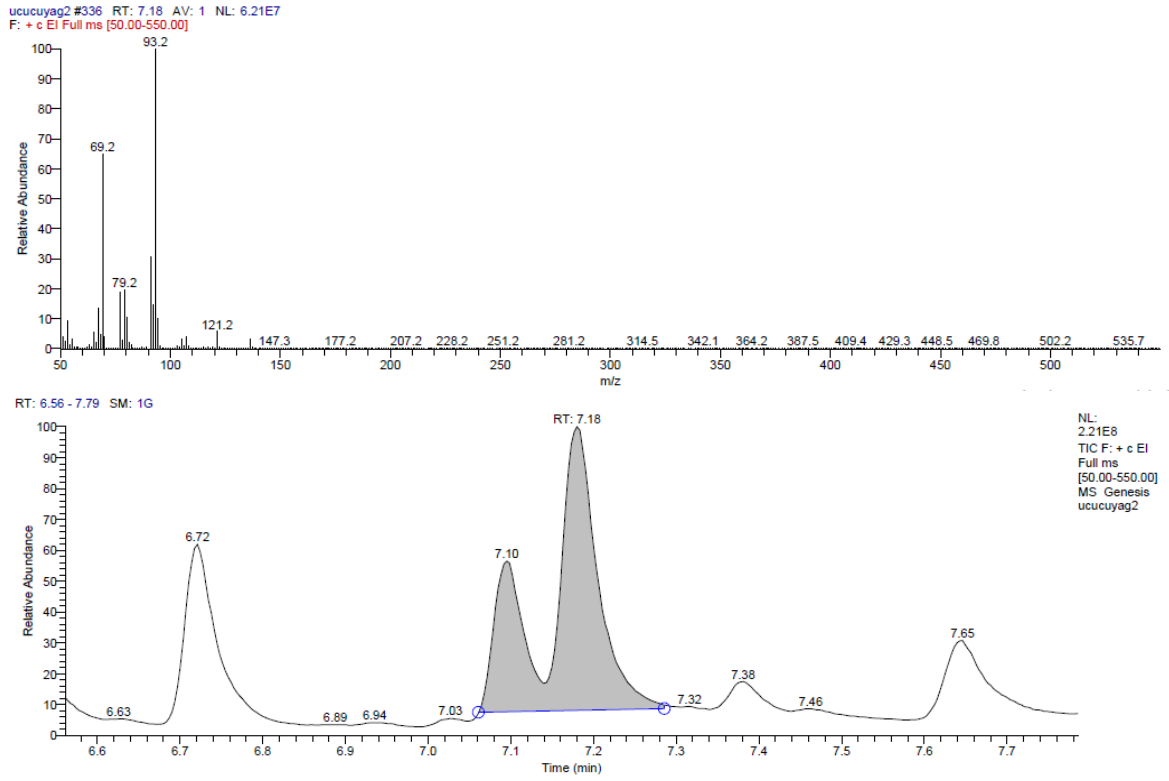
NL:
3.16E8
TIC F: + c EI
Full ms
[50.00-550.00]
MS Genesis
ucucuyag2



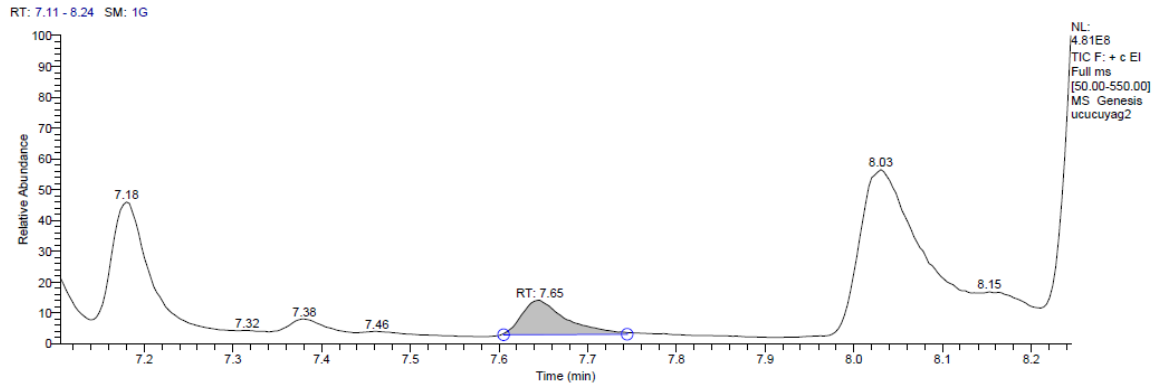
Şekil 4.2: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan α -pinen bileşeninin GC-MS kromatogramı.

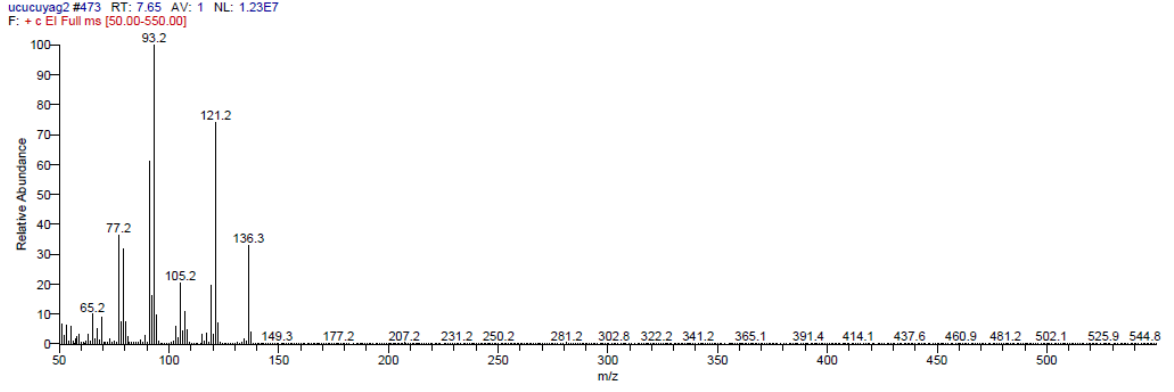


Şekil 4.3: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan 2,4(10)-Thujadien bileşeninin GC-MS kromatogramı.

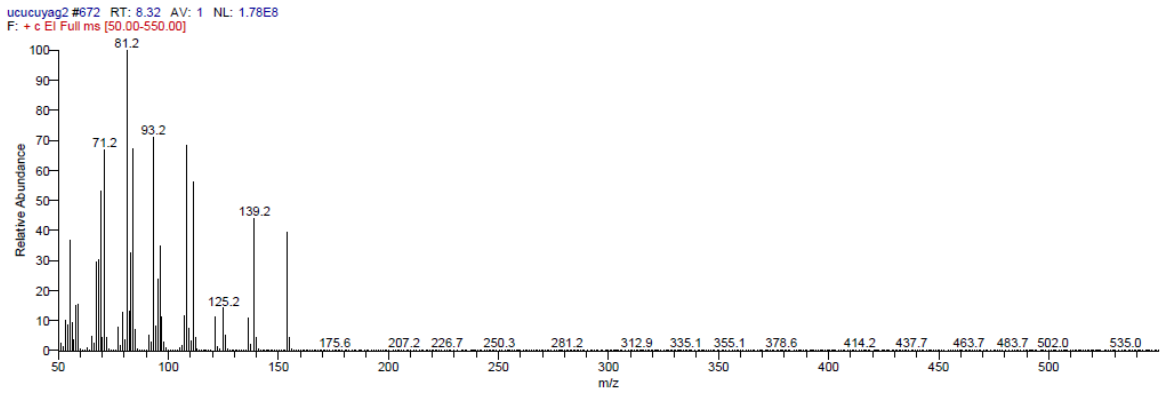
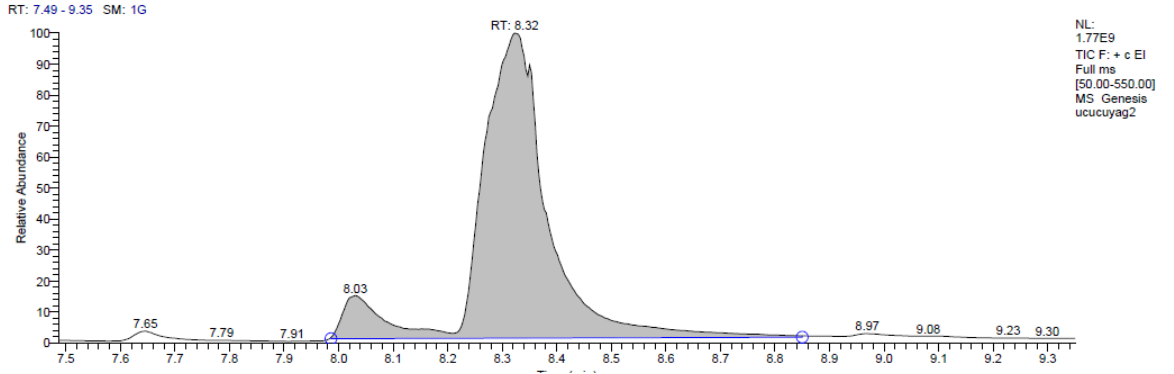


Şekil 4.4: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan β -Pinen ve β -Mirsen bileşeninin GC-MS kromatogramı.

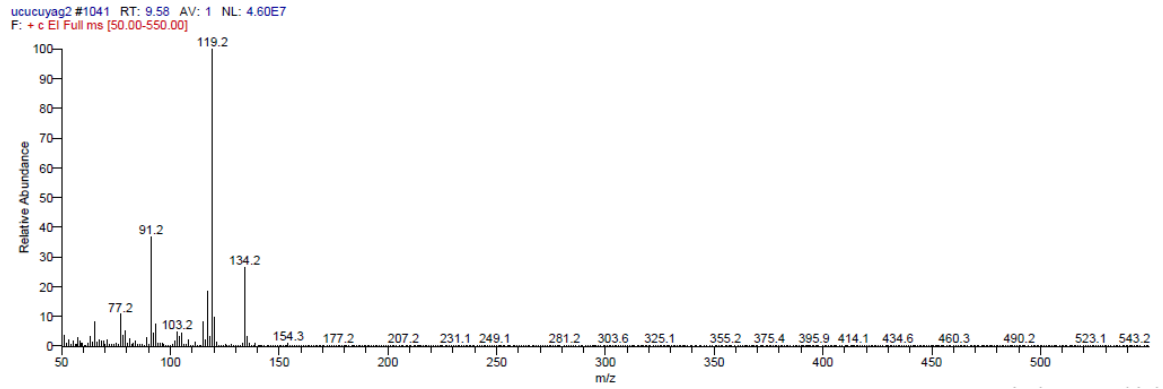
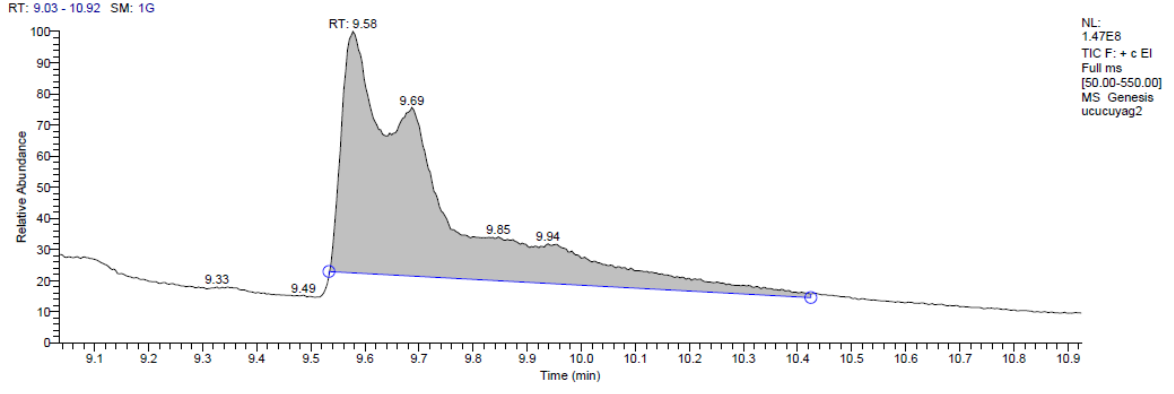




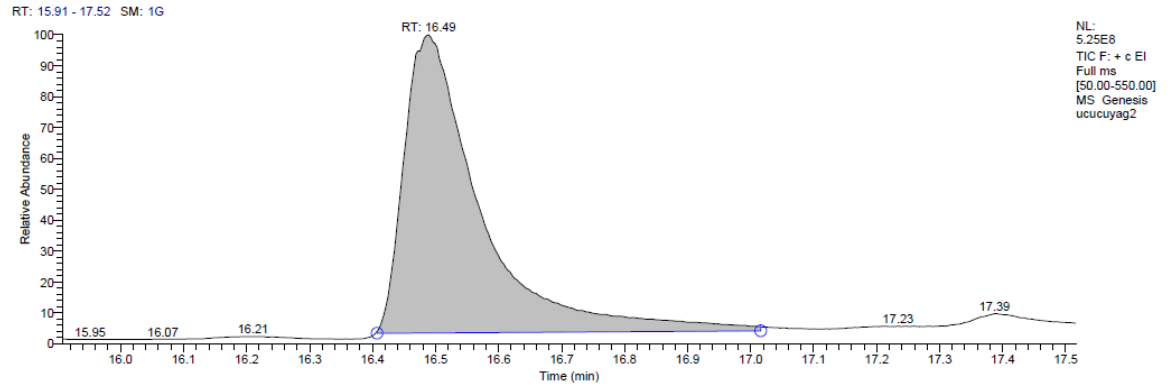
Şekil 4.5: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan α -terpinen ve α -terpineol bileşeninin GC-MS kromatogramı.

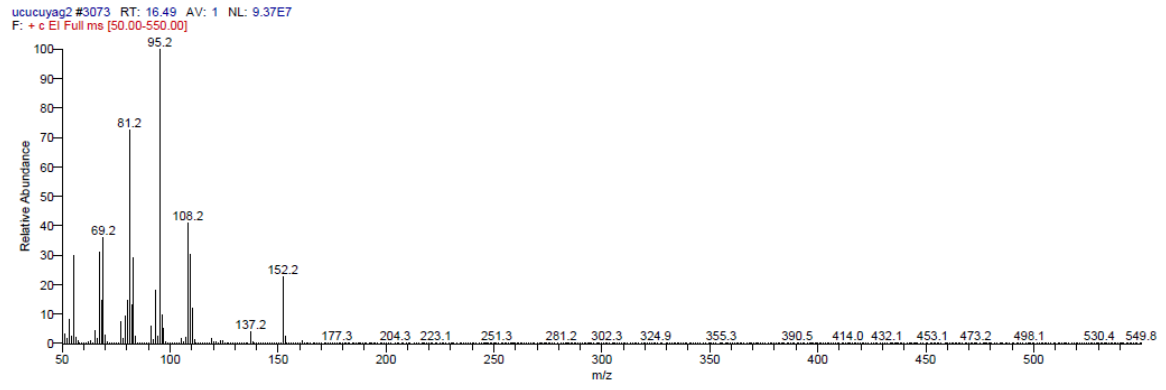


Şekil 4.6: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan 1,8-sineol bileşeninin GC-MS kromatogramı.

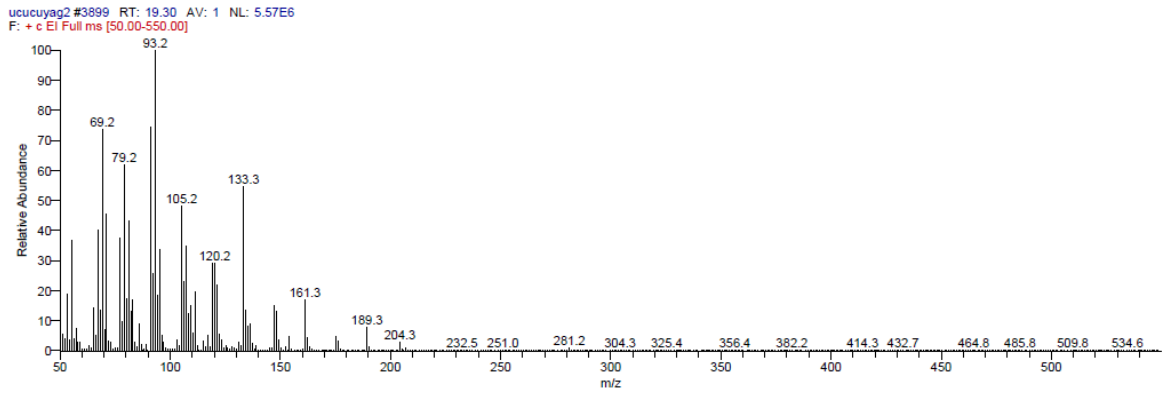
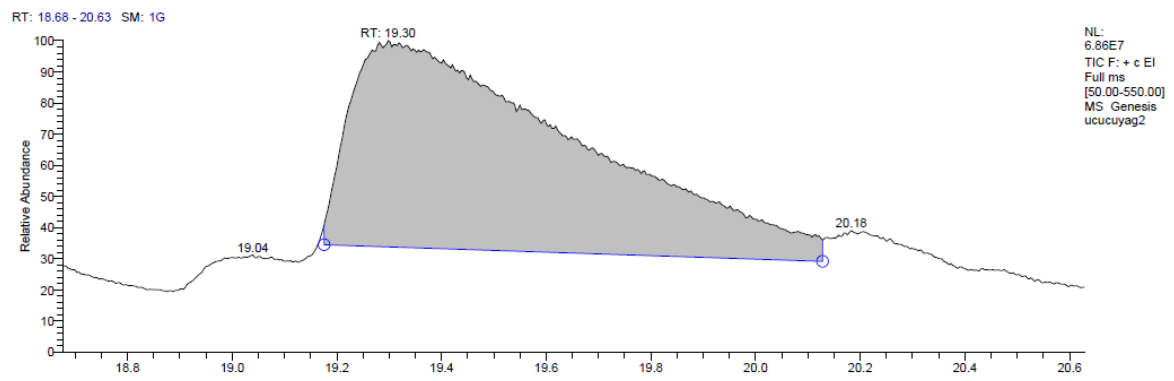


Şekil 4.7: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan o-simen ve p-simen bileşeninin GC-MS kromatogramı.

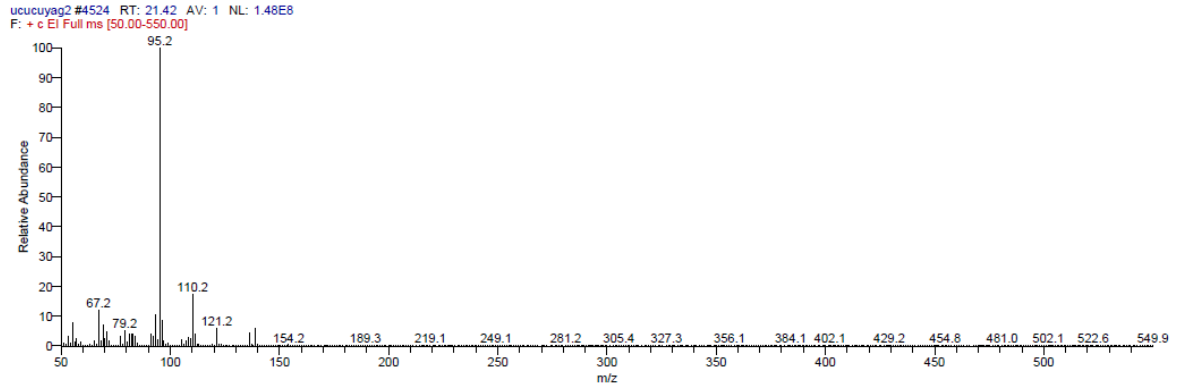
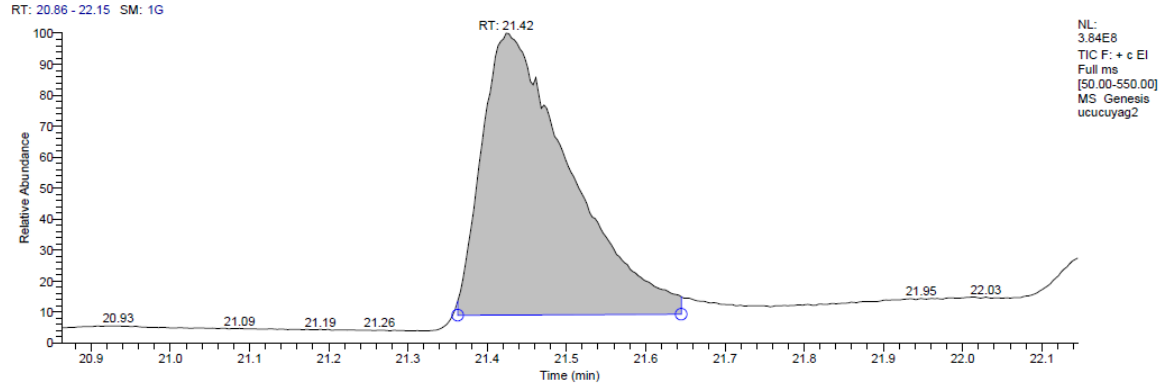




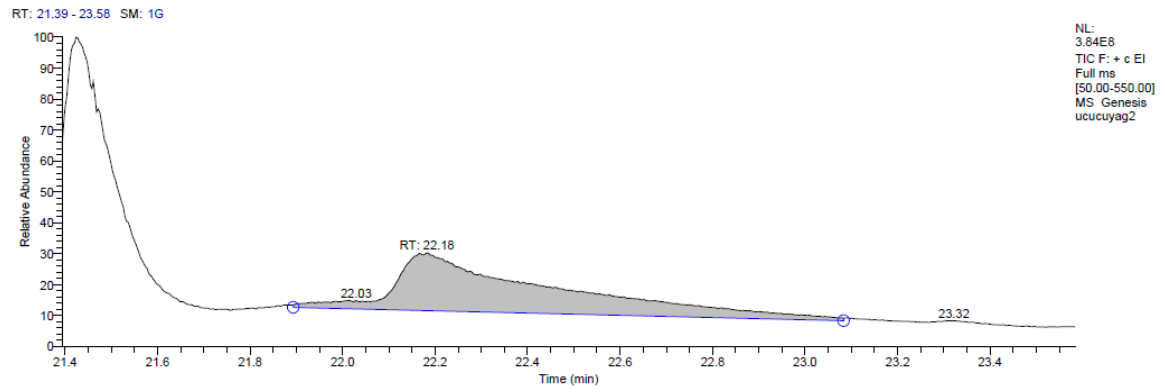
Şekil 4.8: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan kafur bileşeninin GC-MS kromatogramı.

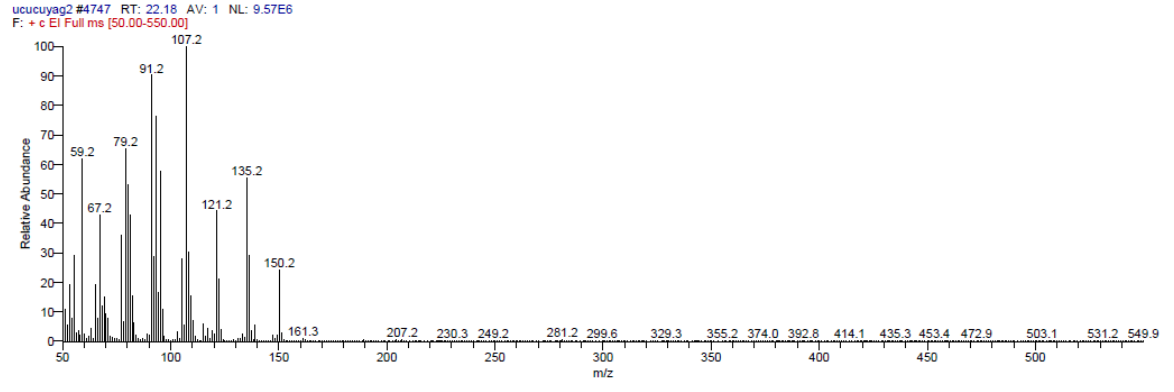


Şekil 4.9: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan karyofilen bileşeninin GC-MS kromatogramı.



Şekil 4.10: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan borneol bileşenin GC-MS kromatogramı.



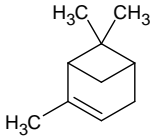
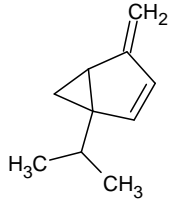
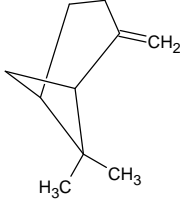
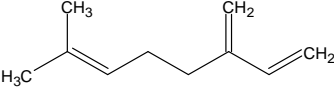
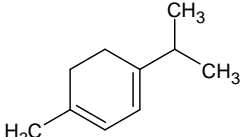
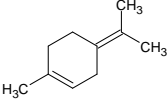
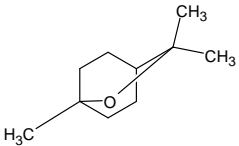
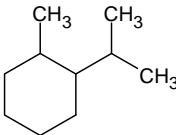
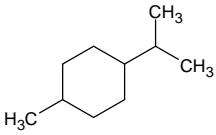
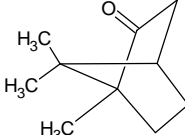
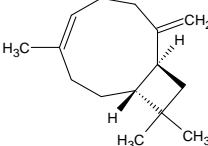
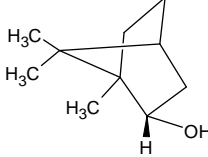
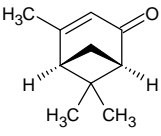


Şekil 4.11: Biberiye uçucu yağı içerisinde bulunan levoverbenon bileşeninin GC-MS kromatogramı.

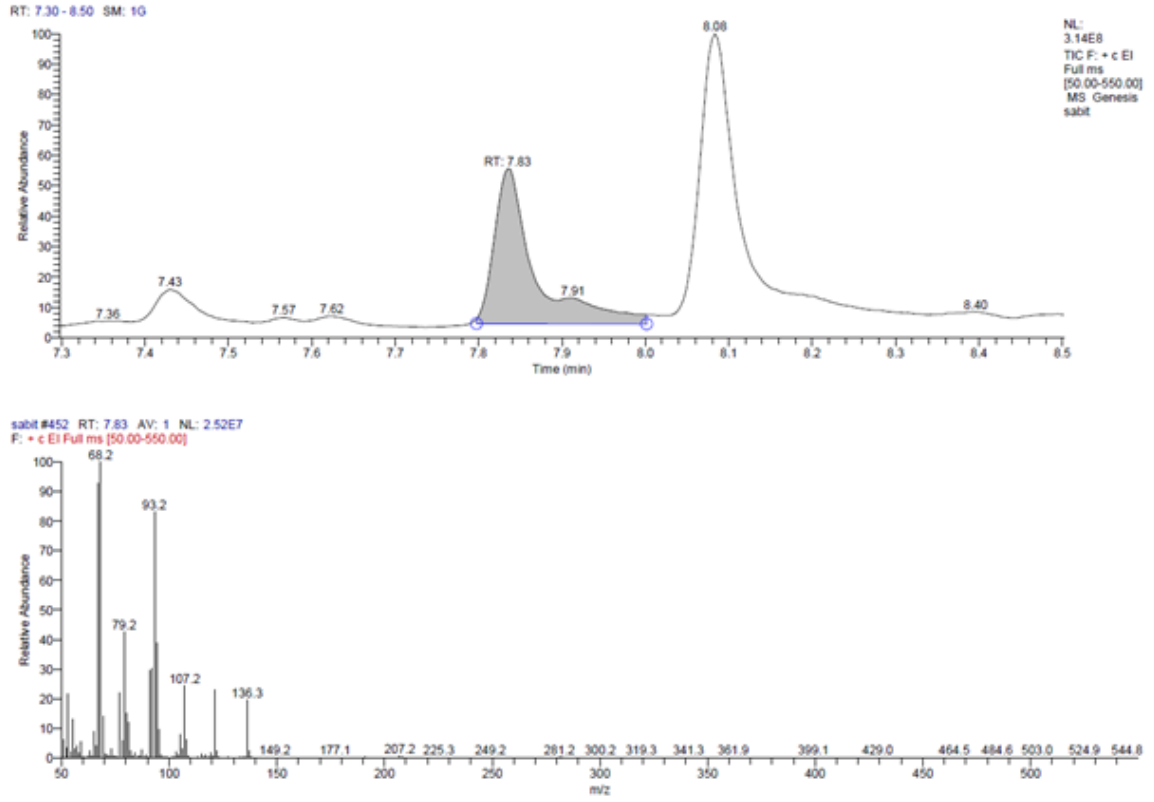
Tablo 4.3: Biberiye bitkisinin uçucu yağ GC-MS bileşenleri.

Number	RT	Compound Name	CAS Number	Formula	Molecular weight	Area	Area %	RI (deneysel)	RI (literatür)	Literatür
1	6,49	α -Pinen	80-56-8	C10H16	136,2340	834817417,5	2,9	1085	1020	[97]
2	6,72	2,4(10)-Thujadien	36262-09-6	C10H14	134,2182	346305824,5	1,2	1104	1135	[98]
3	7,18	β -Pinen	127-91-3	C10H16	136,2340	876365793,4	3,04	1132	1108	[97]
4	7,18	β -Mirsen	123-35-3	C10H16	136,2340	876365793,4	3,04	1132	1165	[99]
5	7,65	α -terpinen	99-86-5	C10H16	136,2340	185533076,7	0,64	1159	1159	[100]
6	7,65	α -Terpinolen	586-62-9	C10H16	136,2340	185533076,7	0,64	1159	1278	[101]
7	8,32	1,8-Sineol	470-82-6	C10H18O	154,2493	15157180849	52,64	1194	1209	[99]
8	9,58	o-Simen	527-84-4	C10H14	134,2182	1314601221	4,57	1252	1248	[102]
9	9,58	p-Simen	99-87-6	C10H14	134,2182	1314601221	4,57	1252	1265	[103]
10	16,49	Kafur	76-22-2	C10H16O	152,2334	4275083479	14,85	1497	1492	[104]
11	19,3	Karyofilen	87-44-5	C15H24	204,3511	1395943237	4,85	1593	1585	[103]
12	21,42	Borneol	507-70-0	C10H18O	154,2493	2706045043	9,4	1667	1672	[104]
13	22,18	Levoverbenon	1196-01-6	C10H14O	150,2176	1699986524	5,9	1693	1723	[105]

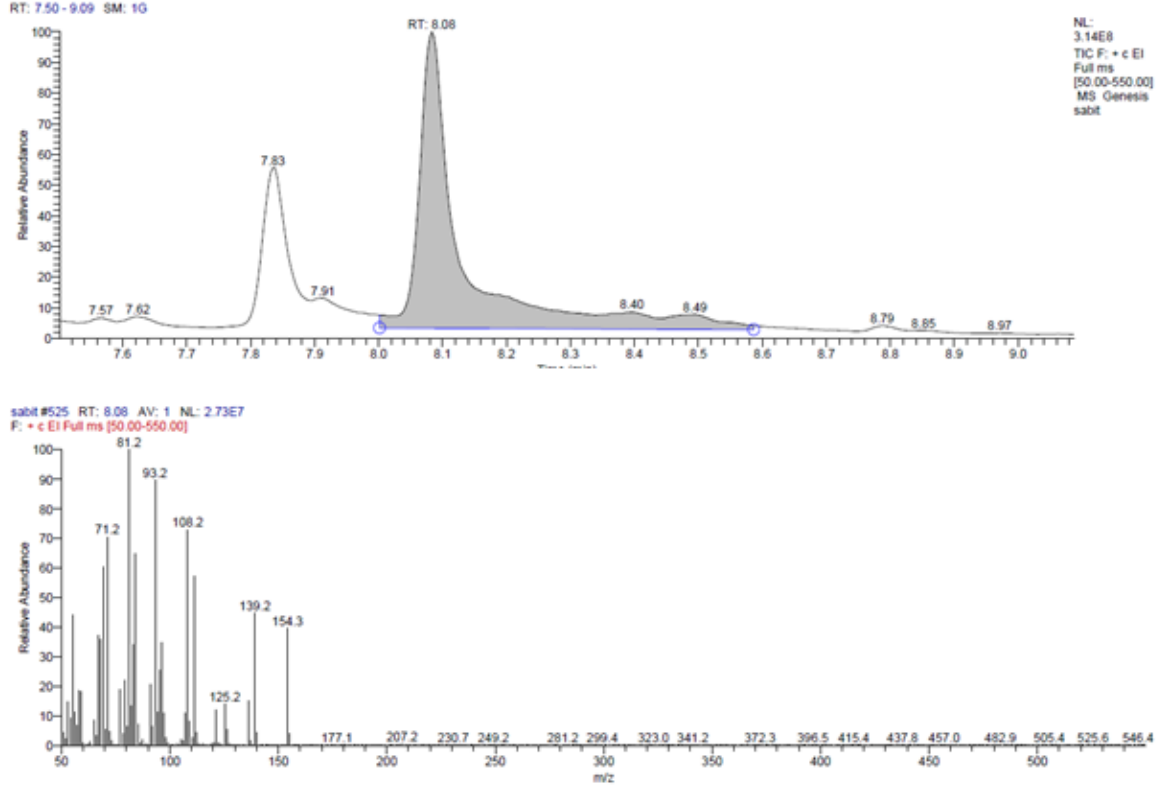
Tablo 4.4: Uçucu yağ kimyasal bileşenleri molekül şekilleri.

 <p>α-Pinen</p>	 <p>2,4(10)-Thujadien</p>	 <p>β-Pinen</p>
 <p>β-Mirsen</p>	 <p>α-Terpinen</p>	 <p>α-Terpinolen</p>
 <p>1,8-Sineol</p>	 <p>o-Simen</p>	 <p>p-Simen</p>
 <p>Kafur</p>	 <p>Karyofilen</p>	 <p>Borneol</p>
 <p>Levoerverbenon</p>		

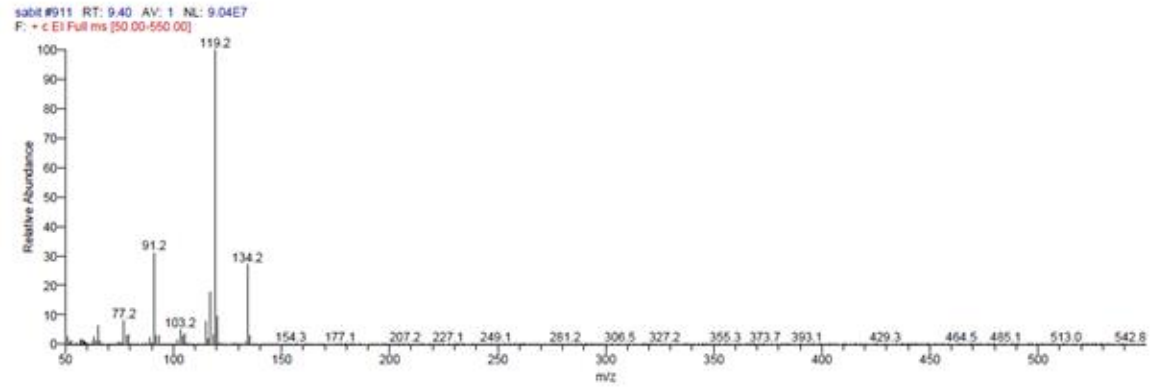
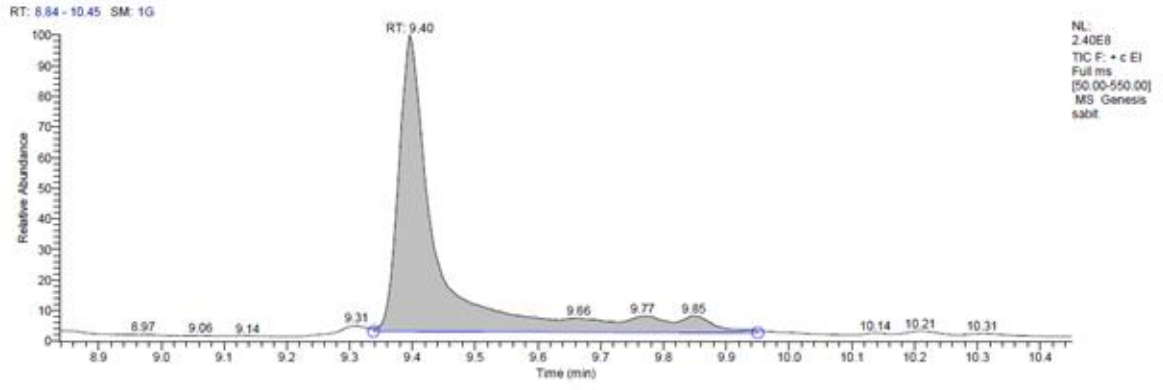
4.2.2 Sabit Yağ Bileşenleri Analizi



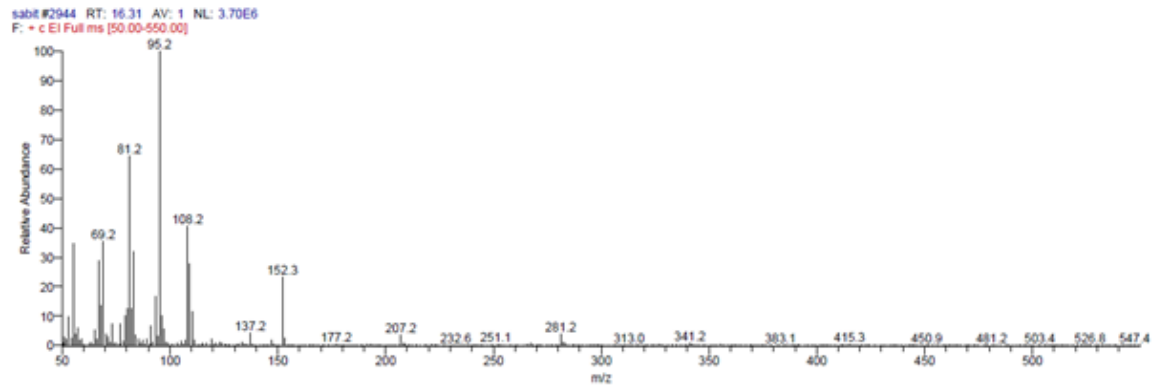
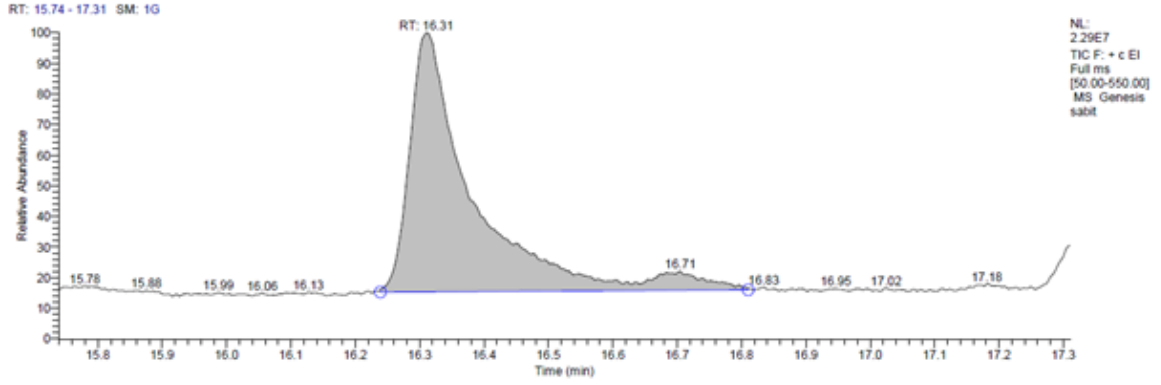
Şekil 4.12: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan α -terpinen bileşeninin GC-MS kromatogramı.



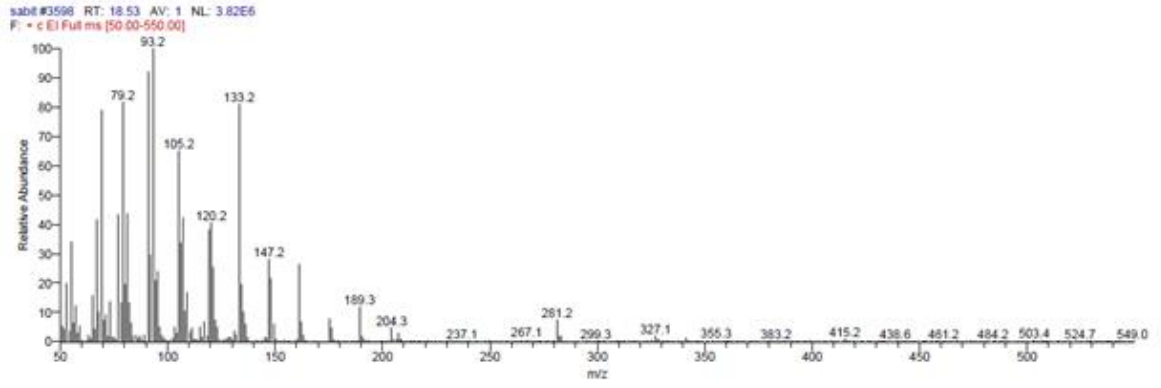
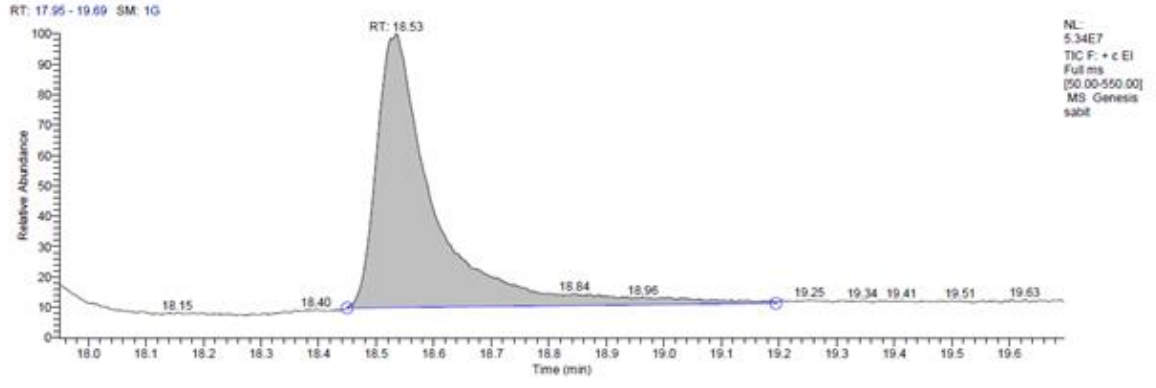
Şekil 4.13: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan 1,8-sineol bileşeninin GC-MS kromatogramı.



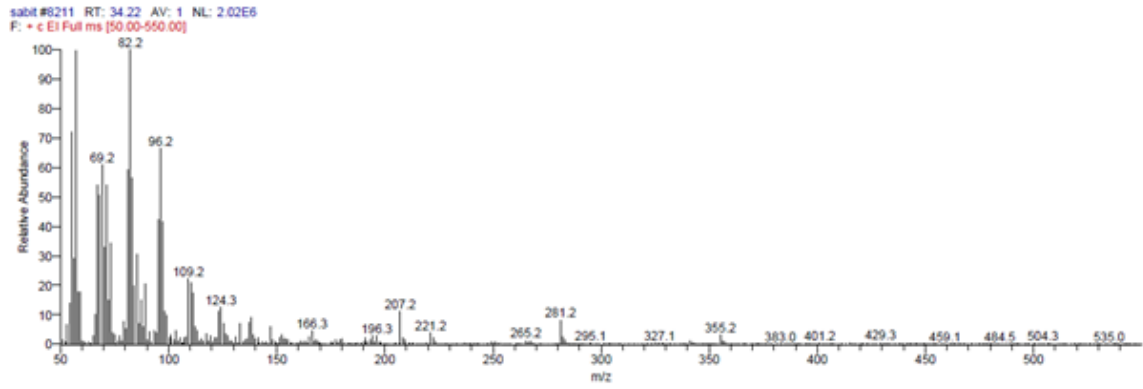
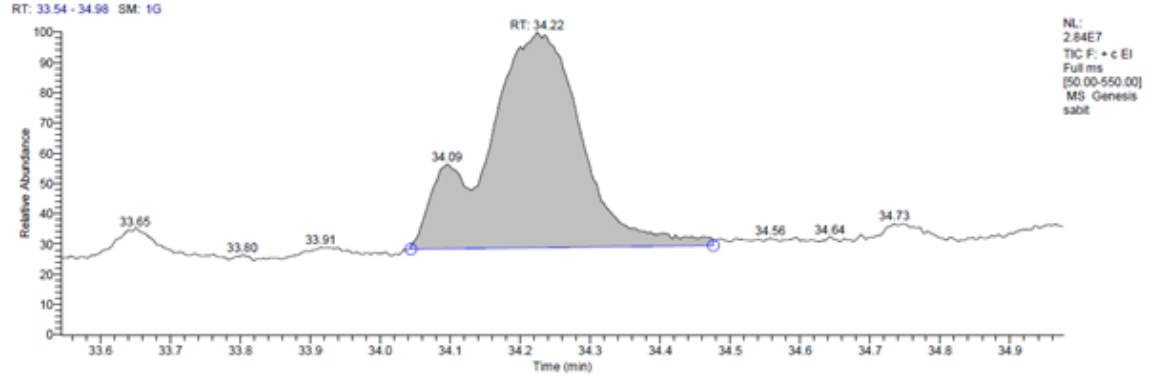
Şekil 4.14:Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan p-simen bileşeninin GC-MS kromatogramı.



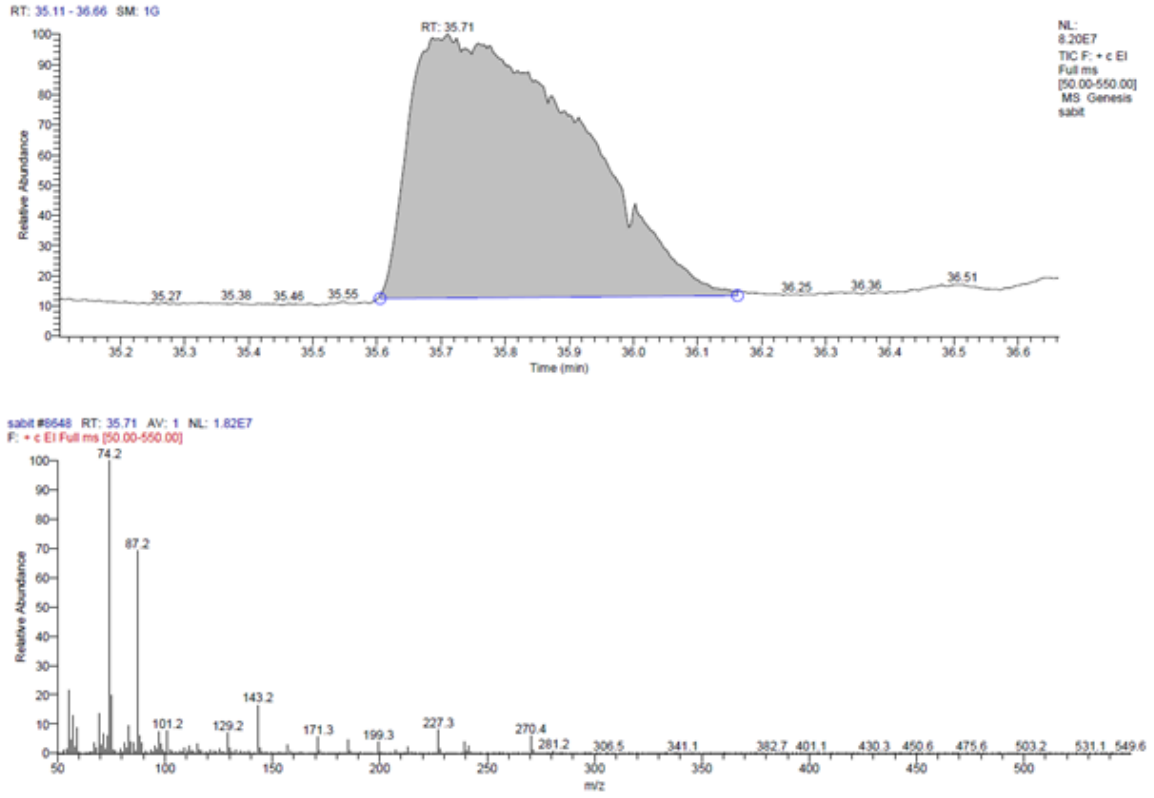
Şekil 4.15: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan kafur bileşeninin GC-MS kromatogramı.



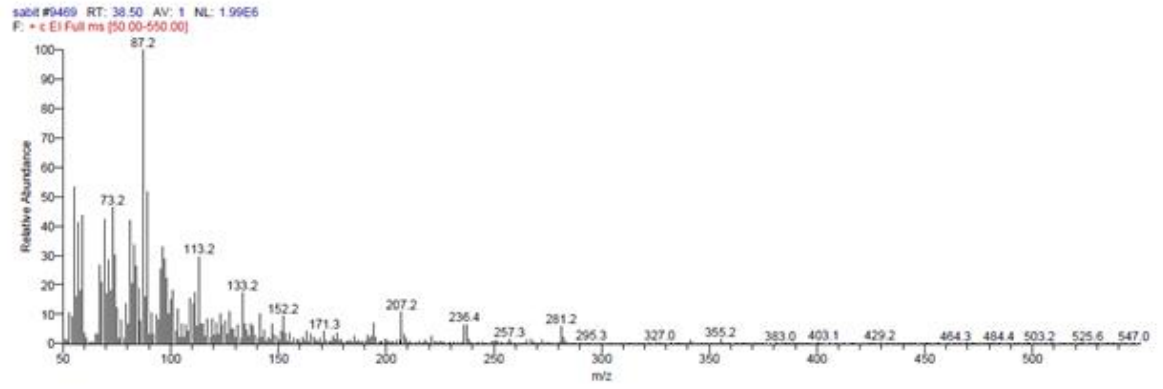
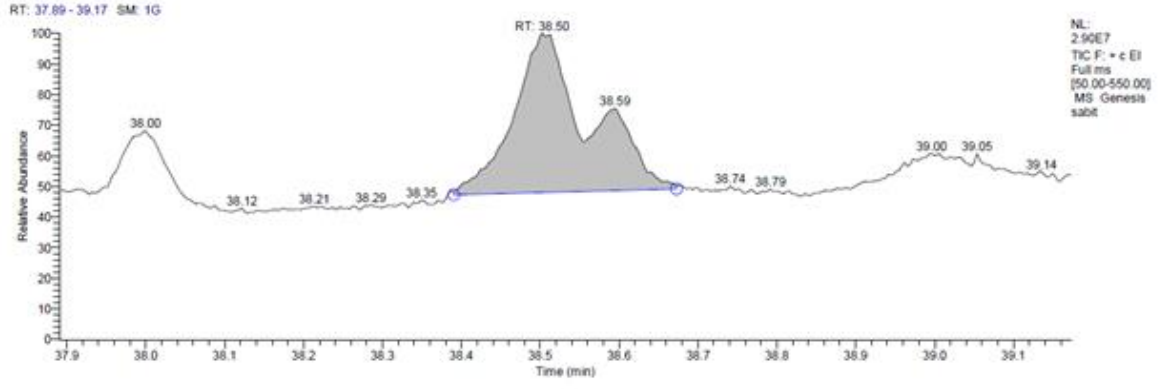
Şekil 4.16: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan karyofilen bileşeninin GC-MS kromatogramı.



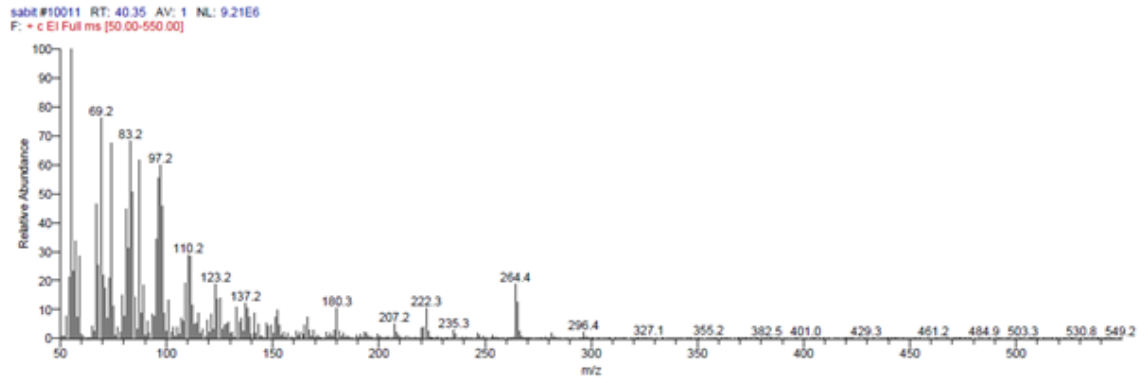
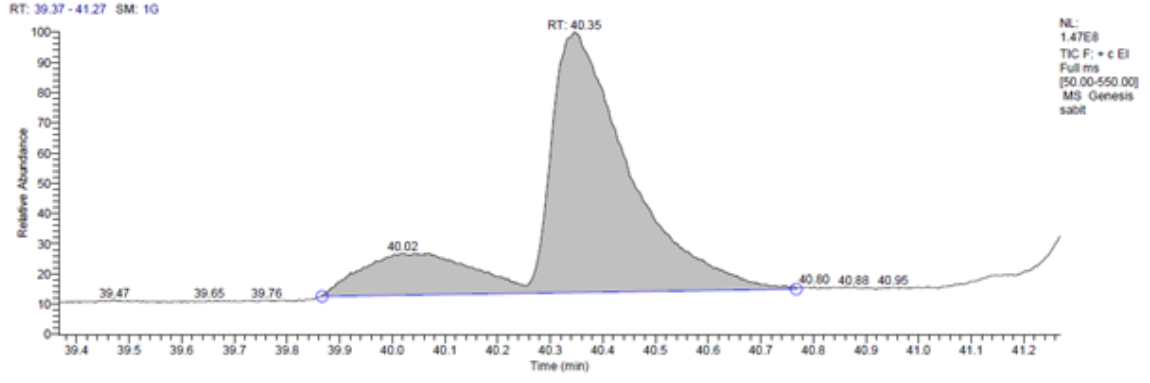
Şekil 4.17: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan dokosan bileşeninin GC-MS kromatogramı.



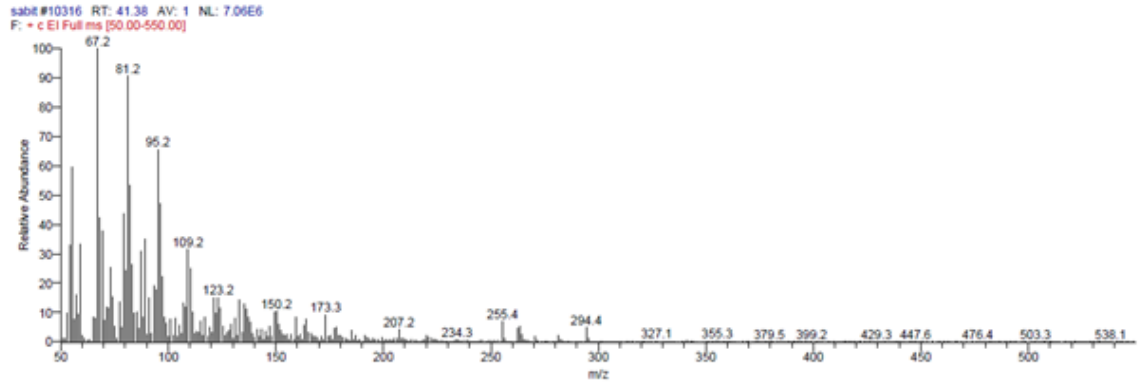
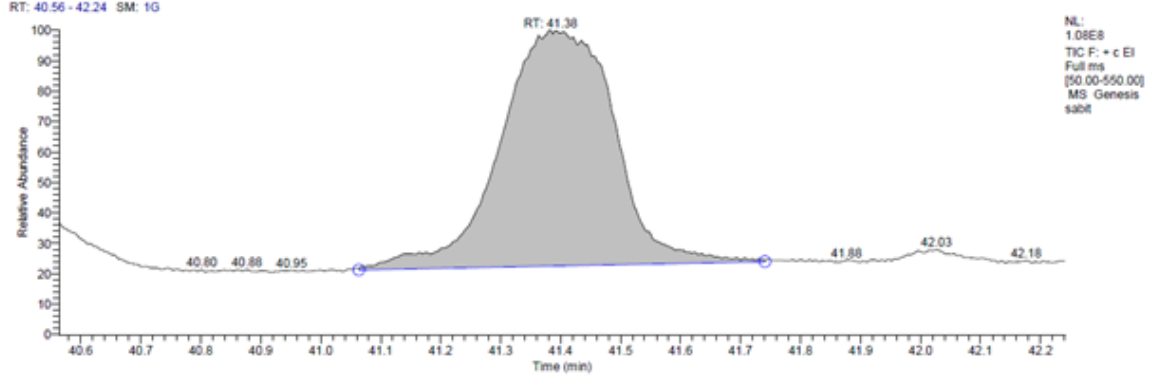
Şekil 4.18: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan palmitik asit metil ester (C16:0) bileşenin GC-MS kromatogramı.



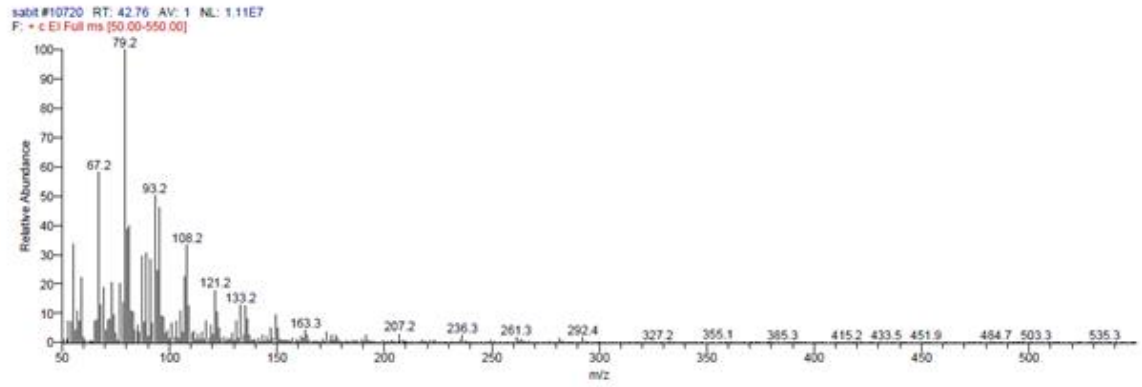
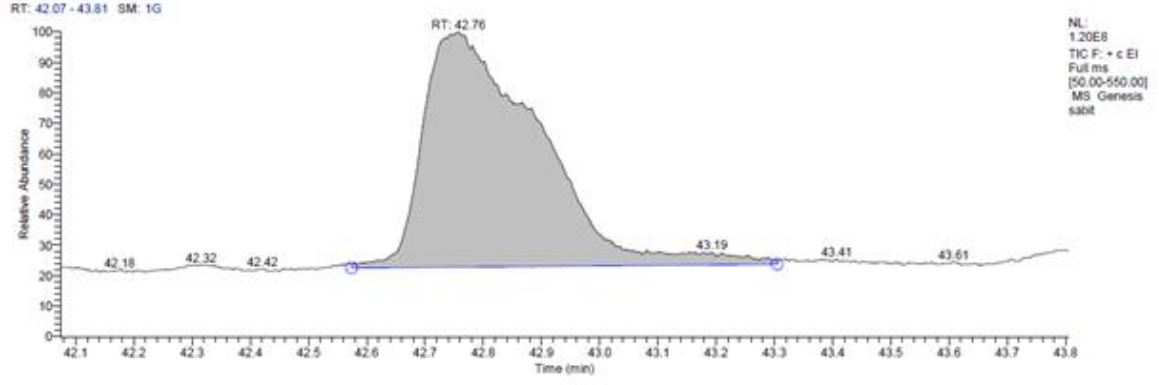
Şekil 4.19: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan palmitoleik asit metil ester (C16:1) bileşenin GC-MS kromatogramı.



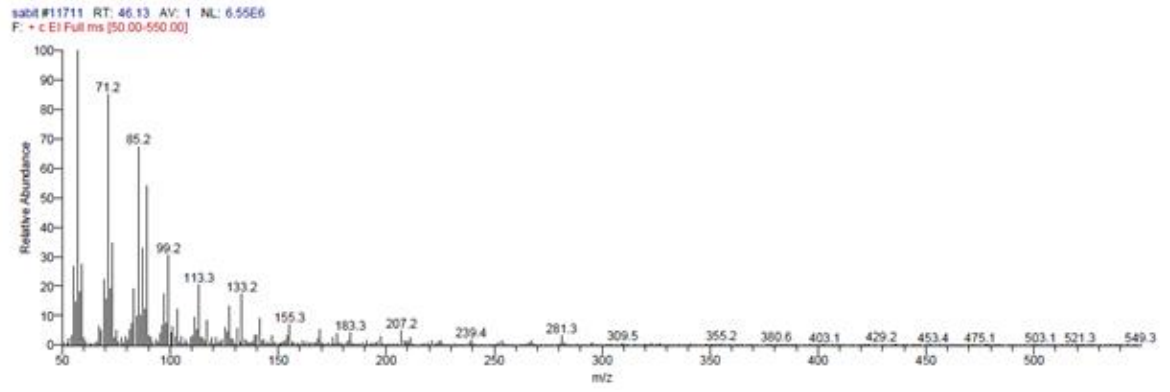
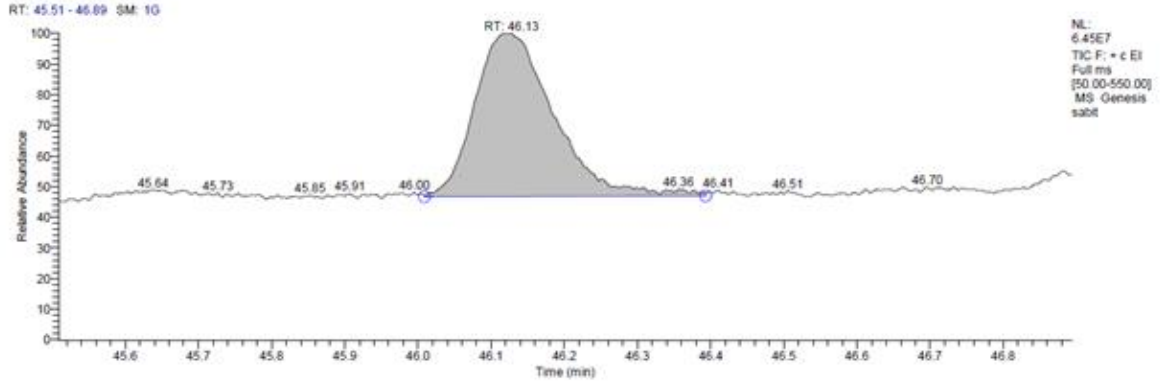
Şekil 4.20: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan oleik asit metil ester bileşeninin GC-MS kromatogramı.



Şekil 4.21: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan linoleik asit ester bileşeninin GC-MS kromatogramı.



Şekil 4.22: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan γ -linolenik asit metil ester bileşenin GC-MS kromatogramı.

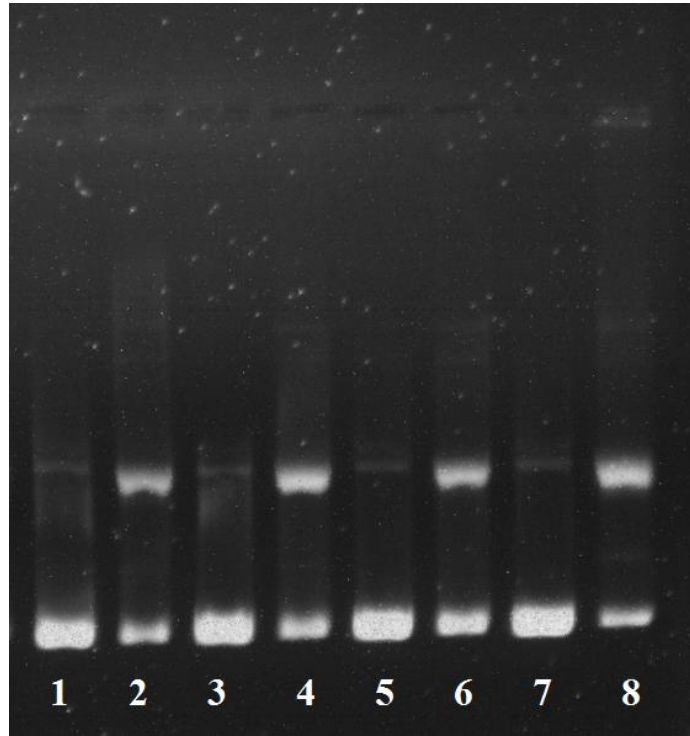


Şekil 4.23: Biberiye sabit yağı içerisinde bulunan heptakosan bileşenin GC-MS kromatogramı.

Tablo 4.5: Biberiye bitkisinin sabit yağ GC-MS bileşenleri.

No	RT	Compound Name	Area	Area %
1	7,83	α -terpinen	543354259,1	3,5
2	8,08	1,8-sineol	1402053671	9,04
3	9,4	p-simen	1034266863	6,67
4	16,3	Kafur	134016510,8	0,86
5	18,5	Karyofilen	338735257,9	2,18
6	34,2	Dokosan	196733439	1,27
7	35,7	Palmitik asit metil ester (C16:0)	1315306916	8,48
8	38,5	Palmitoleik asit metil ester (C16:1)	100414675,8	0,65
9	40,4	Oleik asit metil ester	1590803441	10,25
10	41,4	Linoleik asit metil ester (18:2n6c)	1115483984	7,19
11	42,8	γ -Linolenik asit metil ester(18:3n6)	1293741200	8,34
12	46,1	Heptakosan (CAS)	257681553,5	1,66
			Toplam	60,09

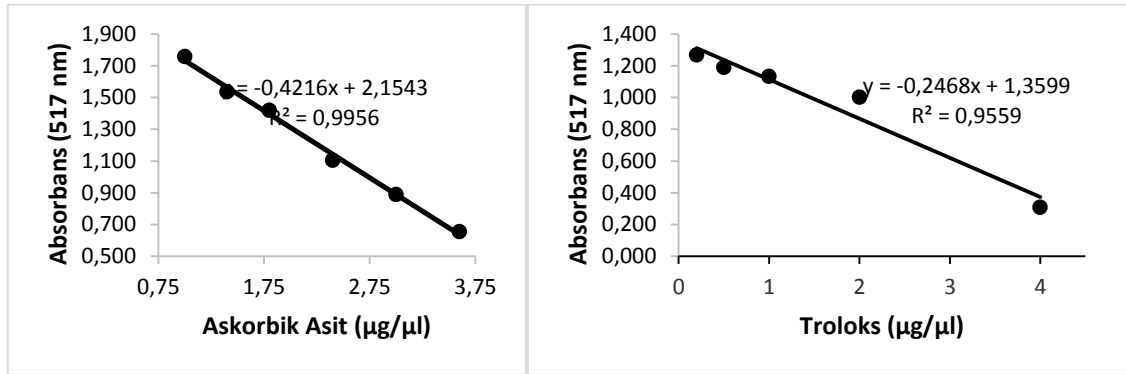
4.3 Elde Edilen Sabit Yağ ve Uçucu Yağ Numunelerinin DNA Koruma Etkisi



Şekil 4.24: Agaroz jel elektroforezi ile H₂O₂ kaynaklı Plazmid DNA hasarı analizinde biberiye sabit yağlarının ve uçucu yağlarının etkisi (1; negatif (plazmit + su), 2; pozitif (plazmit + su + fenton), 3; 1 mg ml⁻¹ kuersetin, 4; 1 mg ml⁻¹ kuersetin + fenton, 5; 1 mg ml⁻¹ uçucu yağ, 6; 1 mg ml⁻¹ uçucu yağ + fenton, 7; 1 mg ml⁻¹ sabit yağ, 8; 1 mg ml⁻¹ sabit yağ + fenton).

4.4 Antioksidan Aktivite Tayini

4.4.1 DPPH Yöntemi

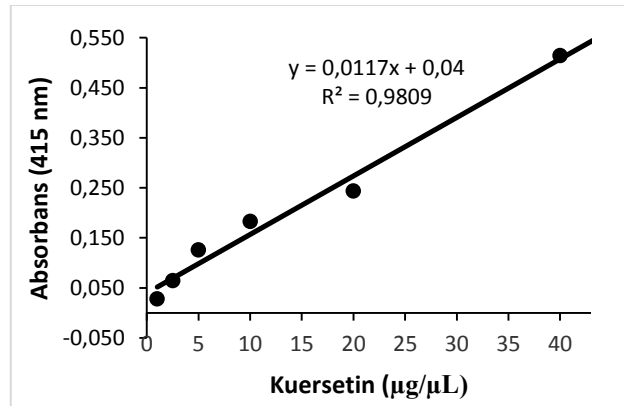


Şekil 4.25: DPPH antioksidan analizinde kullanılan askorbik asit ve troloks için standart kalibrasyon eğrileri.

Tablo 4.6: Örneklerin DPPH yöntemi ile elde edilen antioksidan miktarları.

Kod	µg/µl Askorbik Asit Eşdeğeri	Troloks eşdeğeri µg /µl
Sabit Yağ	0,0404	0,0742
Uçucu Yağ	0,0185	0,0227

4.4.2 Toplam Flavonoid Analizi

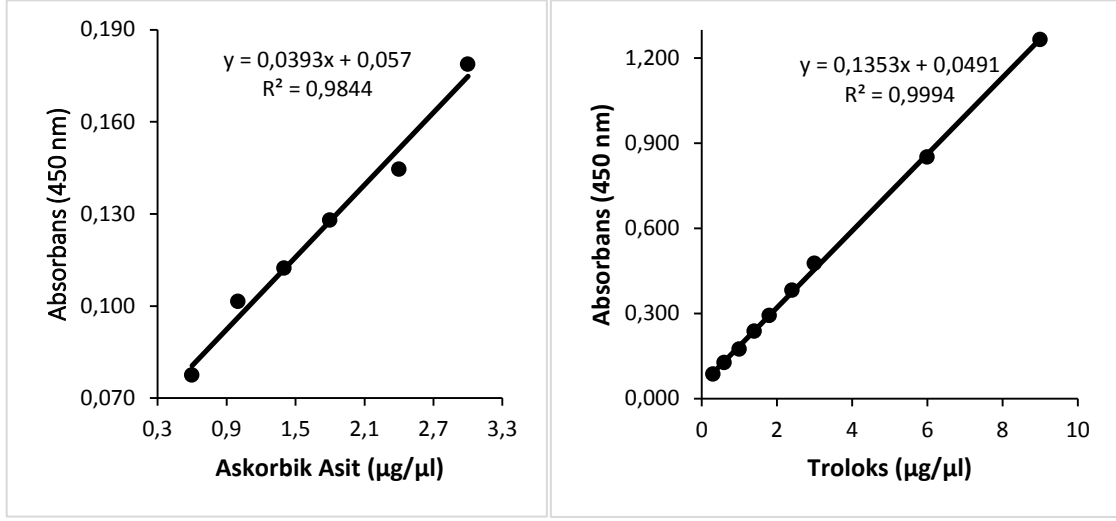


Şekil 4.26: Toplam flavonoid analizi kuersetin standart kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.7: Örneklerin toplam flavonoid miktarı, antioksidan miktarı.

Kod	µg/µl Kuersetin Eşdeğeri
Sabit Yağ	0,0964
Uçucu Yağ	Tespit Edilmedi

4.4.3 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Tayini

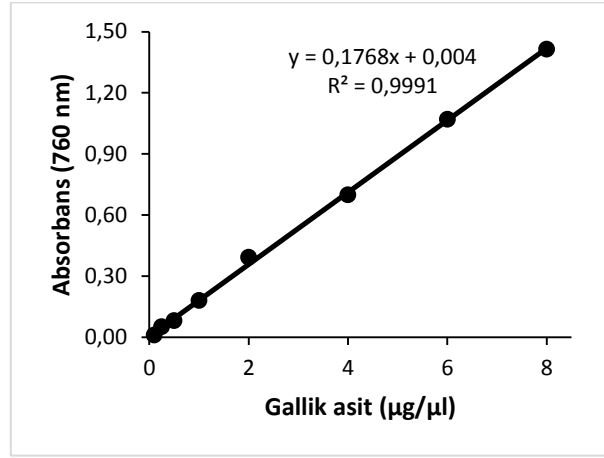


Şekil 4.27: CUPRAC yöntemi: Toplam antioksidan analizi askorbik asit ve troloks kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.8: Örneklerin antioksidan aktivitesi (Cu (II) İyonu İndirgeyici antioksidan kapasite, CUPRAC).

Kod	µg/µl Askorbik Asit Eşdeğeri	Troloks eşdeğeri µg /µl
Sabit Yağ	0,3516	0,0004
Uçucu Yağ	0,0167	Tespit Edilmedi

4.4.4 Toplam Fenolik Madde Analizi



Şekil 4.28: Toplam fenolik madde analizi gallik asit standart kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.9: Örneklerin toplam fenolik madde miktarı, antioksidan miktarı.

Kod	µg/µl Gallik Asit Eşdeğeri
Sabit Yağ	0,0201
Uçucu Yağ	0,0003

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Rosmary officinalis (biberiye), Balıkesir ile bandırma ilçesi, 600 evler mevkiinden eylül 2023'te toplanmıştır. Tür belirleme çalışması Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen Bilimleri Eğitim Bölümü Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Taner ÖZCAN tarafından belirlenmiştir [88]. Fitokimya kapsamında GC-MS ile kimyasal bileşenleri tespit edilmiş ve FTIR ile genel fonksiyonel grupları tespit edilmiştir. DNA kırınım etkisi hem biberiye uçucu yağına hem sabit yağı ile incelenmiştir. Ayrıca antioksidan özellikleri; DPPH yöntemi, toplam flavonoid, Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve toplam fenolik madde yöntemleri ile tespit edilmiştir.

Biberiyenin antioksidatif aktivite kaynakları, aktif etken bileşenlerinin (karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asit) ve antioksidatif etkilerinin farklı mevsimlere göre değişiklik gösterdiği ve Eylül ayında toplanan biberiye bitkisinden elde edilen ekstratlar antioksidatif etki bileşenlerinin ve antioksidan aktivitelerinin fazla olduğu bildirilmiştir [106]. Bu çalışma kapsamında biberiye bitki materyeli bu sebeple eylül ayında hasat edilmiştir.

Literatür araştırmalarına göre 100 g biberiye için sabit yağ verimi %5 olarak verilmiştir [107]. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi hegzan çözücüsünün kullanıldığı numunelerde sabit yağ verimi sırasıyla % 9,4, %7,5 ve %7,6 olurken kloroform çözücüsü kullanılan numunenin yağ verimi % 6,1 olarak bulunmuştur. Hegzan çözücüsü kullanılan 3 adet deneysel çalışmanın ortalaması %8,1 dir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sabit yağların verimi literatür verilerine göre daha fazladır (% 8,1 > % 5).

Literatür araştırmalarına göre 100 g biberiye örneğinde uçucu yağ verimi % 0,3-0,5 arasındadır [108]. Tablo 4.2' de verilen uçucu yağ verimi değerleri incelendiğinde en düşük uçucu yağ verimi % 0,77 iken elde edilen en yüksek uçucu yağ verimi % 1,06 dır. Gerçekleştirilen deneylerde 8 adet deneyde elde edilen ve uçucu yağ verimi ortalaması ise % 0,85 olarak belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen uçucu yağların verimi literatür verilerine göre daha fazladır (% 1,06 > % 0,5).

Biberiye bitkisinin uçucu yağ bileşenleri GC-MS ile belirlenmiştir. Şekil 4.1'de verilen biberiye uçucu yağ GC-MS kromatogramı, cihazın içerisinde yer alan kütüphaneler ve cihaza tanıtılan standartlarla analiz edildi. Yapılan çalışmada tespit edilen bileşenlerin kromatogramları Şekil 4.2-4.11 arasında verilmiştir. Biberiye uçucu yağ numunesinin

içerdiği bileşenler, alıkonma zamanı (RT), CAS numarası, formülü, molekül ağırlığı, bileşen yüzdesi, cihazdan ve literatürden elde edilen alıkonma indeksi (RI) değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Tablo 4.2 incelendiğinde %52,64 1,8-sineol, %14,85 kafur, %9,4 borneol, %5,9 levoverbenon, %4,85 karyofilen, %4,57 o-simen ve p-simen, %3,04 β -pinen ve β -mirsen, %2,9 α -pinen, %1,2 2,4(10)-tujadien, %0,64 α -terpinolen ve α -terpinen tespit edilmiştir. Bileşiklerin deneysel ve literatür RI değerlerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Uçucu yağ numunesinde en fazla %52,64 1,8-sineol tespit edilmiştir. Literatür verileri incelendiğinde Yang ve arkadaşları (2011) uçucu yağın majör bileşeninin % 26,54 oranla 1,8-sineol olduğunu, ikinci bileşenin ise %26,54 α -pinen olduğunu rapor etmişlerdir [57]. Ayrıca Salido ve çalışma grubu (2003), kafur (%17,2-34), α -pinen (%10,2-21,6), 1,8-sineol (%12,1-14,4), kamfen (%5,2-8,6), borneol (%3,2-7,7), β -pinen (%2,3- 7,5), verbenon (%2,2-5,8), β -karyofililen (%1,8-5,1), limonen (%2-3,8), α -terpineol (%1,2-2,5), mirsen (%0,9-4,5), p-simen (%0,2-3,4), bornil asetat (%0,2-2,3), linalol (%0,3-1) ve terpinen-4-ol (%0,4-0,9) olarak analiz etmişlerdir [89]. Boutekedjiret ve arkadaşları (1999), buharlı distilasyonda sırasıyla % 52,4 1,8-sineol, %12,6 kafur, %2,1 α -terpineol bulunurken, Su buharı distilasyonunda sırasıyla %31,9 1,8-sineol, % 19,7 kafur, %12,18 α -terpineol bulunduğunu bildirmişlerdir [109]. Literatür verileri ile kıyaslandığında bu çalışmada elde edilen biberiye uçucu yağının %52,64 1,8-sineol içerdiği ve literatür verilerine göre 1,8-sineol içeriğinin maksimum %52,4 olduğu tespit edilmiştir. α -pinene bileşegi, bu çalışma kapsamında %2,9 oranla tespit edilmiş olup bazı literatür verilerine göre daha az (%26,54) ancak bazı literatür verilerine göre eş değerdir (%2,9). Kafur bileşegi, %14,85 oranla tespit edilmiş ve literatür verileri ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. p-cymene bileşeni literatüre göre %0,2-3,4 oranında tespit edilirken bu çalışmada daha yüksek oranda (%4,57) tespit edilmiştir. Borneol bileşeni literatüre göre %3,2-7,7 oranında rapor edilirken elde edilen uçucu yağda %9,4 oranında belirlenmiştir. %3,04 β -pinen bileşegi literatüre göre %2,3- 7,5 oranında rapor edilirken bu çalışmada %3,04 oranında belirlenmiştir. Son olarak bu çalışmada elde edilen uçucu yağın p-simen, β -pinen, borneol, 1,8-sineol bileşeni literatüre göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda α -pinen bileşenide literatüre göre daha düşük oranda tespit edilmiştir.

Yüksek lisans çalışmamızın ikinci bölümü elde ettiğimiz uçucu yağ ve sabit yağların biyolojik özelliklerinin incelenmesini içermektedir. Son zamanlarda bilim insanlarının yüksek ilgisini çeken konular arasında nükleik asitlerle etkileşime giren yeni moleküllerin araştırılması, kemoterapide DNA'ya bağlanabilen yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesi yer

almaktadır. Bu genetik ve kanser hastalıkları kendiliğinden ortaya çıkan mutasyonlardan kaynaklansa da dış kimyasal ve fiziksel etmenlerin, çevrenin etkisi oldukça büyüktür. Bu sebeple mutajenlerin etkilerini tersine çevirebilecek, hastalıkları önleyebilecek ve bu hastalıkları tedavi edebilecek yeni mutajenlerin sentezlenmesi için daha fazla önem arz etmektedir. Biberiye yağ bileşenleri de mükemmel inhibitörler ve aktivatörler oldukları birçok çalışmada rapor edilmiştir.

Elde edilen biberiye uçucu yağ ve sabit yağlarının DNA koruma aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. Biberiye sabit yağlarının ve uçucu yağlarının konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde dimetil sülfoksit çözeltileri hazırlanmıştır. Thermo Scientific pBR322, en yaygın kullanılan *E.coli* klonlama vektörlerinden biridir. Bu sebeple DNA materyeli, *E. coli*'den izole edilen Thermo Fisher, pBR322 DNA kullanılmıştır. *E. coli* DNA'sı ile yağ numunelerinin etkileşimleri, UV-VIS spektroskopisi ve agaroz jel elektroforezi ile karakterize edilmiştir. Sony marka jel yazıcısı kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada kontrol olarak 1 mg/ml kuarsetin çözeltisi kullanılmıştır.

Şekil 4.12 incelendiğinde 5 ve 7 kuyucuklarına fenton içermeyen plazmit DNA ve biberiye sabit yağ ve uçucu yağ materyelinden elde edilen çözeltiler ilave edilmiştir. Numunelerin, Plazmit DNA'yı parçalamaması oldukça önemlidir. Kuyucuklara sırasıyla biberiye uçucu yağı ve sabit yağı 1 mg/ml çözeltileri şeklinde uygulanmıştır. 5 ve 7 kuyucuklarından elde edilen jel görüntüsü incelendiğinde biberiye uçucu yağlarının ve sabit yağlarının varlığının DNA hasarına yol açmadığı tespit edilmiştir (tek bant; form II).

6 ve 8 kuyucuklarına da uçucu yağ ve sabit yağ materyellerinden hazırlanan çözeltiler ve DNA plazmitin yanı sıra DNA'yı parçalayan fenton çözeltisi ilave edilmiştir. Burada amaç yağ numunelerinin bu hasarı durdurması ya da engellemesidir. Sırasıyla kuyucuklara fenton, plazmit ile 1 mg/ml uçucu yağ ve sabit yağ şeklinde uygulanmıştır. 6 ve 8 kuyucuklarından elde edilen jel görüntüsünde; 6 no'lu kuyucukta iki bant gözlenmesi (form I ve form II) ve 8 no'lu kuyucukta üç bant gözlenmesi (form I, form II ve form III) ortamda bulunan uçucu ve sabit yağ numunelerine rağmen DNA hasarının oluştuğunu göstermektedir. Negatif kontrolde DNA hasarı gözlenmemiştir (kuyucuk 1). Fentonlu pozitif kontrolde de DNA hasarı tespit edilmiştir (kuyucuk 2). Kontrol amacıyla 3-4 kuyucuklarına uygulanan fentonsuz (kuyucuk 3) kuersetinin DNA hasarına yol açmadığı ve fentonlu (kuyucuk 4) kuersetinin de uçucu ve sabit yağ materyellerine benzer olarak DNA koruma sağlayamadığı tespit edilmiştir.

Şekil 4.12 incelendiğinde fentonlu kuyucuklarda iki ya da üç bant gözleendiği tespit edilmiştir. Oluşan bantlar yukarıdan aşağıya plazmit DNA' nın form I, form III ve form II biçimi gözlenmiştir. Form I plazmit DNA'sına ait süper sarmal biçimi, form II gevşek sarmal biçimi ve form III de doğrusal (lineer) biçimi göstermektedir. Plazmit DNA işlem öncesi form I biçimindedir. Fenton reaktifinin etkisiyle form I biçimindeki plazmit DNA'lardan bazıları hasar görerek form II ve form III biçimlerine dönüşmektedir.

Bu sonuçlar ışığında biberiye uçucu yağ ve sabit yağ materyallerinin varlığının biyolojik sistemlerde DNA hasarına yol açmadığı ve aynı zamanda da oluşan DNA hasarlarına karşı da koruyucu etki göstermediği, yani duyarsız olduğu tespit edilmiştir.

Bitki metabolitleri arasında karnosik asit ana aktif bileşik olarak kabul edilmektedir [110, 111, 112, 113]. Ancak biberiye özütü, antioksidan özelliklere sahip olduğuna inanılan birçok başka bitki metabolitini de içerir. Örneğin, karnosik asidin bozunma ürünlerinin (yani karnosol ve rosmanol) önemli antioksidan aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir [114]. Bu nedenle belirli bir biberiye ekstraktının antioksidan performansını yalnızca karnosik asit içeriğine dayanarak tahmin etmek doğru değildir. Ayrıca bitki ekstraktı birden fazla bileşen içerdiğinden, antioksidanlar arasındaki olası sinerjistik etkileşimi belirlemek için bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin bireysel saf antioksidanlarla karşılaştırılması önemlidir [115]. Bu sebeple bu çalışmada 4 farklı yöntemle antioksidan aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerde; DPPH yöntemi, toplam flavonoid, Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve toplam fenolik madde tespit edilmiştir.

Biberiyeden elde edilen sabit ve uçucu yağların DPPH• radikalini süpürme etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Şekil 4.4 te verilen askorbik asit ve troloks referans standart materyalleri kullanılarak standart kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Biberiyeden elde edilen sabit ve uçucu yağların DPPH• radikalini süpürme etkisi bu sebeple askorbik asit ve troloks eşdeğeri olarak verilmiştir. Tablo 4.3 incelendiğinde sabit yağ numunesinde DPPH• radikalini süpürme etkisi, troloks eşdeğeri askorbik asit eşdeğerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (0,0742 µg troloks eşdeğeri/µl > 0,0404 µg/µl askorbik asit). Sabit yağların DPPH• radikalini süpürme etkisi uçucu yağlardan yaklaşık 4 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Uçucu yağların DPPH• radikalini süpürme etkisi 0,0185 µg/µl askorbik asit eşdeğeri, 0,0404 µg/µl troloks eşdeğeri olarak belirlenmiştir.

Sabit yağ ve uçucu yağların toplam flavonoid içeriği Gülçin vd. tarafından önerilen yöntemin modifiye edilerek kullanılmıştır [116]. Herbir yağ numunesinin toplam flavonoid içeriği μg kuersetin eşdeğeri/ μl olarak verilmiştir. Bu amaçla kuersetin standart maddesi kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş (Şekil 4.5), sabit yağlarda 0,0964 μg kuersetin eşdeğeri/ μl olarak tespit edilirken uçucu yağlarda flavonoid tespit edilememiştir (Tablo 4.4).

Biberiye bitkisinden elde edilen hegzan ekstresi (sabit yağ) ve uçucu yağ numunelerinin Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) tayini gerçekleştirilmiştir. CUPRAC yöntemi olarak bilinen bu yöntemde askorbik asit ve troloks standart referans maddeleri kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır (Şekil 4.6) [12]. Sabit yağ numunesinin Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi 0,3516 μg askorbik asit eşdeğeri/ μl ve 0,0004 μg troloks eşdeğeri/ μl olarak tespit edilmiştir. Uçucu yağda 0,0167 μg askorbik asit eşdeğeri/ μL Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi tespit edilirken troloks eşdeğeri tespit edilememiştir. Sabit yağda askorbik asit eşdeğerinin troloks eşdeğerinden çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Toplam fenolik madde analizi bitki ekstreleri gibi biyolojik öneme sahip materyallerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Biberiye bitkisi sabit ve uçucu yağlarının toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir. Şekil 4.7’de verilen gallik asit standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak Tablo 4.6’da verilen toplam fenolik madde miktarları tespit edilmiştir. Sabit yağlarda 0,0201 μg gallik asit eşdeğeri/ μl ve uçucu yağlarda 0,0003 μg gallik asit eşdeğeri/ μl toplam fenolik madde tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre sabit yağlarda daha fazla antioksidan madde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca maksimum antioksidan kapasiteler, sabit yağlarda Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite, 0,3516 μg askorbik asit eşdeğeri/ μl ve uçucu yağlarda DPPH• radikalini süpürme etkisi 0,0227 μg troloks eşdeğeri/ μl olarak tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. H.Çon, A.Ayar ve H. Y. Gökalp, “Bazı Baharat Uçucu Yağlarının Çeşitli Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Etkisi”, *The Journal of Food*, cilt 23, no. 3, 1988.
- [2] N.Vukovic, T.Milosevic, S.Sukdolak ve S.Solujic, “Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 17-20, 2007.
- [3] O. Y. Celiktas, E. H. Kocabas ve E. Bedir, “Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations”, *Food Chemistry*, cilt 100, no. 2, pp. 553-559, 2007.
- [4] M.Adams, F. Gmünder ve M.Hamburger, “Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature”, *Journal of Ethnopharmacology*, cilt 113, no. 3, pp. 363-381, 2007.
- [5] R. Dias, L. Bernardino ve J. Meneses, “Emerging potential of natural products as an alternative strategy to pharmacological agents used against metabolic disorders”, *Current Drug Metabolism*, cilt 17, no. 6, pp. 582-597, 2016.
- [6] G. Machado, E. Bettio, P. Cunha ve C. Capra, “Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system”, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, cilt 33, no. 4, pp. 642-650, 2019.
- [7] G.Altinier, S. Sosa, P. Aquino, T. Mencherini ve A. D. Loggia, “Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L.”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, cilt 55, no. 5, p. 1718–1723, 2007.
- [8] T.Askun, G.Tumen, F.Satil ve M.Ates, “In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria”, *Food Chemistry*, cilt 116, no. 1, pp. 289-294, 2009.
- [9] B.Shan, Y.Cai, D. Brooks ve H.Corke, “The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts”, *International Journal of Food Microbiology*, cilt 117, no. 1, pp. 112-119, 2007.
- [10] S. Weckesser, K. Engel, B. Simon-Haarhaus, A. Wittmer, K. Pelz ve C. Schempp, “Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance”, *Phytomedicine*, cilt 7–8, no. 14, pp. 508-516, 2007.
- [11] S. Posadas, V. Caz, C. Largo, B. D. I. Gándara, B. Matallanas, G. Reglero ve E. D. Miguel, “Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats”, *Experimental Gerontology*, cilt 44, no. 6–7, pp. 383-389, 2009.

- [12] M.Suhaj, "Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review", *Journal of Food Composition and Analysis*, cilt 19, no. 6–7, pp. 531-537, 2006.
- [13] B.Bozın, N.Mımıca-Dukıç ve I. v. E.Jovın, "Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, cilt 55, p. 7879–7885, 2007.
- [14] A.Hussain, F.Anwar ve A.Jabbar, "Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial", *Brazilian Journal of Microbiology*, cilt 41, no. 4, pp. 1070-1078, 2010.
- [15] Z.Stojanović, R. Quirantes-Piné ve D. Arráez-Román, "Rosmarinus Officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds", *International Journal of Molecular Sciences*, cilt 15, no. 11, pp. 20585-20606, 2014.
- [16] B.Teixeira, A.Marques, C. Ramos ve R. Neng, "Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils", *Industrial Crops and Products*, cilt 43, pp. 587-595, 2013.
- [17] H.Malayođlu, "Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) Antioksidan Etkisi", cilt 51, no. 2, pp. 59-67, 2010.
- [18] M. J. Jordán, V. Lax ve M. Rota, "Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract", *Industrial Crops and Products*, cilt 48, pp. 144-152, 2013.
- [19] A.Timor, "World production oil rose and rose oil", *Nature Sciences*, cilt 6, no. 2, pp. 93 - 110, 2011.
- [20] M.Kırpık ve M.Özgüven, "Farklı kökenli *Rosmarinus officinalis* L.(Biberiye) bitkilerinin verim ve uçucu yağları üzerinde araştırmalar", *Adyütayam*, cilt 6, no. 2, pp. 46-54, 2018.
- [21] N.Katar, D. Katar, R. Temel ve S. .Karakurt, "The effect of different harvest dates on the yield and quality properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plant", *Biological Diversity and Conservation*, cilt 12, no. 3, pp. 7-13, 2019.
- [22] M.Al-Sereiti ve P. K.Abu-Amer, "Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials.", *Indian journal of experimental biology*, cilt 37, no. 2, pp. 124-130., 1999.
- [23] A.Ojeda-Sana, C. v. Baren, M.Elechosa, M. Juárez ve S. Moreno, "New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components", *Food Control*, cilt 33, no. 11, pp. 189-195, 2013.
- [24] P. Bradley, "British herbal compendium", %1 içinde *a handbook of scientific information of widely used plant drugs.*, cilt 2, 2006.

- [25] S.Burt, “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review”, *International Journal of Food Microbiology*, cilt 94, no. 3, pp. 223-253, 2004.
- [26] R. Jamshidi, Z. Afzali ve D. Afzali, “Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries”, *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, cilt 5, no. 1, pp. 78-81, 2009.
- [27] Y.Zaouali, T. Bouzaine ve M. Boussaid, “Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities”, *Food and chemical toxicology*, cilt 48, no. 11, pp. 3144-3152, 2010.
- [28] G. Nieto, G. Ros ve J. Castillo, “Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.)”, *Medicines*, cilt 5, no. 3, p. 98, 2018.
- [29] I. Bajalan, R. Rouzbahani, A.Pirbalouti ve F.Maggi, “Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*”, *Industrial Crops and Products*, cilt 107, pp. 305-311, 2017.
- [30] G. Altinier, S. Sosa, R. Aquino, T. Mencherini, R. Loggia ve A. Tubaro, “Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L.”, *Journal of agricultural and food chemistry*, cilt 55, no. 5, pp. 1718-1723, 2007.
- [31] Y.Guo, J. Xie, X. Li, Y. Yuan, L. Zhang, W. Hu, H. Luo, H. Yu ve R. Zhang, “Antidepressant effects of rosemary extracts associate with anti-inflammatory effect and rebalance of gut microbiota”, *Frontiers in pharmacology*, cilt 9, p. 1126, 2018.
- [32] S. Lampon, M. B. E. Miraldi, G. Bains ve M. Biagi, “Chemical Profile, Antioxidant, Anti-Proliferative, Anticoagulant and Mutagenic Effects of a Hydroalcoholic Extract of Tuscan *Rosmarinus officinalis*”, *plants*, cilt 10, no. 1, p. 97, 2021.
- [33] R. Kaur, T. Gupta, J. Bronlund ve L. Kaur, “The potential of rosemary as a functional ingredient for meat products-a review”, *Food Reviews International*, cilt 39, no. 4, pp. 2212-2232, 2023.
- [34] S. Moreno, T. Scheyer, C.Romano ve A. Vojnov, “Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition”, *Free radical research*, cilt 40, no. 2, pp. 223-231, 2006.
- [35] A. Oreopoulou ve E. Papavassilopoulou, “Antioxidant recovery from hydrodistillation residues of selected Lamiaceae species by alkaline extraction”, *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, cilt 8, pp. 83-89, 2018.
- [36] E. Napoli, L. Siracusa, A. Saija, A. Speciale ve D. Trombetta, “Wild Sicilian rosemary: phytochemical and morphological screening and antioxidant activity evaluation of extracts and essential oils”, *Chemistry & Biodiversity*, cilt 12, no. 7, pp.

1075-1094, 2015.

- [37] A. Angioni, A. Barra, E. Cereti ve D. Barile, “Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L.”, *Journal of agricultural and food chemistry*, cilt 52, no. 11, pp. 3530-3535, 2004.
- [38] M. Al-Sereiti, K. Abu-Amer ve P. Sen, “Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials.”, *Indian journal of experimental biology*, cilt 37, no. 2, pp. 124-130, 1999.
- [39] S. Ozdikmenli ve N. Zorba, “Uçucu yağların *Staphylococcus aureus* üzerine etkisi”, *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, cilt 2, no. 5, pp. 228-235, 2014.
- [40] A. Kılıç, “Uçucu yağ elde etme yöntemleri”, *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, cilt 10, no. 13, pp. 37-45, 2008.
- [41] E. Evergetis ve S. Haroutounian, “Exploitation of apiaceae family plants as valuable renewable source of essential oils containing crops for the production of fine chemicals”, *Industrial Crops and Products*, cilt 54, pp. 70-77, 2014.
- [42] H.Madsen, B. Nielsen, G. Bertelsen ve L. Skibsted, “Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption”, *Food Chemistry*, cilt 57, no. 2, pp. 331-337, 1996.
- [43] R. Berger, U. Krings ve H. Zorn, “Biotechnological flavour generation”, *Food flavour technology*, pp. 89-126, 2010.
- [44] K. Bauer, D. Garbe ve H. Surburg, Bauer, Kurt, Dorothea Garbe, and Horst Surburg. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. John Wiley & Sons, 2008.
- [45] G. Cervato, M. Carabelli, S. Gervasi, A. C. R. Cazzola ve B. Cestaro, “Antioxidant properties of oregano (*origanum vulgare*) leaf extracts”, *Journal of Food Biochemistry*, cilt 24, no. 6, pp. 453-465, 2000.
- [46] K. Lee, Y. Kim, D. Kim, H. Lee ve C. Lee, “Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity”, *Journal of agricultural and food chemistry*, cilt 51, no. 22, pp. 6516-6520, 2003.
- [47] V. Bowry ve K. Ingold, “The unexpected role of vitamin E (α -tocopherol) in the peroxidation of human low-density lipoprotein”, *Accounts of Chemical Research*, cilt 32, no. 1, pp. 27-34, 1999.
- [48] M. Foti ve K. Ingold, “Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by γ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant”, *Journal of agricultural and food chemistry*, cilt 51, no. 9, pp. 2758-2765, 2003.

- [49] R. Bruni, A. Medici, E. Andreotti ve C. Fantin, “Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae) flower”, *Food chemistry*, cilt 85, no. 3, pp. 415-421, 2004.
- [50] A. El-Ghorab, A. Mansour ve K. El-massry, “Effect of extraction methods on the chemical composition and antioxidant activity of Egyptian marjoram (*Majorana hortensis* Moench)”, *Flavour and Fragrance Journal*, cilt 19, no. 1, pp. 54-61, 2004.
- [51] C. Menut, J. Bessiere ve D. Samate, “Aromatic Plants of Tropical West Africa. XI. Chemical Composition, Antioxidant and Antiradical Properties of the Essential Oils of Three *Cymbopogon* Species from Burkina Faso”, *Journal of Essential Oil Research*, cilt 12, no. 2, pp. 207-212, 2000.
- [52] A. Kadri, Z. Zarai, I. Chobba, A. Békir ve N. Gharsallah, “Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia”, *J. Med. Plants Res*, cilt 5, no. 29, pp. 6502-6508, 22 nisan 2011.
- [53] M.Baratta, H. Dorman ve S. Deans, “Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils”, *Journal of Essential Oil Research*, cilt 10, no. 6, pp. 618-627, 1998.
- [54] J. Ivanovic, D. Misic, I. Zizovic ve M. Ristic, “In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates”, *Food Control*, cilt 25, no. 1, pp. 110-116, 2012.
- [55] S.Ngo, D. Williams ve R. Head, “Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives”, *Critical reviews in food science and nutrition*, cilt 51, no. 10, pp. 946-954, 2011.
- [56] F. Ayanoglu, Ş. Başkaya ve N. Bahadrlı, “Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin uçucu yağ oranı, uçucu yağ bileşenleri ve antioksidan içeriğinde morfolojik ve ontogenetik varyabilite”, *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, cilt 21, no. 1, 2016.
- [57] H.Yang, E.Lee, S. Moon ve D. H. Paik, “Addition of garlic or onion before irradiation on lipid oxidation, volatiles and sensory characteristics of cooked ground beef”, *Meat Science*, cilt 88, no. 2, pp. 286-291, 2011.
- [58] S. Salido, J. Altarejos ve M. Nogueras, “Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from southern Spain”, *Journal of Essential Oil Research*, cilt 15, no. 1, pp. 10-14, 2003.
- [59] L.Conde-Hernández, J.Espinosa-Victoria ve A. Trejo, “CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*)”, *Journal of food engineering*, cilt 200, pp. 81-86, 2017.
- [60] C. Boutekdjiret, R. Belabbes, F. Bentahar ve J. Bessiere, “Study of *Rosmarinus*

- officinalis L. Essential Oil Yield and Composition as a Function of the Plant Life Cycle”, *Journal of Essential Oil Research*, cilt 11, no. 2, pp. 238-240, 1999.
- [61] A.Bayrak ve A. Akgül, “Biberiye bitkisinin uçucu yağ kompozisyonu üzerinde araştırma”, *Gıda Sanayi Dergisi*, cilt 5, pp. 20-22, 1989.
- [62] N. Nakatani ve R. Inatani, “Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)”, *Agricultural and Biological Chemistry*, cilt 45, no. 10, pp. 2385-2386, 1981.
- [63] N.Yanishlieva, E. Marinova ve J. Pokorný, “Natural antioxidants from herbs and spices”, *European Journal of lipid science and Technology*, cilt 108, no. 9, pp. 776-793, 2006.
- [64] D. Slameňová, E. Horváthová, Z. Kováčiková ve K. Kozics, “Essential rosemary oil protects testicular cells against DNA-damaging effects of H₂O₂ and DMNQ”, *Food chemistry*, cilt 129, no. 1, pp. 64-70, 2011.
- [65] J.Sotelo-Félix, D.Martinez-Fong, P.Muriel, R. Santillán, D. Castillo ve P. Yahuaca, “Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat”, *Journal of ethnopharmacology*, cilt 81, no. 2, pp. 145-154, 2002.
- [66] R.Gutiérrez, J.Alvarado ve M. Presno, “Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced liver cirrhosis”, *Phytotherapy Research*, cilt 24, no. 4, pp. 595-601, 2010.
- [67] C.Bicchi, A.Binello ve P. Rubiolo, “Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis”, *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, cilt 11, no. 4, pp. 236-242, 2000.
- [68] E.Decker, K. Warner, M. Richards ve F. Shahidi, “Measuring antioxidant effectiveness in food”, *Journal of agricultural and food chemistry*, cilt 53, no. 10, pp. 24303-4310, 2005.
- [69] A.Corsini ve M. Bortolini, “Drug-induced liver injury: The role of drug metabolism and transport”, *The journal of clinical pharmacology*, cilt 53, no. 5, pp. 463-474, 2013.
- [70] A. Zhang, H. Sun ve X. Wang, “Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases”, *European journal of medicinal chemistry*, cilt 63, pp. 570-577, 2013.
- [71] A.Ismail, Z. Marjan ve C. Foong, “Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables”, *Food chemistry*, cilt 87, no. 4, pp. 581-586, 2004.
- [72] H.Madsen ve G.Bertelsen, “Spices as antioxidants”, *Trends in food science & technology*, cilt 6, no. 8, pp. 271-277, 1995.

- [73] J.Luis ve C.Johnson, "Seasonal variations of rosmarinic and carnosic acids in rosemary extracts. Analysis of their in vitro antiradical activity", *panish Journal of Agricultural Research*, cilt 3, no. 1, pp. 106-112, 2005.
- [74] N.Ito, S. Fukushima ve H.Tsuda, "Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT, and other antioxidants", *CRC Critical reviews in Toxicology*, cilt 15, no. 2, pp. 109-150, 1985.
- [75] W.Brand-Williams, M.Cuvelier ve C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *LWT-Food science and Technology*, cilt 28, no. 1, pp. 25-30, 1995.
- [76] R.Prior, X.Wu ve K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements", *Journal of agricultural and food chemistry*, cilt 53, no. 10, pp. 4290-4302, 2005.
- [77] S.Kedare ve R. Singh, "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay", *Journal of food science and technology*, cilt 48, pp. 412-422, 2011.
- [78] A.Wollinger, J.Chahboun, V.Jeannot ve W.Kunz, "Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays", *Comptes Rendus Chimie*, cilt 19, no. 6, pp. 754-765, 2016.
- [79] J. Nordberg ve E. Arnér, "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system", *Free radical biology and medicine*, cilt 31, no. 11, pp. 1287-1312, 2001.
- [80] C.Powell, J. Swenberg ve I. Rusyn, "Expression of base excision DNA repair genes as a biomarker of oxidative DNA damage", *Cancer letters*, cilt 229, no. 1, pp. 1-11, 2005.
- [81] T.Hazra, A.Das, S.Das ve S. Choudhury, "Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective", *DNA Repair*, cilt 6, no. 4, pp. 470-480, 2007.
- [82] S.Bjelland ve E.Seeberg, "Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, cilt 531, no. 1-2, pp. 37-80, 2003.
- [83] M.Petersen ve M.Simmonds, "Rosmarinic acid", *Phytochemistry*, cilt 62, no. 2, pp. 121-125, 2003.
- [84] S.Gélinas ve M.Martinoli, "Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells", *Journal of Neuroscience Research*, cilt 70, no. 1, pp. 90-96, 2002.
- [85] M.Noroozi, W.Angerson ve M. Lean, "Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes", *The American journal of clinical nutrition*, cilt 67, no. 6, pp. 1210-1218, 1998.

- [86] R.Piga, Y.Saito, Z.Chen, Y.Yoshida ve E. Niki, "Characterization of monochloramine toxicity on PC12 cells and protective effect of tocopherol via antioxidative function", *Archives of biochemistry and biophysics*, cilt 436, no. 1, pp. 101-109, 2005.
- [87] "Termofisher Scientific".(17 Mayıs 2024).[Online] Erişim adresi: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home.html>.
- [88] P. H. Davis, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands.*, Edinburgh University Press, 1970.
- [89] S.Yardan, "Asetoguanamin taç eterlerin mikrodalga yöntemiyle sentezi ve karakterizasyonu", *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.*, 2023.
- [90] I.Tegin, E.Yabalak, B.Sadik ve M.Fidan, "Evaluation of chemical content and radical scavenging activity of *Allium Vineale* L. extract and its elemental analysis", *Rev. Roum. Chim*, cilt 64, no. 8, pp. 673-679, 2019.
- [91] S.Lussignoli, M.Fracaroli ve G.Andrioli, "A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma", *Analytical Biochemistry*, cilt 269, no. 1, pp. 38-44, 1999.
- [92] S.Albayrak, A.Aksoy, O.Sagdic ve E.Hamzaoglu, "Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey", *Food chemistry*, cilt 119, no. 1, pp. 114-122, 2010.
- [93] O.Tolga, H.Varlıbaş, M.Öz ve İ.Deniz, "Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler", *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, cilt 13, no. 1, pp. 48-59, 2013.
- [94] İ.Gülçin, E.Kireççi ve E.Akkemik, "Antioxidant and antimicrobial activities of an aquatic plant: Duckweed (*Lemna minor* L.)", *Turkish Journal of Biology*, cilt 34, no. 2, pp. 175-188, 2010.
- [95] M.Özyürek, K.Güçlü ve R.Apak, "The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, cilt 30, no. 4, pp. 652-664, 2011.
- [96] R.Apak, K.Güçlü, M.Özyürek ve S. Karademir, "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*, cilt 52, no. 26, pp. 7970-7981, 2004.
- [97] K.Umano, Y.Hagi, T.Tamura, A.Shoji ve T.Shibamoto, "Identification of volatile compounds isolated from round kumquat (*Fortunella japonica* Swingle)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, cilt 42, no. 9, pp. 1888-1890, 1994.
- [98] D.Wedge, J. Klun, N.Tabanca, B.Demirci, T.Ozek, K.Baser, Z.Liu ve S.Zhang,

- “Bioactivity-Guided Fractionation and GC/MS Fingerprinting of *Angelica sinensis* and *Angelica archangelica* Root Components for Antifungal and Mosquito Deterrent Activity”, *Journal of agricultural and food chemistry*, cilt 57, no. 2, pp. 464-470, 2009.
- [99] K.Tatsuka, S.Suekane, Y.Sakai ve H.Sumitani, “Volatile constituents of kiwi fruit flowers: simultaneous distillation and extraction versus headspace sampling”, *journal of Agricultural and Food Chemistry*, cilt 38, no. 12, pp. 2176-2180, 1990.
- [100] J.Smadja, P.Rondeau ve A.Sing, “Volatile constituents of five Citrus Petitgrain essential oils from Reunion”, *Flavour and fragrance journal*, cilt 20, no. 4, pp. 399-402, 2005.
- [101] T.Feng, J.Cui, Z.Xiao, H.Tian, F.Yi ve X. Ma, “Chemical composition of essential oil from the peel of Chinese *Torreya grandis* Fort”, *Organic Chemistry International*, cilt 2011, 2011.
- [102] A.Gauvin, H.Ravaomanarivo ve J.Smadja, “Comparative analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oils from bark and leaves of *Cedrelopsis grevei* Baill, an aromatic and medicinal plant from Madagascar”, *Journal of chromatography a*, cilt 1029, no. 1-2, pp. 279-282, 2004.
- [103] K.Umano ve T.Shibamoto, “A new method of headspace sampling: grapefruit volatiles”, *grapefruit volatiles*, pp. 981-998, 22 şubat 1991.
- [104] A.Muselli, P.Rossi, J.Desjobert, A.Bernardini, L.Berti ve J.Costa, “Chemical composition and antibacterial activity of *Otanthus maritimus* (L.) Hoffmanns. & Link essential oils from Corsica”, *Flavour and fragrance journal*, cilt 27, no. 3, pp. 217-223, 2007.
- [105] H.Noorizadeh ve A.Farmany, “Exploration of linear and nonlinear modeling techniques to predict of retention index of essential oils”, *Journal of the Chinese Chemical Society*, cilt 57, no. 6, pp. 1268-1277, 2010.
- [106] O.Yesil-Celiktas, G.Girgin, H.Orhan, H.Wichers, E.Bedir ve F.Vardar-Sukan, “Screening of free radical scavenging capacity and antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts with focus on location and harvesting times”, *European Food Research and Technology*, cilt 224, pp. 443-451, 2007.
- [107] M.A.Delgado, C. García-Rico ve J. Franco, “The use of rosemary extracts in vegetable oil-based lubricants”, *Industrial Crops and Products*, cilt 62, pp. 474-480, 2014.
- [108] Ş.Başkaya, F.Ayanoğlu ve N.P.Bahadırılı, “Morfojenetik ve ontogenetik varyabiliti on rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil ratio, essential oil components and antioxidant capacity.”, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, cilt 21, no. 1, pp. 12-20, 2016.
- [109] C.Boutekedjiret, R.Belabbes, F.Bentahar ve JM.Bessiere, “Study of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Yield and Composition as a Function of the Plant Life

Cycle”, *Journal of Essential Oil Research* , cilt 11, no. 2, pp. 238-240, 1999.

- [110] EN.Frankel, SW.Huang, R.Aeschbach ve E. Prior, “Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, cilt 44, no. 1, p. 131–135, 1996.
- [111] S.Munné-Bosch ve L.Alegre, “Subcellular Compartmentation of the Diterpene Carnosic Acid and Its Derivatives in the Leaves of Rosemary”, *Plant Physiology*, cilt 125, no. 2, p. 1094–1102, 2001.
- [112] N.Okamura, Y.Fujimoto, S.Kuwabara ve A.Yagi, “High-performance liquid chromatographic determination of carnosic acid and carnosol in *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*”, *Journal of Chromatography A*, cilt 679, no. 2, pp. 381-386, 1994.
- [113] MA.Thorsen ve KS.Hildebrandt, “Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification”, *Journal of Chromatography A*, cilt 995, no. 1-2, pp. 119-125, 2003.
- [114] J.Irwandi, Y. C. Man, D. Kitts ve J. B. S. Jinap, “Synergies between plant antioxidant blends in preventing peroxidation reactions in model and food oil systems”, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, cilt 77, p. 945–951, 2000.
- [115] N. Erkan, G. Ayranci ve E. Ayranci, “Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol”, *Food Chemistry*, cilt 110, no. 1, pp. 76-82, 2008.
- [116] İ. Gülçin, E. Kireççi ve E. Akkemik, “Antioxidant and Antimicrobial Activities of an Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L.)”, *Turkish Journal of Biology*, cilt 34, no. 2, pp. 175-188, 2010.