

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Erysimum kotschyanum 'un AĞIR METAL İÇERİĞİ İLE
EKSTRAKTLARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE KILINÇARSLAN

DENİZLİ, HAZİRAN 2016

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ



Erysimum kotschyanum' un AĞIR METAL İÇERİĞİ İLE
EKSTRAKTLARININ BAZI BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE KILINÇARSLAN

DENİZLİ, HAZİRAN 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

ÖZGE KILINÇARSLAN tarafından hazırlanan “**ERYSIMUM KOTSCHYANUM** ‘un **AĞIR METAL İÇERİĞİ İLE EKSTRAKTLARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 28.06.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **BİYOLOJİ ANABİLİM DALIYÜKSEKLİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

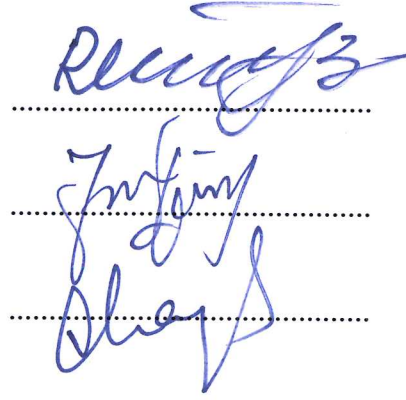
Prof.Dr.Ramazan MAMMADOV

Üye

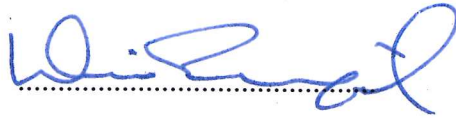
Prof.Dr.Mustafa YILDIZ

Üye

Prof.Dr.Olcay DÜŞEN



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
03.08.2016 tarih ve 2.8/16..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof.Dr. Mehmet Ali SARIGÖL

MÜDÜR

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Koordinasyonu tarafından 2015FBE004 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

ÖZGE KILIŇARSLAN



ÖZET

***Erysimum kotschyanum*’ un AĞIR METAL İÇERİĞİ İLE
EKSTRAKTLARININ BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÖZGE KILINÇARSLAN
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. RAMAZAN MAMMADOV)

DENİZLİ, HAZİRAN 2016

Bu çalışmada Denizli Honaz Dağı’ ndan toplanan ve ülkemizin endemik bitkilerinden olan *Erysimum kotschyanum* ‘ un ağır metal içeriği ile ekstraktlarının bazı biyolojik aktivitelerinin araştırılması, bitki ekstraktlarından yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK-HPLC) ile fenolik asit içerikleri araştırılmıştır. Bitki ve toprak örneklerinin CNS analizi ve ağır metal içerikleri belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının toplam antioksidan aktivitesi (%80.47±1.83), DPPH (%89.39±0.61) ve ABTS (%96.20±0.12) serbest radikali giderim aktivitesi, demir indirgeme gücü kapasitesi (0.01701±0.001), toplam fenolik (4.883±0.47) ve flavonoid madde miktarları (93.322±1.57) ve YPSK yöntemiyle etanol ekstraktının 9 fenolik bileşenin içerikleri tespit edilmiştir. Ayrıca disk difüzyon yöntemiyle ekstraktların antibakteriyel aktivitesi ve etanol ve su ekstraktlarının sitotoksik aktivitesi Brine Shrimp testi ile araştırılmıştır, en etkili antibakteriyel etki etanol ekstraktlarında *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine (11±1 zon çapı) karşı tespit edilirken, en yüksek sitotoksik etki su ekstraktlarında (LC₅₀: 315.48) gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre *E. kotschyanum* ’un potansiyel bir antioksidan kaynağı olarak düşünülebileceğini ve 13.05 C/N oranına bakılarak bitkinin N içeren sekonder metabolitleri içerebileceğini göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Erysimum kotschyanum*, Ağır metal, Antioksidan aktivite, HPLC

ABSTRACT

INVESTIGATION OF HEAVY METAL CONTENTS AND SOME BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Erysimum kotschyanum*

MSC THESIS

OZGE KILINCARSLAN

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. RAMAZAN MAMMADOV)

DENİZLİ, JULY

In this study, some biological activities and phenolic contents of various solvent extracts (ethanol, acetone and dH₂O) *Erysimum kotschyanum* Gay. extracts that one of the endemic plants and occurrence in Denizli/ Honaz Mountain, and heavy metals content, CNS analysis of plant and soil samples of *E. kotschyanum* were determined. Antioxidant activity (%80.47±1.83), and DPPH (%89.39±0.61) and ABTS (%96.20±0.12) scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (0.01701±0.001), total phenolic (4.883±0.47), flavonoid content and phenolic acid contents (93.322±1.57) and 9 different phenolic compounds in ethanol extracts was found. Also, ethanol extract's antimicrobial activity (11±1 zone diameter) and cytotoxic activity (Brine Shrimp LC₅₀: 315.48) of extracts was calculated. According the results, the extract of *E. kotschyanum* may be considered as a potential source of biological agents and 13.05 C/N ratio of extracts may be indicated that plant contain the N containing secondary metabolites.

KEYWORDS: *Erysimum kotschyanum*, Heavy metal, Antioxidant activity, HPLC

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
SEMBOL LİSTESİ.....	xii
ÖNSÖZ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Brassicaceae Familyası ve <i>Erysimum</i> Cinsi.....	7
1.1.1 <i>Erysimum kotschyanum</i> Gay.....	9
1.2 Sekonder Metabolitler.....	10
1.3 Serbest Radikaller.....	12
1.4 Antioksidanlar.....	15
1.4.1 Fenolik Bileşenler.....	17
1.4.1.1 Fenolik Asitler.....	18
1.4.2 Flavonoidler.....	19
1.5 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	21
1.5.1 β -Karoten/ Linoleik Asit Yöntemi.....	22
1.5.2 DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi.....	23
1.5.3 Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi.....	24
1.5.4 ABTS Antioksidan Kapasite Yöntemi.....	24
1.6 Sekonder Metabolit Miktar Tayini.....	25
1.6.1 Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi.....	25
1.6.2 Toplam Flavonoid Miktarı.....	25
1.7 Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları.....	26
2. MATERYAL ve YÖNTEM	29
2.1 MATERYAL.....	29
2.1.1 Bitki (<i>E. kotschyanum</i> Gay.) ve Toprak Materyalleri.....	29
2.2 YÖNTEM.....	31
2.2.1 Toprak ve Bitki Örneklerinin Analizi.....	31
2.2.1.1 pH Tayini.....	31
2.2.1.2 Tuzluluk Tayini.....	32
2.2.1.3 Kireç Tayini.....	32
2.2.1.4 Karbon, Nitrojen ve Sülfür (CNS) Tayini.....	33
2.2.1.5 Bitki ve Toprak Örneklerinin Ağır Metal Analizi.....	33
2.2.2 Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması.....	34
2.2.3 Biyolojik Aktivitelerin Belirlenmesi.....	35
2.2.3.1 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	35
2.2.3.1.1 β -Karoten/ Linoleik Asit Yöntemi.....	35
2.2.3.1.2 DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi.....	36
2.2.3.1.3 Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi.....	37
2.2.3.1.4 ABTS Serbest Radikal Giderim Aktivite Yöntemi.....	37

2.2.3.2	Sekonder Metabolit Miktar Tayini	37
2.2.3.2.1	Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Miktarı 37	
2.2.3.2.2	Toplam Flavonoid Madde Miktarı	38
2.2.3.3	Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi	38
2.2.4	Brine- Shrimp Yöntemi ile Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi ..	39
2.2.5	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi	39
3.	BULGULAR.....	41
3.1	Toprak Analizi.....	41
3.2	CNS Tayinine Ait Sonuçlar.....	41
3.3	Bitki ve Toprak Örneklerinin Ağır Metal Analizine Ait Sonuçlar	43
3.4	Antioksidan Aktivite Yöntemlerine Ait Sonuçlar	44
3.4.1	β -Karoten/ Linoleik Asit Yönteminin Sonuçları.....	44
3.4.2	DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesine Ait Sonuçları.....	45
3.4.3	FRAP İndirgeme Gücü Kapasitesine Ait Sonuçlar	46
3.4.4	ABTS Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları	48
3.5	Sekonder Metabolit Miktar Tayini Sonuçları.....	49
3.5.1	Folin- ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları.....	49
3.5.2	Total Flavonoid Miktarı Sonuçları.....	50
3.6	Antibakteriyel Aktivite Sonuçları.....	51
3.7	Brine Shrimp Sitotoksik Aktivite Yöntemi	52
3.8	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi	52
4.	SONUÇ ve ÖNERİLER	59
5.	KAYNAKLAR	65
6.	ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: Bitki materyali <i>Erysimum kotschyanum</i> Gay.	10
Şekil 2: Sekonder metabolitlerin başlıca biyosentez yolları (Taiz ve Zeiger 2010)	12
Şekil 3: Antioksidanların sınıflandırılması (Wootton 2011' den uyarlanmıştır.)	17
Şekil 4: Fenolik asitlerin kimyasal yapısı (Jackson 2000, Fraga 2010).....	19
Şekil 5: Flavonoidlerin sınıflandırılması (Çıkrıkçı 2005).....	20
Şekil 6: DPPH' in antioksidan madde ile reaksiyonu	23
Şekil 7: ABTS' nin kimyasal reaksiyonu (Pannala ve diğ. 2001).....	25
Şekil 8: Bitki materyali <i>Erysimum kotschyanum</i> Gay.	30
Şekil 9: Toprak materyali (Honaz Dağı)	30
Şekil 10: Toprak örneğinin pH analizi	31
Şekil 11: Toprak örneğinin tuz analizi	32
Şekil 12: Kalsimetre ile toprakların kireç analizi	33
Şekil 13: Bitkilerin ekstraksiyon aşamaları.....	35
Şekil 14: Yaprak örneklerinin CNS diyagramı	42
Şekil 15: Toprak örneğinin CNS diyagramı	43
Şekil 16: <i>Erysimum kotschyanum</i> ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri (%)	45
Şekil 17: <i>Erysimum kotschyanum</i> ekstraktlarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesi	46
Şekil 18: Bitki ekstraktlarının konsantrasyonlara göre absorpsiyon değerleri	47
Şekil 19: Bitki ekstraktlarının ABTS serbest radikali giderim aktiviteleri ...	49
Şekil 20: Bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşen miktarları	50
Şekil 21: Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları	51
Şekil 22: YPSK'da bitkinin etanol ekstraktları için kullanılan standart kromatogramı	53
Şekil 23: Bitkinin etanol ekstraktlarının YPSK kromatogramı	54
Şekil 24: Gallik asit kalibrasyon grafiği	54
Şekil 25: 3,4-dihidroksibenzoik asit kalibrasyon grafiği	55
Şekil 26: 4-hidroksibenzoik asit kalibrasyon grafiği	55
Şekil 27: Klorojenik asit kalibrasyon grafiği	56
Şekil 28: Vanilik asit kalibrasyon grafiği.....	56
Şekil 29: Kafeik asit kalibrasyon grafiği.....	57
Şekil 30: p-kumarik asit kalibrasyon grafiği	57
Şekil 31: Ferulik asit kalibrasyon grafiği	58
Şekil 32: Sinamik asit kalibrasyon grafiği	58

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması	11
Tablo 2: Toprak numunelerinin tuz, pH ve kireç analizleri	41
Tablo 3: Yaprak ve toprak örneklerinin CNS analizi	42
Tablo 4: Toprak örneklerinin ağır metal içerikleri	43
Tablo 5: Yaprak örneklerinin ağır metal içerikleri	44
Tablo 6: <i>Erysimum kotschyanum</i> ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri	44
Tablo 7: <i>Erysimum kotschyanum</i> ekstraktlarının DPPH serbest radikalini giderim aktivitesi	45
Tablo 8: Bitki ekstraktlarının 700 nm'deki absorbans değerleri.....	47
Tablo 9: Bitki ekstraktlarının Troloksa eşdeğer FRAP değerleri.....	48
Tablo 10: Bitki ekstraktlarının ABTS serbest radikalini giderim aktiviteleri	48
Tablo 11: Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları.....	49
Tablo 12: Bitki ekstraktlarının total flavonid miktarları.....	50
Tablo 13: Bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi	51
Tablo 14: Bitki ekstraktlarının Brine Shrimp sitotoksosite sonuçları	52
Tablo 15: Bitkinin etanol ekstraktlarının bazı fenolik bileşen içerikleri	53

SEMBOL LİSTESİ

CNS:Karbon, Nitrojen, Sülfür
mL :Mililitre
°C : santigrat derece
gr : Gram
Gr(+) : Gram pozitif
Gr(-) : Gram negatif
M : Molarite
mg : miligram
mm : Milimetre
µg : mikrogram
µl : Mikrolitre
% : Yüzde
ROP : Reaktif Oksijen Partikülleri
DNA : Deoksiribonükleik asit
RNA : Ribonükleik asit
SOD : Süperoksit Dismutaz
GSH-Px : Glutasyon Peroksidaz
O₂- : Oksijen peroksit
•HO : Hidroksil radikali
LOO• : Lipid peroksil
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid
HAT : Hidrojen atomu transferi
ET : Tek elektron transferi
ORAC : Oksijen radikal absorban kapasitesi
TRAP : Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi
FCR : Folin-Ciocalteu reaktifi
TEAC : Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
YPSK : Yüksek performanslı sıvı kromatografi
FRAP : Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü
DPPH : 1,1-difenil-2-pikril hidrazil
CUPRAC : Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite
TBA : Tiyoarbitürik asit metodu
TCA : Trikloroasetik asit
BHT : Bütillenmiş hidroksi toluen
BHA : Bütillenmiş hidroksi anisol
GC : Gaz Kromatografisi
GC/MS : Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
dH₂O : Distile Su
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
β : Beta

ÖNSÖZ

“*Erysimum kotschyanum* ‘un Ağır Metal İçeriği ile Ekstraktlarının Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” isimli tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, sık sık bilgi ve tecrübelerine başvurduğum değerli danışman hocam Prof.Dr. Ramazan Mammadov’ a ve doktora öğrencilerine, beni yüksek lisans eğitimimi almak üzere bu alana yönlendiren ve desteklerini eksik etmeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Olcay Düşen ve Doç. Dr. Serdar Düşen’ e, arazi ve laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımları ile hep yanımda olan arkadaşlarım Nahide Deniz ve Semih Akgün’e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yaşamım boyunca kaliteli bir eğitim almam için çabalayan, her anımda maddi manevi desteklerini esirgemeyen babam Şükrü Kılınçarslan, annem Yazgülü Kılınçarslan ve kardeşim Emre Kılınçarslan başta olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürler.

1. GİRİŞ

Ülkemiz sahip olduğu zengin biyolojik çeşitlilik , endemik türleri ve pek çok türün gen merkezi oluşu ile dünya üzerinde önemli bir konuma sahiptir . İklim farklılıkları, coğrafik özellikleri, jeolojik geçmişi, deniz, göl, akarsu gibi çeşitli ortamların varlığı ve yükselti farklılıkları Türkiye’deki biyolojik zenginliğin nedenlerindedir . Avrupa kıtasında 11557 bitki türü, Britanya Adaları’nda 2000 bitki türü mevcutken (Heywood ve Tutin 1981) Türkiye’de yaklaşık olarak 9996 civarında bitki türü bulunur (Davis ve diğ . 1988, Güner ve diğ . 2012). Bu zengin bitki türü çeşitliliğini tanımlamak için yapılan ilk ciddi ve kapsamlı çalışmalar E.Boissier’in Flora Orientalis (Boissier 1867-1888) ve Davis’in , Flora of Turkey and East Aegean Islands (Davis 1965) adlı eserleridir . 1965 yılından günümüze kadar geçen süreçte yapılan çalışmalarla pek çok yeni tür tanımlanırken , mevcut türlerin yeni yayılış alanları tespit edilmiş, bazı cinslerin yeteri kadar örneğe dayandırılmadan floraya işlendiği ortaya çıkmıştır (Işıksal 2013).

Ülkemiz, bu zengin florasıyla çok sayıda tıbbi ve aromatik bitkiyi bünyesinde barındırmaktadır . Bitkiler, insan yaşamının sürdürebilmesi için gerekli olan oksijen ile besinleri sağlar ve sağlığı korurlar . Bitkilerin tedavide kullanımları insanlık tarihiyle birlikte başlamıştır . Binlerce yıl önce insan , bitkilerin tedavi edici gücünü tanımış ve sağlıklı yaşayabilmek için ondan yararlanmıştır. Halk hekimliği uygulamalarına yaygın olarak rastlanan Anadolu’da halk ilaçları , uzun tecrübeler sonunda günümüze kadar gelmiş uygulamalardır. Modern tıpta kullanılan pek çok ilaç da bitkilerden elde edilmektedir. Ülkemizde bitkisel zenginlik ; üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güneybatı Asya floraları arasında köprü olması , pek çok cins ve seksiyonun orijin ve farklılaşım merkezi olmasından kaynaklanmaktadır. Buna rağmen bu bitki zenginliğinden yeterince faydalanılamamaktadır. Bitkilerin mikroorganizmaları öldürücü ve insan sağlığı için önemli olan özellikleri 1926 yılından bu yana laboratuvarlarda araştırılmaktadır. Dünya Sağlık örgütü (WHO) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır. Bundan ancak 500 kadarının tarımsal üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir . Ayrıca değişik amaçla kullanılan bitkilerin çok azı farmokopelerde

kayıtlıdır . Örneğin Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır . Halbuki Türkiye de tıbbi amaçla tüketilen bitki sayısı çok fazladır , hatta bazı yayınlarda bunun en az 500 civarında olduğu kaydedilmektedir (Baytop 1984).

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de doğal florada bulunan bitkilerin halk arasında tedavi amaçlı, gıda, çay, baharat, boya, insektisit, hayvan hastalıklarının tedavisi, reçine, zambak, uçucu sabit yağlarından faydalanma , mesrubat ve kozmetik sanayinde kullanımı uzun yıllardan beri süregelen geleneksel kültürel zenginliğimizin bir parçası olmuştur (Faydaoğlu 2011).

Yüzyıllardan beri süregelen insan ve bitki arasındaki bağ sonucunda , günümüzde tüm dünyanın önemini kabul ettiği ve ciddi araştırmaların yapıldığı etnobotanik bilim dalı doğmuştur (Koçyiğit 2005). Etnobotanik bilgi birikimi, deneme yanılma yoluyla edinilmiş ve uzun bir zaman süreci sonucunda nesilden nesile aktarılarak günümüze kadar ulaşan çok değerli bilgileri yansıtan içerikleri ile bitkilerin bilimsel olarak değerlendirilmelerine önemli katkıda bulunmaktadır. “Tıbbi bitkilerle tedavi “ anlamına gelen “Fitoterapi” terimi ise ilk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılmıştır. Bitkilerin ürettiği doğal ürünler olan primer ve sekonder metabolitler doğrudan ve dolaylı olarak endüstrinin en temel ürünleridir. Bitkiler, topraktan aldıkları su , mineral ve bazı öğeleri kendi metabolizmalarında insan vücudunun özümleyebileceği bileşenlere dönüşürler.

Bitki kimyasalları genellikle primer ve sekonder metabolitler (protein ve nükleik asitler bu sınıflamanın dışındadır) olarak ikiye ayrılır (Oskay ve Oskay 2009). Primer metabolitler (Karbonhidratlar, yağlar, proteinler vb) doğada oldukça yaygın olup, yüksek bitkilerin tohum ile vejetatif dokularında oldukça fazladır (Cowan 1999, Theis ve Lerdau 2003) ve hücre metabolizmasındaki temel görevlerinden dolayı , bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidirler .

Pekçok yüksek bitki , ekonomik açıdan önem taşıyan organik kimyasalları (alkoloid, terpen, fenolik bileşikler , nadir amino asitler , bitki aminleri ve glikosidler , vb) bünyesinde biriktirerek çeşitli bilimsel , teknolojik ve ticari uygulamalara ham madde oluşturur (Anonymous 2009). Doğal bitki ürünleri (fitokimyasallar) çok sayıda endüstride doğrudan ya da dolaylı olarak kullanılır , özellikle yağlar , resinler, taninler, saponinler, doğal plastikler , yapışkanlar, balmumu, boyalar, ilaçların kaynağı

halindedir (Balardin ve diğ . 1985, Han 2001, Anonymous 2009). Şu anda ilaç endüstrisinde kullanılan önemli bitki bileşikleri salisin , taxol ve morfindir (Anonymous 2003).

Sekonder metabolitler , primer metabolitlerden biyosentetik yolla üretilmiş olup (Şekil 1.2) bitkiler âlemindeki dağılışı özel olan bir taksonomik grup (tür, cins, familya) ile sınırlandırılmıştır. Sekonder metabolitlerin , bitkinin primer metabolizmasındaki fonksiyonları tartışmalı olup , genelde tozlaşmada , çevresel koşullara uyum , mikroorganizma, böcek ve diğer predatörlere (avcılara) karşı kimyasal savunma , diğer bitkilerle yarışma gibi rollere sahip oldukları düşünülmektedir (Vanisree ve diğ. 2004, Vanisree ve Tsay 2004). Bitki bünyesinde oldukça az miktarlarda biriktirilirler . Özelleşmiş hücre tiplerinde ve bitkinin farklı büyüme evrelerinde sentezlendiklerinden dolayı ekstraksiyonları ile saflaştırılmaları zordur (Özgen ve diğ. 2005)

Karbon, nitrojen, iz elementler ve savunma metabolitleri bitkinin besin kalitesini oluşturmaktadırlar. Bu durum, Bryant ve diğ. (1983) tarafından önerilen ve çevredeki C ve N mevcudiyetinin C bazlı bitki savunma bileşenlerinin (irinoid glikozitleri gibi) üretimini etkilediğini savunan, Karbon-Besin dengesi hipotezinin oluşumuna yol açmıştır. Bu hipoteze göre; C bazlı savunma bileşenleri ortamdaki C/N mevcudiyetine bağlı ise, N bazlı savunma bileşenleri de (glikozinolatlar) yapraktaki C/N varlığından etkilenecektir. Örneğin, ışık sınırlandırıldığında bütün karbonhidratlar, karbonhidrat konsantrasyonunun azalmasıyla ortaya çıkan büyümeye ve daha düşük C/N oranlarındaki bitki dokularına yönlendirileceklerdir. Bu C/N oranındaki dengesizlik karbon bazlı sekonder metabolitlerin sentezlenmesiyle sonuçlanacaktır. Artan nitrojen varlığından dolayı, alkaloid, siyanojenik glikozitler ve glikozinolatlar gibi nitrojen içeren sekonder metabolitlerin sentezi artacaktır (Asad 2011).

Bitkiler; farklı bitki türlerinin metallere olan toleranslılığına göre ve bunların ekolojik çevrelerine göre 4 gruba ayrılırlar: Sadece metal içermeyen topraklarda yaşayan ve metallerce zengin topraklarda hiçbir populasyon ya da ekotipe sahip olmayan bitkiler (zorunlu metal sevmeyenler); sadece metallerce zengin topraklarda, buralara endemik olarak yaşayabilen bitkiler (zorunlu metal sevenler) olarak, diğer iki gruba giren bitkiler ise fakültatif metal sevenler olarak adlandırılırlar. Bu gruptaki

bitkilerin bazı populasyonları metallere karşı toleranslıyken, bazı populasyonları toleranslı değildir (Pollard ve diğ. 2002). Ağır metal içeriği şüphesiz bitki için hem yararlı hem de zararlı olabilir. Örneğin, Zn oksidaz, peroksidaz, anhidraz ve dehidrogenaz gibi birçok enzim için kofaktör olarak hareket etmektedir (Hewitt 1983) ve nitrojen metabolizmasını, hücre çoğalmasını, fotosentezi ve bitkilerdeki hormon sentezini düzenlemektedir (Shier 1994). Zn' un aksine, Cd bitki bünyesinde hiçbir fizyolojik fonksiyonu bilinmemektedir, bu yüzden temel element olmadığı ve bitki ve tohum çimlenmesi üzerine olumsuz etkileri olduğu rapor edilmiştir (Ahmad ve diğ. 2012). Ni bazı bitki türleri için gerekli olmasına rağmen, Zn, Cu ve Mg tersine temel element değildir, yüksek konsantrasyonlarının bitki için toksik olduğu bildirilmiştir (Seregin ve diğ. 2006). bazı bitkiler ağır metalleri herhangi bir toksisite semptomu göstermeksizin toprak üstü organlarında diğer bitki türlerine göre 100 ila 1000 kat daha fazla biriktirebilir . Bu tür bitki ler “hiperakümülatör” olarak adlandırılmaktadır (Brooks 1998). Metal hiperakümülatörü bitkiler , gövde dokularında oldukça yüksek konsantrasyonlarda metal iyonlarını biriktirmekte ve detoksifiye edebilmektedir . Ağır metal toksisitesine karşı yüksek tolerans , bir genotip ile çevresi arasındaki etkileşime bağlı olarak metal alınımındaki azalma ve içsel alıkonmadaki artışa bağlı olarak gerçekleşmektedir (Yıldız ve Terzi 2011).

Yaklaşık 450 bitki türü hiperakümülatör olarak tanımlanmış olup ; Brassicaceae, Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae ve Euphorbiaceae bu özelliğe sahip familyalardan yalnızca birkaç tanesidir (Reeves 2006).

Oksijen insan yaşamı için çok elzem olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir (Diplock 1998). Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştığında , kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar 1996). Serbest radikaller , dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili , stabil olmayan bileşiklerdir . Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein , lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır . Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp -damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri , katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama , sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep

olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Diplock 1998). Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen , serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir (Elliot 1999). Antioksidanlar mekanizmalarına göre , birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir . Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir . Genel olarak serbest radikallerin DNA , proteinler ve lipidler gibi hücrenel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücrenel bölgeden diğerine geçişini de önle yebilmektedirler (Diplock 1998). İkincil antioksidanlar ise ; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini , E vitamini , ürik asit , bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (Ou ve diğ. 2002). Bitkiler serbest radikal yakalayan ve bu şekilde serbest radikalleri etkisiz hale getiren fenolik bileşikler, azotlu bileşikler, vitaminler, terpenler ve bazı iç metabolitler gibi güçlü antioksidan aktiviteye sahip çeşitli bileşikleri içermektedir (Velioğlu ve diğ. 1998).

Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, reçete ile satılan ilaç ların % 25’ ini oluşturmaktadır (Farnsworth ve diğ. 1985). Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapıli ilaç ların yetersiz kalması, yan etkilerinin saptanması ve patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç kazanması doğal ürünlerin kullanma zorunluluğunu arttırmış tır. Bu amaç la birç ok bitki mikrobiyolojik farmakolojik yönlerden hatta biyolojik savaş ın gündemde olduğu son yıllarda bitki savunma mekanizması bakımından da ç ok yönlü araştırlmaktadır . Son yıllarda tıbbi amaç larla kullanılan bitkilerin antimikrobiyal etkileri üzerine pek ç ok ç alışma yapılmış tır (Demirbağ ve ark . 1997, Kırbağ 1999, Dığrak ve ark. 1999, Kırbağ ve Bağcı 2000, Sür ve ark., 1998, Özkal 1986, Matthews ve Haas 1993, Meriçli 1986).

Bazı bitki ekstraktlarının kullanılan bakteri ve maya türleri üzerine farklı oranlarda antimikrobiyal etkiye sahip oldukları görülmüş tür. Kırbağ ve Zengin (2006). Elazığ yöresinde tıbbi amaç larla kullanılan *Bunium paucifolium* DC. var. *paucifolium*, *Taraxacum revertens* G. Hagl., *Linum nodiflorum* L., *Centauria kurdica* Reichart., *Echium italicum* L., *Salvia verticillata* L. subsp. *amasiaca* (Frey &

Barnma) Barnm, *Thymus kotschyanus* Boiss & Hohen var. *glabrescens* Boiss., *Verbascum varians* Freyn & Sind. *Ranunculus constantinopolitanus* (DC) UV., *Rheum ribes* L. ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi araş tırnışlardır ve araş tırma sonunda *Bunium paucifolium* var. *paucifolium*, *Linum nodiflorum*, *Centauria kurdica*, *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca*, *Thymus kotschyanus* var. *Glabrescens* ve *Rheum ribes* ekstraktları test edilen mikroorganizmaların geliş melerini değiş ik oranlarda inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Aynı cinsin farklı taksonları üzeri ndeki bu benzer sonuçlar doğaldır . Çünkü mikroorganizmaların kemoterapötik maddelere karşı duyarlılıklarının suştan suşa farklılık gösterdiği belir tilmektedir (Abbasoğlu ve ark . 1992).

Doğada tabii olarak yetişen bazı bitki ekstraktlarının ve uçucu yağlarının bakterilere olduğu kadar , mantarlara karşı da antifungal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarında tespit edilmiştir . Uçucu yağlar , bitkilerden yada bitkisel droglardan, su veya su buharı distilasyonu ile elde edilen, normal koşullarda sıvı , bazen donabilen uçucu, kuvvetli kokulu ve yağimsı k arışımlardır (Tanker ve Tanker 1990). Uçucu yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılık göstermektedir . Etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak değişiklik gösteren pek çok uçucu yağın , antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu beli rtilmektedir (Bağcı ve Dığrak 1997). Droglarda selüloz , nişasta, pektin, protein, şeker v.s. gibi tedavi yönünden etkisiz maddeler yanında çok az miktarlarda bile , farmakolojik etkilere sahip bileşikler de bulunmaktadır . Bu bileşiklere ‘etkili madde’ (müessir ma dde) ismi verilmektedir (Baytop 1999). Antimikrobiyal etkili sekonder metabolitler, yiyeceklerde oluşan mikroorganizmaların gelişimini önleyebilmektedirler . Dolayısıyla yiyeceklerin raf ömrü uzamaktadır . Fitokimyasallar içerisinde önemli antimikrobiyal aktivite gösteren gruplar; alkaloidler, flavonoidler, tanenler, kumarinler, terpenler ve fenilpropenlerdir (Burt 2004).

Yukarıda anlatılmış olan bilgilerden yola çıkarak üzerinde çalışma yaptığımız *E. kotschyanum* türünün toprak- bitki ilişkileri ve biyolojik özelliklerinin öğrenilmesinin önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Erysimum türleri, içermiş oldukları kimyasal bileşenlerden dolayı çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Yaptığımız literatür araştırmasına göre *Erysimum*

cinsine ait bazı türlerde çeşitli fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarına rastlanırken, endemik bir tür olan *Erysimum kotschyanum* üzerinde taksonomik ve floristik çalışmalar ve total fenolik ve DPPH serbest radikal giderim aktivitesi dışında biyolojik aktivite çalışmasına rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada *Erysimum kotschyanum*' un ve toprak örneklerinin ağır metal içeriği, CNS analizi ve bitki ekstraktlarının antioksidan özellikleri, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, antimikrobiyal aktivitesi, sitotoksik aktivitesi (Brine Shrimp) araştırılarak ve YPSK ile bazı aktif bileşenlerinin (fenolik asit) tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.1 Brassicaceae Familyası ve *Erysimum* Cinsi

Turpgiller olarak bilinen Brassicaceae familyası, daha çok kuzey yarım kürede nadiren tropiklerde yayılmış (Koch ve diğ. 2006), 338 cins ve 3700 türün yer aldığı ekonomik öneme sahip olan çoğunluğu tek yıllık bitkilerden bir kısmı ise çok yıllık ve küçük çalı ya da yarı çalı olmak üzere çok sayıda tür içeren (Warwick ve Sauder 2005) geniş bir familyadır (Al-Shehbaz ve diğ. 2006). Brassicaceae familyası başta yemeklik ve endüstriyel yağ bitkileri, sebze türleri, baharat bitkileri ve yem bitkileri olmak üzere çok sayıda ekonomik türü içermektedir. En önemli yemeklik yağ bitkisi Kanola (Kolza) veya yağ şalgamı olarak bilinen *Brassica napus* olup *Sinapis alba* (beyaz hardal) ve *Brassica nigra* (siyah hardal) tohumlarından da yararlanılmaktadır. Baharat bitkileri arasında ise *Brassica juncea* (Hint hardalı), *A Armoracia rusticana* (bayır= Yaban turbu), *Sinapis alba* (beyaz hardal) ve *Erysimum ssp.* (Duvar çiçeği) türleri bulunmaktadır. Yaprak lahanası, baş lahanası, karnabahar, brokoli, brüksel lahanası, alabaş ve Çin lahanası gibi *Brassica oleracea* çeşitlerinin yanısıra turp, bahçe teresi, roka ve şalgam gibi türler de sebze olarak yaygın şekilde tüketilmektedir. *Brassica carinata* (Ethopya hardalı), *Camelina sativa* (ketencik), *Crambe abyssinica* (krambe), *Eruca vesicaria* (roka) gibi muhtelif türler ise yemeklik yağ ve protein bitkileri, biyodizel yakıt bitkileri, biyolojik ürün tasarımı ve moleküler tarım açısından önemli potansiyele sahiptir (Gugel ve Falk 2006, Warwick ve diğ. 2007). Şalgam, repko veya yem lahanaları birçok ülkede hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Açıkgöz 2003). Ayrıca şalgam ve kolza yeşil yem bitkisi olarak

silaj yapımında değerlendirilmekte (Tansı ve diğ. 1999). Beyaz ve siyah hardal tohumlarından ise hardal sosu üretilmektedir. *Cherianthus cheiri* (şebboy), *Hesperis* ssp. (çoban yıldızı) ve *Lunaria annua* (sedef çiçeği) gibi turpgil türleri evlerde, park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Martin ve diğ. 2011, Sıralı ve diğ. 2013).

Erysimum L. cinsinin 290 ve 350 arasında tür içerdiği ve Avrupa, Akdeniz bölgesinde, YakınDoğu ve Doğu Asya'nın yanı sıra Kuzey ve Orta Amerika boyunca yayılış gösterdiği ve çoğunlukla çok yıllık ve iki yıllık bitkiler oldukları bildirilmiştir (Polatschek ve Snogerup 2002). Taksonomik ve moleküler çalışmalara *Erysimum*'un 223 tür (Warwick ve diğ. 2006) ile Erysimeae Dumort takımında olduklarını göstermektedir (Warwick ve diğ. 2007; German ve Al-Shehbaz 2008).

Erysimum, Flora of Turkey kaynağına göre Brassicaceae familyasının en zengin ikinci cinsidir (Mutlu 2010). *Erysimum* cinsi taksonomik olarak zor bir cinstir. Brassicaceae familyasına ait olan *Erysimum* L. 21'i endemik 46 takson içermektedir. Endemizm oranı %45.6'dır (Cansaran ve diğ. 2007). *Erysimum* cinsinin genel özellikleri şu şekildedir: Tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık bitkilerdir. Yapraklar genellikle dar, yaprak kenarları dentat şeklindedir. Tüylere genellikle sıklıdır. Petaller, sarı ya da menekşe rengidir. Meyve basık, dörtgen veya yuvarlak silikula şeklindedir. Tohumlar, her hücrede 1 sıra halindedir. Stilus çok kısa, stigma kapitat veya iki lopludur (Davis 1965).

Erysimum türleri üzerinde çoğunlukla yapılan taksonomik çalışmaların yanı sıra, bu cinse ait çeşitli türlerin fitokimyasal içerikleri araştırılıp, bazı biyolojik aktiviteleri bakımından da incelenmiştir.

Erysimum bitkileri, metiltiyookil, metilsülfinilalkil ve metilsülfolilalkil glukozinolatlarını bulundurmalarıyla nitelendirilmektedirler (Daxenbichler ve diğ. 1991). *Erysimum corinthium* Boiss. 'in taze yaprakları, kökleri ve tohumlarının doğal otoliziz ve eksojen mirosinaz hidrolizi yoluyla glukozinolat içerikleri incelenmiştir ve bunun sonucunda bu bitkide ilk kez 6 glukozinolatın varlığı belirlenmiştir; sinigrin, progoitrin, glukoberin, 3-propil glukozinolat, glukocerolinve glukoeisolin (Gendy ve diğ. 2010). Bir diğer çalışmada *Erysimum crepidifolium*' un yapraklarından dört kardiyak glikoziti izole edilmiştir. Lahana kelebeğinin (*Pieris rapae*) yumurtlamasının,

Erysimum cheiranthoides'in yapraklarının yüzeyindeki glukozinolatlar ve kardenolidlerin dengesinden etkilendikleri düşünülmektedir. Yüzeydeki glukozinolatların konsantrasyonunun doku seviyeleriyle pozitif olarak alakalı olduğu ancak, kardenolid konsantrasyonunun bu bitkilerde daha düşük yüzeye sahip olduğu bildirilmiştir (Hugentobler ve Renwick 1995). *Erysimum cheiranthoides* 'in, lahanaya yapraklarına uygulandıklarında *Pieris rapae*' nin larvaları tarafından yenmesini engelleyen ekstrakte edilebilir bileşenler içerdikleri tespit edilmiştir (Dimock ve diğ. 1991). Radulovic ve diğ. (2011) yaptıkları bir çalışmada *Erysimum diffusum*' da tespit ettikleri 4-izotiyosiyanatonutanoik asitin önemli insan patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi analiz edilmiştir ve önemli bir inhibitör olduğu gösterilmiştir.

1.1.1 *Erysimum kotschyanum* Gay.

Yoğun tutamlar veya kümeler halinde büyüyen, çok yıllık bitkilerdir. Gövde 7-10 cm'e kadar uzar, tüylüdür. Yapraklarda, en fazla 2 mm genişliğinde iğne benzeri sert kıllar bulunmaktadır. Sepaller kese şeklinde, 6-8 mm'dir. Petaller parlak sarı, 10-12 mm'dir. Stilus 3-4.5 mm'dir. Çiçeklenme zamanı Mayıs-Haziran aylarıdır. Kayalık yamaçlar veya çakıllarda, 1200-2900 m yüksekliklerde yetişmektedirler. Türkiye'de Kütahya, Muğla, Denizli, Antalya, Konya, Niğde, Adana sınırları içerisinde doğal yayılış gösteren endemik bir türdür (Davis 1965) (Şekil 1).



Şekil 1: Bitki materyali *Erysimum kotschyanum* Gay.

1.2 Sekonder Metabolitler

Bitkiler, insanoğlunun yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan karbonhidrat, protein ve yağların, yani primer metabolitlerin temel kaynağını oluştururlar. Bunun yanı sıra, ‘sekonder metabolitler’ adı verilen ilaç, kimya, gıda, tekstil, kozmetik sanayi ve tarımsal mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan önemli ve yeri doldurulamaz bazı maddeler de bitkilerden elde edilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Sekonder metabolit kavramı ilk defa Kossel (1891) tarafından primer metabolitlerin karşıtı olarak tanımlanmış, Theis ve Lerdau (2003) ise sekonder metabolitleri bitkiler tarafından üretilen, fotosentez ürünü olmayıp, birtakım fizyolojik mekanizmaların fonksiyonlarıyla oluşan fotosentez ya da solunum gibi hayati fizyolojik olaylar için mutlak gerekli olmayan maddeler şeklinde tarif etmiştir. Sekonder metabolitler, birincil metabolizma yollarının ana ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilmektedirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar (Bourgaud ve diğ. 2001). Sekonder metabolitler, bitkinin büyüme ve gelişmesinde direkt fonksiyonlara sahip olmayan, yani fotosentez, solunum, çözülmüş madde transferi, translokasyon, besin asimilasyonu ve farklılaşma süreçlerinde genellikle tanımlanmış bir rolleri olmayan (Hartman 1991); bitkide savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi çevresel koşullara uyum

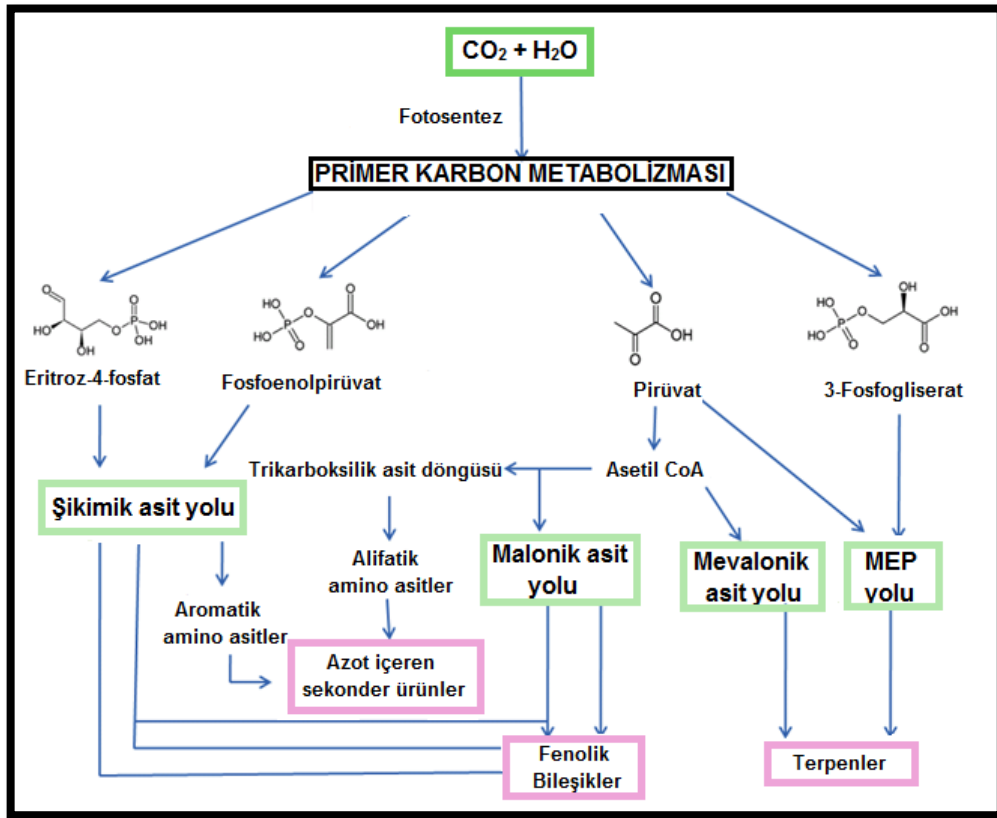
faaliyetleri esnasında üretilen organik bileşenlerdir. Bitkiler aleminde primer metabolitlerden daha sınırlı bir dağılıma sahiptirler, yani genellikle yalnızca bir bitki türünde veya türlerin taksonomik olarak yakın gruplarında bulunmaktadır. Çoğunlukla bitkilerin belli organlarında bulunurlar ve bitkinin belli bir gelişim periyodu süresince üretilirler (Verpoorte ve diğ. 1999, Sökmen ve Gürel 2001). Sekonder metabolitlerin yüksek konsantrasyonları bitkinin daha dirençli olmasını sağlayabilmektedir. Üretimlerinin pahalı olduğu ve bitki büyüme ve üremesini azalttığı düşünülmektedir (Simms 1992, Karban ve Baldwin 1997, Harvell ve Tollrian 1999, Stotz ve diğ. 1999, Siemens ve diğ. 2002).

Sekonder metabolitler temelde terpenler, fenoller ve azot ve/veya kükürt içeren bileşikler olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar (Agostini- Costa ve diğ. 2012) (Tablo 1).

Tablo 1: Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması

	Tip	Örnek
TERPENLER	Hemiterpenler	Prenol
	Monoterpenler	Mentol
	Seskiterpenler	Limonen
	Diterpenler	Taksol
	Triterpenler	Digitanin
	Tetraterpenler	Karoten
	Meroterpenler	Klorofil
	Politerpenler	Dolikol
FENOLİK BİLEŞENLER	Hidroksibenzoik Asitler	Gallik asit
	Hidroksisüsamik Asitler	Ferulik asit
	Fenilpropanoidler	Kumarin
	Naftokinonlar	Juglon
	Antrasenler	Antranol
	Flavonlar	Apigenin
	Flavonoller	Kuersetin
	İzoflavonlar	Genistein
AZOT ve/veya KÜKÜRT İÇEREN BİLEŞİKLER	Heterosiklik Alkoloidler	Nikotin
	Non-heterosiklik Alkoloidler	Efedrin
	Psödo Alkoloidler	Solanidin
	Siyanojenik Glikozitler	Hidrojen siyanid
	Glukozinolatlar	Sinigrin
	Non-protein Amino asitler	Mimozin

Bu gruplar kimyasal olarak birbirlerinden farklı olup, glikoliz, fotosentez ve krebs döngüsü süreci boyunca gerçekleşen metanolik yan basamaklardan üretilmektedir. Primer metabolizmanın ana yolları olan bu süreçlerin ara ürünleri olan asetil coA, şikimik asit, mevalonik asit ve deoksiksiloz-5-fosfat üzerinden sekonder metabolitler sentezlenmektedir (Dewick 2002).



Şekil 2: Sekonder metabolitlerin başlıca biosentez yolları (Taiz ve Zeiger 2010)

1.3 Serbest Radikaller

Serbest radikal biyolojisi, son yıllarda birçok yönleri ile dikkatleri üzerinde yoğunlaştırmıştır. Bir serbest radikal 1,3,5 gibi tek sayıda elektronlara sahip herhangi bir molekül olarak tanımlanır. Hem organik ve hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik taşırlar. *in vivo*, normal metabolizmanın ürünleri şeklinde açığa çıkan serbest radikaller ayrıca organizmanın iyonize edici radyasyona, oksitleyici özellik taşıyan ajanlara (bazı ilaçlar, örneğin paraquate) ve doğal ortamda serbest radikal metabolitleri oluşturabilen xenobiyotiklere (hücreye

yabancı olan maddeler) maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler. Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri sayısız enzimatik tepkime ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidir. Ancak, herbir radikalın yapısı ve etkili olduğu yere göre hücrel hedefler risk altındadır . Bu bakımdan, serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve hücrel savunmalarla adaptif mekanizmaların incelenmesi henüz açıklık getirilememiş bazı klinik durumların patogenezi ışık tutabilir ve bu bakımdan da ilgi çekebilir (Kavas1989).

Canlıların hayatlarını sürdürmeleri için gerekli olan oksijen , elzem bir moleküldür. Eğer oksijen molekülü eksik indirgenirse hücelere zarar veren Reaktif Oksijen Türleri (ROT) meydana gelmektedir. ROT ve Serbest Radikaller (SR) hücelerde aşırı miktarda oluşuyor ise bu olay "oksidatif stres " olarak tanımlanır . Oksidatif stres, hücelerdeki bileşenler üzerinde olumsuz bir etki oluşturur . Bu etki ile Hidroksil Radikali (OH) başta olmak üzere birçok serbest radikal, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) üzerinde bulunan nükleik asit ve bazlarının değişimine , DNA üzerindeki zincirlerde kırılmalar meydana getirerek kanser oluşumuna , hücelerin yaşlanmasına ve hücelerin ölümüne kadar giden süreçleri başlatabilirler (Moldovan ve Moldovan 2004).

Organizmada herhangi bir patolojik olay veya fizyolojik şartlarda oluşan serbest radikaller ile bunların süpürücüsü olan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Bu dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir (Öğüt 2014).

Oksidasyon; canlı hücelesinde veya lipid içerikli gıdaların renk , tat ve kokularında oksijenin oksidatif etkisiyle meydana gelen ve çoğunlukla istenmeyen değişimlerdir (Sizer ve Whitney 1997, Gür ve Altug 2001).

Gıdalarda oksidasyon reaksiyonlarını önleyen veya yavaşlatan antioksidanlar , lipidlerin oksidasyonunda serbest radikal içeren yağlara hidrojen veya elektron vererek, ya da yağ asidi zinciri ile serbest radikal lerin arasında kompleks oluşturarak radikal zincirine son verirler . Antioksidanlar , kendi yapısındaki elektronlarını vererek serbest radikalleri etkisizleştirirken kendileri ise serbest radikallere dönüşmezler ; dolayısıyla da her iki formda da kararlı bileşiklerdir (Anıl 2006). Gıdalarda bulunan

antioksidanların etkileri sonucunda gıdaların renk , tat ve koku gibi özellikleri böylece korunmuş olur (Gür ve Altug 2001).

Oksijen, canlıların yaşamı için vazgeçilmez olmasına rağmen metabolik faaliyetlerin ve çevresel faktörlerin etkisiyle reaktif oksijen türlerine dönüşerek sağlığı tehdit edebilmektedir (Gök ve Serteser 2003). Oksijen, iki elektronu eşleşmemiş halde olan bir elektron dağılımına sahiptir (Memişogulları 2005).

Vücutta doğal olarak var olan antioksidan savunma sistemleri , serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarına karşı koymaya çalışırlar . Bu durum normal fizyolojik şartlarda bir denge halinde olup , antioksidan tüketiminin azalması veya serbest radikal oluşumunun artması halinde birçok hastalığın oluşmasından sorumlu tutulan oksidatif strese neden olur (Günaydın ve Çelebi 2003).

Serbest radikal oluşturan kaynaklar arasında UV , radyasyon, güneş ışınlarının bir kısmı , fosil kökenli yakıt maddelerinin bazı yanma ürünleri , virüsler, sigara dumanı, stres, enfeksiyon, iltihap, yağ metabolizmasının toksik ürünleri , tahrip edici kimyasallar , mitokondrilerde elektron transport zincirindeki oksijenin tam olmayan redüksiyonu, zirai mücadele ilaç kalıntıları , bakır ve demir gibi metallerin aracılık ettiği bazı kimyasal reaksiyonlar , cerrahi müdahale sonrasında gözlenen organ hasarları ve iskemik dokuların reperfüzyonu yer almaktadır (Lee ve diğ. 2004, Gök ve Serteser 2003, Günaydın ve Çelebi 2003). Radikaller bütün hücrel makro moleküller ile reaksiyona girebilirler . Bu tür hücrel hasar oluşumuna , lipidlerdeki peroksidasyon ve DNA hasarı örnek verilebilir .

Lipidlerin Peroksidasyonu: Serbest oksijen radikalleri, organel ve plazma membranlarındaki lipidler üzerinde peroksidasyona neden olurlar . Hidroksillik radikal membran lipidleriyle çift bağ yaparak böylece radikal -lipid etkileşmesiyle zincirleme reaksiyonla Malondialdehit (MDA), dien konjugatları gibi peroksidasyon ürünleri oluşur. Eritrosit membranlarındaki , lipozomal membranların okside olması sonucu bu yapıların kimyasal ve fiziksel özellikleri değişir . Bu değişimin sonucunda membranın iyon geçirgenliği bozularak eritrositler hemoliz olur . Böylece yaygın bir şekilde organel, membran ve hücre hasarı ortaya çıkar (Muray ve diğ. 1996).

DNA Hasarı: Serbest oksijen radikallerinin , mitokondrial ve nükleer DNA'daki timinle reaksiyona girmesiyle , tek zincir kırılmaları meydana gelir . Bu şekilde hücreler in enerji kaybetmesiyle nekrotik hücre ölümü gerçekleşmektedir . Bugüne kadar oksidatif olarak değişmiş olan yaklaşık 20 tür DNA saptanmıştır (Muray ve diğ. 1996, Onat ve diğ. 2006).

Canlılar sahip oldukları enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri sayesinde kendilerini serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyabilmektedirler . Aksi halde reaktif oksijenler hücrele rin ölümüne neden olurlar (Thomas 1995, Blomhoff 2005).

1.4 Antioksidanlar

Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonlarını inhibe eden bir sisteme sahiptir. Radikallerle oldukça ivedi reaksiyonlara girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanır (Aslan ve diğ. 1995). Bir şekilde oluşturulan herhangi bir ilk radikal ürünün reaktif karakterine bağlı olarak biyomoleküler ve hücrel yapılar saldırmasının önlenmesi antioksidan savunma sisteminin işidir (Byung 1994). Zincir kırma reaksiyonlarının her basamağında kesinlikle az da olsa hiperoksit oluşması ve ortamdaki ürünler ve haraplanmanın sıfırlanamaması nedeniyle oksidasyon reaksiyonları ve radikaller tamamen yok edilemez (Gutteridge 1995, Haber ve Weiss 1934).

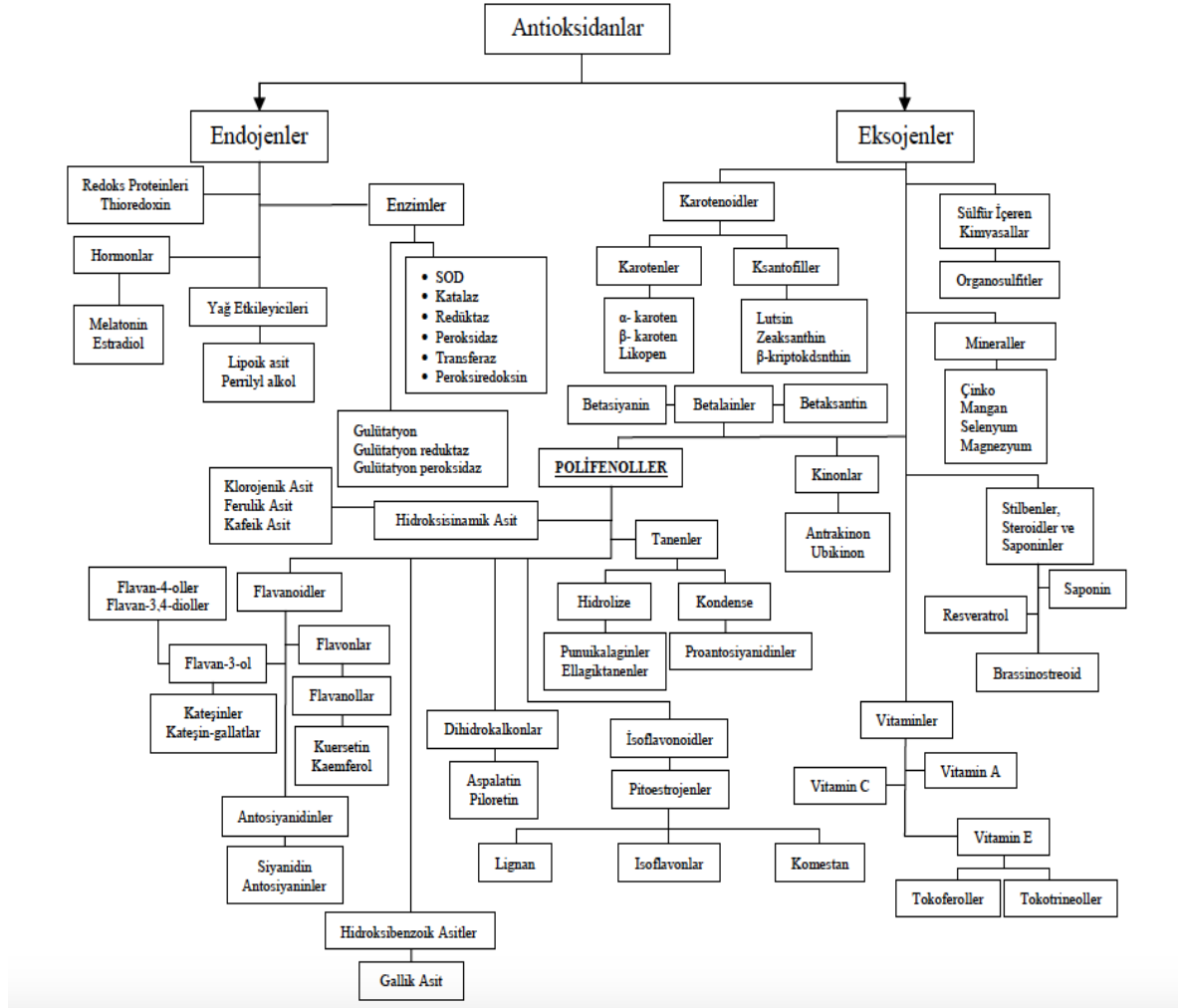
Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre haraplanmasının onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin arttırılması olarak ayrımlanan beş değişik blokta yürür (Gutteridge 1995). Bazı yazarlar, antioksidan savunmayı, bileşenlerin enzimsel olup olmamasına bakarak; katalaz, SOD ve GSH-Px'in rol aldığı antioksidan aktiviteleri 'enzimatik antioksidan savunma' tokoferol, askorbat, glutatyon, ürik asit, glikoz gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini 'nonenzimatik savunma' olarak tanımlamaktadır (Byung 1994). Öte yandan, antioksidanlara daha spesifik rollerin

yüklendiği çalışmalarda, antioksidan savunmanın selüler, membransel ve ekstraselüler olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (Mccord 1969).

Diyetle alınan antioksidanlar, oksidatif stresin etkilerinin ortadan kaldırılmasında endojen kaynaklı antioksidanlara yardımcı olmaktadır . Antioksidanların diğer üretim yolu ise bunların endüstriyel olarak sentezlenmesidir . Bu şekilde üretilen antioksidanlar sentetik antioksidanlardır . Doğal antioksidanların tersine sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından güvenilirliği tartışmalıdır (Jadhav ve diğ. 1996). Sentetik antioksidanlar özellikle hazır gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun temel nedeni deodorizasyon veya kızartma gibi sıcaklık uygulamaları ve uzun depolama şartları altında gıdalarda lipid oksidasyonu sonucunda serbest radikal oluşumunun önlenmesi ve beslenmeyle alınan gıdalar aracılığıyla organizmada oluşabilecek serbest radikal düzeyini düşürerek ortaya çıkabilecek hastalıklara karşı korumaktır (Pokorný 2007). Sentetik antioksidanlardan en önemlileri BHA (bütilenmiş hidroksianisol), BHT (bütilenmiş hidroksitoluen), TBHQ (tersiyerbutil hidrokinon) ve PG (propilgallat)'dır. Ancak günümüzde sentetik antioksidanların bazı toksik etkilere sahip olduğunun belirlenmesi sonucu doğal antioksidanlara olan ilgi giderek artmaktadır (Jadhav ve diğ. 1996).

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler (Cherubini ve diğ. 2005, Young ve Woodside 2001, Sözmen 2002, Taysi ve diğ. 2002, Taysi ve diğ. 2002).

1. Scavenging (temizleme) etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır .
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.
3. Onarma etkisi
4. Zincir koparma etkisi : Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin , seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır.



Şekil 3: Antioksidanların sınıflandırılması (Wootton 2011' den uyarlanmıştır.)

1.4.1 Fenolik Bileşenler

Bütün bitki metabolizmalarında , sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu sanılan çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Saldamlı 2007).

Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup , günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır (Kafkas ve diğ. 2006). Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir (Cemeroğlu 2004). Fenolik bileşikler bitkilerin meyve , sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler (Bilaloğlu ve Harmandar 1999, Coşkun 2006, Aydın ve Üstün 2007). Fenolik

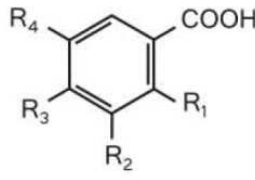
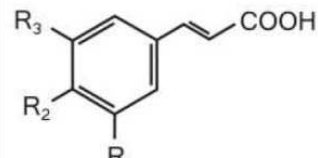
bileşikler , fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar .
Flavanoidler , bitkisel çayların , meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır . Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzeler in lezzetinin oluşmasında , özellikle ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler . Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı , sarı-esmer, kırmızı -mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar . Meyve ve sebzelerin işlenmelerinde enzimatik esmerleşme gibi değişik sorunlara da neden olmaktadır . Bu özellikler meyve ve sebzeler ile bunlardan elde edilen ürünler için son derece önemlidir (Cemeroğlu 2004, Zor 2007, Güngör 2007, Anonim 2006).

Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir (Pehlivan ve Güteryüz 2004). Fenolik bileşiklere , beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle "biyo flavonoid" adı da verilmektedir . Bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadırlar (Saldamlı 2007, Cemeroğlu 2004). Ayrıca gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler ; enzim inhibisyonuna neden olmaları ve değişik gıdalarda kalite kontrol kriteri olmaları gibi nedenlerle de önem taşımaktadırlar (Saldamlı 2007, Anonim 2006).

Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler , fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar (Cemeroğlu 2004).

1.4.1.1 Fenolik Asitler

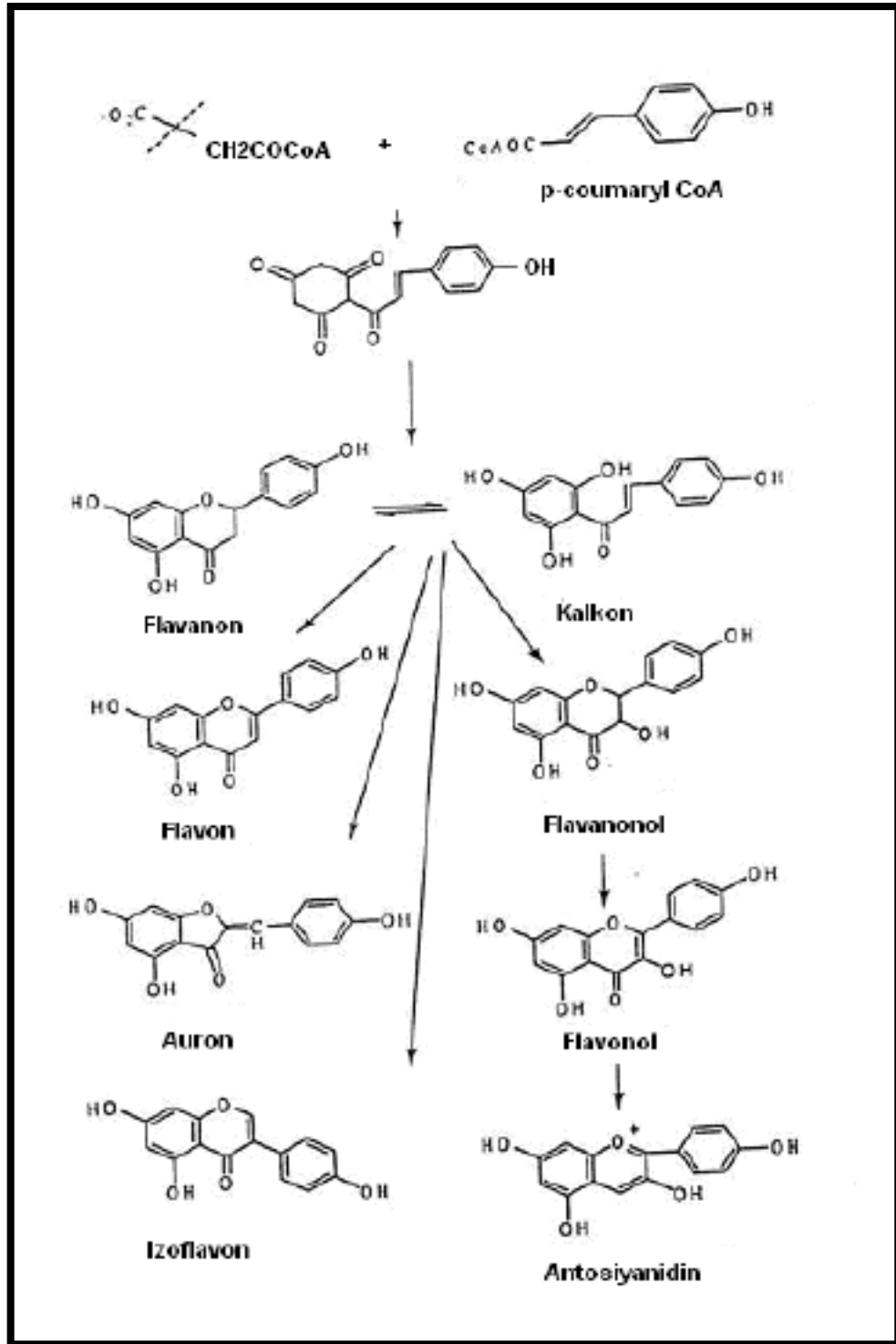
Hidroksi benzoik asit ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarla genelede iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Benzoik asit türevlerine örnek olarak , protokatesuik asit , p-hidroksibenzoik asit , vanilik asit , salisilik asit ve gensitik asit verilebilir . Kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit ise sinamik asit türevlerindedir (Ribéreau-Gayon vd. 2000, Yücel ve Ötles 2001, Nizamlioğlu ve Nas, 2010).

	Benzoik Asit	R₁	R₂	R₃	R₄
	<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H
	protoketeşuik asit	H	OH	OH	H
	vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H
	gallik asit	H	OH	OH	OH
	şirincik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
	salisilik asit	OH	H	H	H
gentisik asit	OH	H	H	OH	
	Hidroksisınamik Asit	R₁	R₂	R₃	
	<i>p</i> -kumarik asit	H	OH	H	
	kafeik asit	OH	OH	H	
	ferulik asit	OCH ₃	OH	H	
	sinapik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃	

Şekil 4: Fenolik asitlerin kimyasal yapısı (Jackson 2000, Fraga 2010)

1.4.2 Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde bulunan bileşiklerin en önemli grubunu oluşturmaktadır. Sarı renkli olmaları nedeniyle latince ‘sarı’ anlamına gelen ‘flavus’ sözcüğünden türetilerek flavanoid adını almışlardır. İlk defa olarak flavanoid tipli madde Şevrole tarafından meşe ağacının bir türünün köklerinden izole edilmiştir. Daha sonraları bu madde kuersetin olarak adlandırılmış ve sarı renkli boya olarak kullanılmaktadır (Mammadov 2014). Flavonoidler, temel yapısı C₆-C₃-C₆ difenilpropan iskeletinden oluşmaktadır. Ortadaki piran halkasındaki değişikliğe göre % alt grupta incelenmektedirler (Söylemezoğlu 2003).



Şekil 5: Flavonoidlerin sınıflandırılması (Çıkrıkçı 2005)

1.5 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidanlarla ilgili bilimsel makaleler incelendiğinde farklı araştırmacılar tarafından antioksidan kapasiteyi tanımlamak için farklı terimlerin kullanıldığı görülür. Karşılaşılabilecek terimler total antioksidan “kapasite” veya “etkinlik”, “güç”, “parametre”, “potansiyel”, “potens” ve “aktivite” dir . Bir kimyasalın “aktivitesi” basınç , sıcaklık , reaksiyon ortamı , diğer reaktifler gibi spesifik reaksiyon koşulları belirtilmedikçe anlamsızdır . Tek bir analiz yöntemi ile ölçülen “antioksidan aktivite” o yöntemde uygulanan spesifik koşullardaki kimyasal reaktiviteyi yansıttığından verileri “total antioksidan aktivitenin” göstergesi olarak genellemek uygun olmayabilir ve yanıltıcıdır. Bu nedenle “aktivite” terimi yerine farklı deneylerde elde edilen sonuçları “kapasite” olarak sunmak önerilmektedir . Ya da “peroksil radikal süpürücü kapasite” , “süperoksit süpürücü kapasite” , “demir iyonu indirgeme kapasitesi” gibi ölçüm yöntemini daha spesifik olarak belirten terimlerin kullanılması da önerilmektedir (Koleva ve diğ. 2002).

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıfta toplanabilir:

- i) Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)
- ii) Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

HAT-esaslı analiz yöntemlerinin çoğunda yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir ve kantasyon kinetik eğrilerden türetilir . HAT- esaslı yöntemler genellikle bir sentetik serbest radikal oluşturucu, bir oksitlenebilen prob ve bir antioksidandan oluşur. ET esaslı yöntemler reaksiyon sonunun indikatörü olarak bir oksidan (aynı zamanda reaksiyonu takip etmek için prob olarak kullanılır) ile redoks reaksiyonunu içerir. Elektron transferine dayalı testler antioksidan ile oksidanın reaksiyonunda oksidanın indirgenmesi sonucu oluşan renk değişimi esasına dayanır. HAT ve ET esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür .

HAT reaksiyonuna dayanan analiz yöntemlerinin çoğu azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksil radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanır. HAT analiz yöntemleri:

- a) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu ,
- b) Oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC)
- c) Total radikal yakalama antioksidan kapasitesi (TRAP)
- d) Crocin bleaching deneyleri olarak sıralanabilir.

ET esaslı analiz yöntemleri, antioksidan maddenin indirgenmesinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır . Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan derişimi ile bağlantılandırılır. ET esaslı analiz yöntemleri:

- a) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik madde analizi
- b) Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) ölçümü
- c) Ferrik iyonu indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ölçümü
- d) Cu (II) kompleksini oksidan olarak kullanılan “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi
- e) DPPH kullanarak “toplam antioksidan potansiyel” ölçüm yöntemi
- f) CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi olarak sıralanabilir.

1.5.1 β -Karoten/ Linoleik Asit Yöntemi

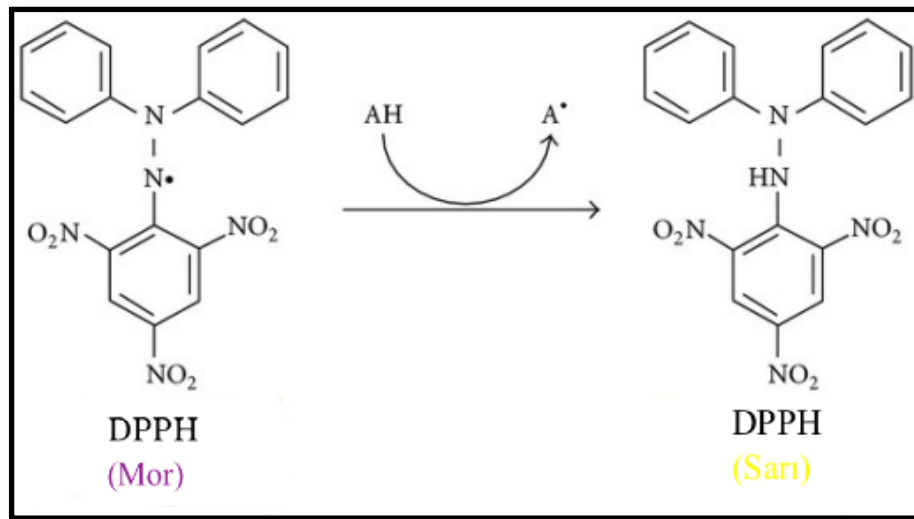
β -karoten/linoleik asit sistemi yüksek sıcaklıkta linoleik asitin oksidasyonu sırasında meydana gelen peroksit radikallerinin β -karoten molekülünde renk açılımına neden olması durumuna dayanır (Taga ve diğ. 1984). Ölçümler sonucunda linoleik

asidin oksidasyonunu inhibe etme oranının yüksek olması bu numunenin güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu gösterir. β -karoten/linoleik asit sistemi esas olarak hidrojen transferine dayanan antioksidan kapasite testlerinden biri olup çözücü ve pH'dan etkilenmeden oldukça kısa sürede gerçekleşmektedir (Apak ve diğ. 2007).

1.5.2 DPPH Süpürücü Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

Bu yöntem ilk kez Blois (1958) tarafından 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikallerinin (Şekil 6) antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır. Antioksidan aktivite ölçümlerinin yoğunlaştığı yıllarda Brand-Williams ve arkadaşları (Brand-Williams ve diğ. 1995) yöntemi geliştirmiş ve bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından referans olarak kullanılmıştır. Yöntemin esası DPPH içeren çözelti ile hidrojen atomu verme eğilimi olan bir molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması sonucu DPPH radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin kaybolmasına dayanır. Mor renkli çözeltinin 520 nm civarındaki absorbansının azalması ölçülerek reaksiyon takip edilir.

Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir. Antioksidan etkinliği araştırılmak istenen bitki ekstraktlarının DPPH radikalini temizleyici etkisi ve bu ekstraktların DPPH ile oluşturdukları rengin 517 nm' de ölçülmesine ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır (Blois 1958).



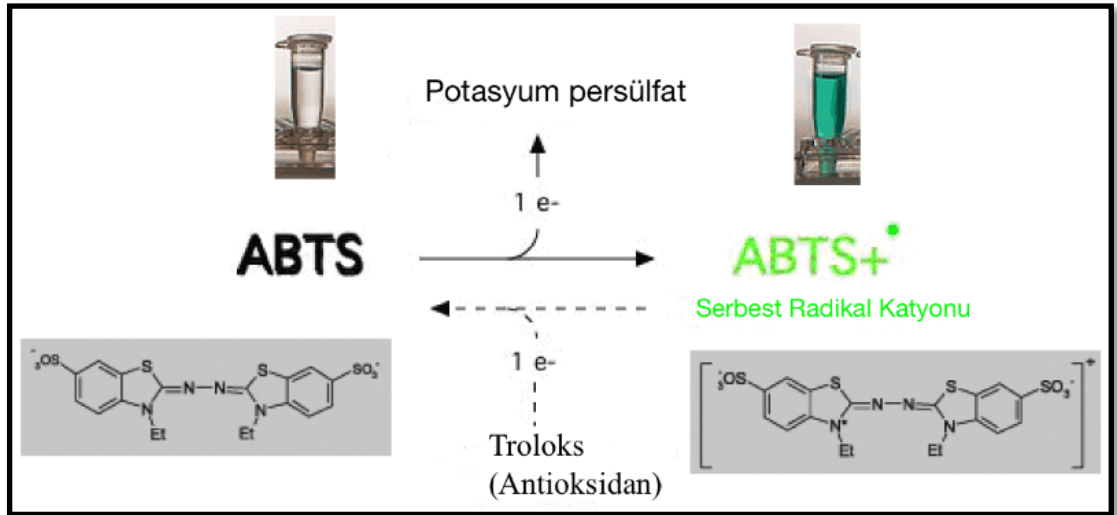
Şekil 6: DPPH' in antioksidan madde ile reaksiyonu

1.5.3 Demir İyonu İndirgeyeci Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi

Antioksidan kapasite tayininde kullanılan diğer bir metot olan indirgeme gücünde yüksek absorbans yüksek indirgeme potansiyelini göstermektedir . Metot, asidik ortamda antioksidan fenolik bileşiklerin $[K_3Fe(CN)_6]$ içindeki Fe (III)'ün Fe(II)'ye indirgenmesine dayanmaktadır. İndirgeme reaksiyonu sonucu oluşan Prusya mavisi renkli kompleks 700 nm'de maksimum absorbans göstermektedir . Antioksidan maddelerin etkinliğine bağlı olarak Prusya mavisi renk yeşil ile mavi arasında değişmektedir. Absorbansın artması indirgeme gücünün yüksekliğini gösterir (Mathew ve Abraham 2006).

1.5.4 ABTS Antioksidan Kapasite Yöntemi

Troloks eşiti antioksidan kapasite yöntemi ilk defa Miller ve arkadaşları tarafından raporlanmış (Miller ve diğ. 1993) olup sonrasında Re ve arkadaşları tarafından da geliştirilmiştir (Re ve diğ. 1999). TEAC analizi 2,2'-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorbansının engellenmesi temeline dayanır. TEAC' ın karakteristik dalga boyu 660, 734 ve 820 nm'de maksimum absorbasyon yapar (Prior ve diğ. 1999). Radikal katyon formunda üretilen ABTS, temel spektrofotometrik olarak çeşitli maddelerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmede uygulanır. Deneyle renksiz sıvı potasyum persülfid ile ABTS'nin oksidasyonu aracılığında ABTS'deki renk üretimini içermekte olup hem lipofilik bileşenlere hem de hidrofilik bileşenlere uygulanabilir ABTS çözeltisi seyreltilir ve yaklaşık 10 dakika içinde absorbansı ölçüldükten sonra 1 ml çözeltiler ile farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların ilk karışımı ölçülür. Trolox, vitamin E' nin suda çözünen analogu olup referans standart olarak kullanılır. Analiz geniş bir şekilde bitkilerin antioksidan özelliklerini tespit etmek için kullanılmaktadır (Ali ve diğ. 2008).



Şekil 7: ABTS' nin kimyasal reaksiyonu (Pannala ve diğ. 2001)

1.6 Sekonder Metabolit Miktar Tayini

1.6.1 Folin-Ciocalteu Ayıracı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi

Bu yöntem, antioksidanların toplam fenol miktarını ölçmek için Singleton ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Lussignoli ve diğ. 1999). Yöntemin esası fenolik bileşenler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyuma elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Mavi renkli karışımın oluşumu 750-765 nm' de spektrofotometrik olarak belirlenir (Albayrak 2010). Standart bileşik olarak genellikle gallik asit eşiti verilse de son zamanlarda yapılan çalışmalarda gallik asit yerine tannik asit, klorojenik asit, kafeik asit, protokateşik asit, vanilik asit ve ferrulik asit de kullanılmaktadır (Prior ve diğ. 2005).

1.6.2 Toplam Flavonoid Miktarı

Serbest radikal üreten enzimlerin inhibisyonu, serbest radikallerin süpürülmesi ve demir ve bakır iyonlarını şelatması gibi birçok farklı aktivitesinden dolayı flavonoidler antioksidan özellik göstermektedirler (Benavente ve Garcia 1997). Flavonoidler, antioksidan aktivitelerini değişik yollarla göstermektedir. Zincir kırıcı etkileriyle bazı radikal türlerini doğrudan yakalama özellikleri vardır. Bununla birlikte

α -tokoferol gibi; diğeri antioksidanlara hidrojen vererek onları yeniden aktif hale getirmekte ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunu önleyebilmektedir. Demir, bakır gibi bazı prooksidan metal iyonlarıyla kelat oluşturarak serbest radikal oluşumuna engel olabilmektedir. Flavonoidler, kanserin engellenmesinde antioksidan özellikleri dışında farklı şekillerde de etkili olabilmektedir. Bunlar arasında DNA'nın oksidatif zarardan korunması, mutajen genlerin oluşumunun engellenmesi, kanser oluşumunu teşvik eden enzimlerin ve karsinojenlerin aktivitesinin önlenmesi sayılabilmektedir (Kris-Etherton ve diğ. 2002). Antioksidan aktivitelerine ek olarak flavonoidler; prostaglandin sentaz, lipoksigenaz ve siklogenaz gibi enzimleri inhibe ederler ve glutathion-S-transferaz gibi detoksifiye edici enzimleri teşvik ederler (Lee ve diğ. 1995). Toplam flavonoid madde miktarı, flavon ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile alüminyum klorürün asit içinde kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanan, Alüminyum klorür ($AlCl_3$) kolorimetrik metodu kullanılarak tayin edilmektedir. Bu yöntemde eşdeğer olarak genellikle kuersetin standartı kullanılmaktadır (Chang ve diğ. 2002).

1.7 Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyaller, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan ilaçlardır. Ortak dezavantajları, yan etkilerinin olması ve mikroorganizmalarda direnç gelişimine neden olmalarıdır. Bu nedenle gerektiği durumlarda, etkene ve konağa ait faktörler dikkate alınarak seçilip kullanılmaları gerekir.

“Antibiyotikler”, bazı bakteri ve mantarlarca üretilen ve diğeri bakterilerin çoğalmasını engelleyen (bakteriyostatik) veya onları öldüren (bakterisidal) doğal maddelerdir. Penisilin, sefalosporinler ve makrolidler antibiyotiklere örnektir. Antibiyotiklerle aynı etkiyi gösteren, ancak sentetik olarak sentezlenen kimyasal bileşikler ise “kemoterapötik ajanlar” olarak adlandırılır. Sülfonamidler, kinolonlar, imidazoller bunlara örnektir. Bazı antibiyotikler veya türevleri kimyasal manüplasyonlarla sentezlenebilir (semi-sentetik antibiyotikler). Bu nedenle, bu terimler arasındaki sınır her zaman net olarak çizilemeyebilir. Bu makalede,

antibiyotik ve kemoterapötik terimlerinin ikisini de kapsamı nedeniyle “antimikrobiyal” terimi kullanılmıştır .

20. yüzyılın başlarına kadar mikroorganizmaları insan organizmasına zarar vermeden etkisiz hale getirmenin imkansız olduğu düşünölmekteydi. M.Ö 2500 yıllarında antimikrobiyal tedavi yöntemleri farkında olmadan kullanılmış ve bazı bitki kökleri, şarap ve küf gibi maddeler, enfeksiyon hastalıkları tedavisinde olumlu sonuçlar vermiştir. 17. yüzyılda Güney Amerika’da , insanlar Cinchora bitkisinin kabuğunu yiyerek sıtmadan korunmuşlar, ipeka bitkisinin kök ekstresini kullanarak amipli dizanteri hastalığını tedavi etmişlerdir. 19. Yüzyılın sonlarında Paul Ehrlich, bir arsenik bileşiği olan arsfenamin ile sifilizi, tripan kırmızısı boyası ile Afrika uyku hastalığını tedavi etmeyi başarmıştır. 1929 yılında S. Alexander Fleming tarafından bulunan ve bu yıllarda toksik etkileri nedeniyle kullanım alanına giremeyen penisilin 1940 yılında kullanılır hale Ernest Chain ve Howard Florey tarafından getirilmiştir . Son yıllarda antibakteriyel etki alanı daha genişlemiş ve toksik etkisi az olan , mikroorganizmaları öldürücü ya da mikroorganizmaların üremesini durdurucu etki gösteren birçok antibiyotik ve antibiyotiklerle benzer özelliklere sahip olup tümöyle sentetik olan (kimyasal yolla sentez edilen) kemoterapötik maddeler üretilmiştir .

Antimikrobiyal maddelerin etkisi mikroorganizmanın cins sayısının az ya da çok oluşuna bağlı olarak, dar ya da geniş spektrumlu olabilmektedirler. En dar spektrumlu maddeler enfeksiyona sebep olan mikroorganizma üzerinde etkili ve tedavide ideal antimikrobiyal maddeler olarak kabul edilmektedirler. Geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler konağın doğal bağışıklığında önemli rol oynayan ve ekolojik dengeyi sağlayan normal mikroorganizma florasını bozmaktadır. Fakat birçok patojenin birlikte etken olduğu enfeksiyonlarda ya da mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının beklenemeyeceği acil durumlarda geniş spektrumlu antimikrobiyal maddeler (kinonlar, karbapenemler vb.) kullanılmaktadır (Akyüz 2007, Burnaz 2007).

Antimikrobiyaller , etki mekanizmalarına göre beş sınıfta toplanırlar :

a) Hücre duvarı sentez inhibitörleri

- Beta laktamlar (penisilinler , sefalosporinler, mono- baktamlar, karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları)
 - Glikopeptitler (vankomisin, teikoplanin);
 - Diğerleri (fosfomisin, sikloserin, basitrasin, ristosetin, ramoplanin, mersasidin, moenomisin)
- b) Protein sentez inhibitörleri ;
- 50S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (makrolidler, ketolidler, linkozamidler, streptograminler, kloramfenikol, oksazolidinonlar);
 - 30S alt üniteye bağlanarak etkili olanlar (aminoglikozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler);
 - Diğerleri (mupirosin, nitrofurantoin)
- c) Nükleik asit sentez inhibitörleri (kinolonlar, rifamisinler, metronidazol)
- d) Antimetabolitler (trimetoprim-sülfametoksazol, para-amino salisilik asit)
- e) Membran bütünlüğünü bozanlar ;
- Peptid antibiyotikler (polipeptit antibiyotikler [basitrasin, gramisidin S, polimiksinler], lineer katyonik peptitler [defensinler, maganinler], ribozomal peptitler [lantibiyotikler], diğerleri [pirokorsin, drododoin, apiadesin]);
 - Siklik lipopeptitler (daptomisin).

Antimikrobiyal ilaçlara özellikle de antibiyotiklere karşı enfeksiyöz hastalıklara neden olan mikroorganizmaların direnç kazanması klinik bir problem haline geldikten sonra, insanlar yeniden doğal antimikrobiyallere yönelmişler ve bu konudaki çalışmalar hız kazanmıştır (Oskay ve diğ. 2007). Bilim insanları direnç geliştiren bakterilere karşı koyabilmek için alternatif antibiyotik ajan üretme çalışmalarını hızlı bir şekilde sürdürmektedirler . İn vitro koşullarda yapılmış pek çok çalışmada bitkilerden elde edilen özütlerin ve bu özütlerden saflaştırılan bileşiklerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği çok sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. (Sibanda ve Okoh 2007).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 MATERYAL

2.1.1 Bitki (*E. kotschyanum* Gay.) ve Toprak Materyalleri

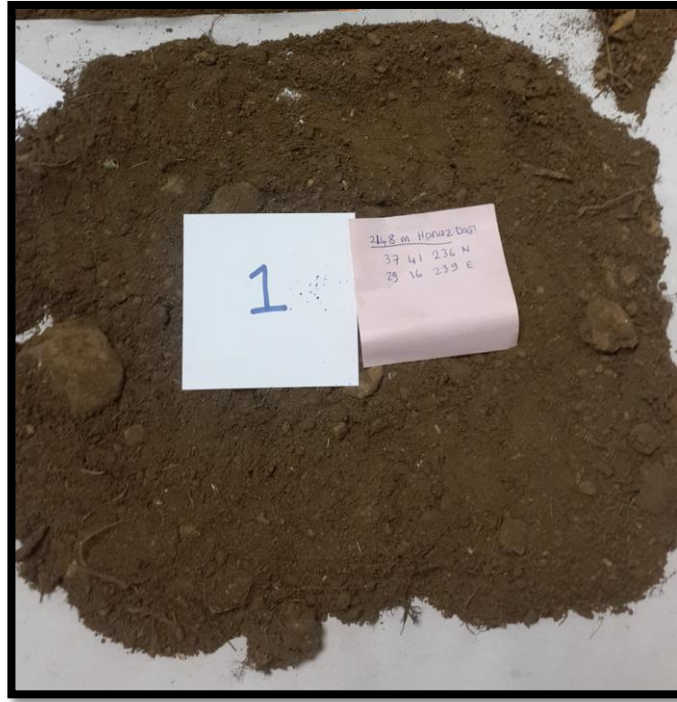
Arazi çalışmaları kapsamında tez çalışmalarında yer alan endemik *E. kotschyanum* türünün alternatif lokaliteleri ilgili kaynaklar (Davis 1984, Uysal 1999) taranarak tespit edilmiştir ve bu türlerin çiçeklenme dönemleri, yayılış gösterdikleri lokaliteler, habitatları ve yükseklikleri doğrultusunda bir arazi çalışma planı hazırlanmıştır. Bu arazi planı sayesinde örnekler doğru zaman ve lokalitelerden toplanmıştır. Türün yayılış alanlarının GPS (Global Positioning System) kaydı alınmıştır.

Toprak örneği alınırken zig-zag hattın köşelerindeki her noktadan V harfi şeklinde 30 cm derinliğindeki çukur açılır, daha sonra bu çukurun bir yüzeyi düzelterek bu yüzeyden 3-4 cm kalınlığında bir toprak dilimi alınmıştır. Alınan topraklar bir plastik kovada biriktirilmiştir (Kaçar 1972).

Toprak ve bitki örnekleri Denizli Honaz Dağı'ndan 2131 m (37° 41' 135"/ 29° 16' 233"), 2302 m (37° 40' 750"/ 29° 16' 761"), 2467 m (37° 40'559"/ 29° 17' 159") yüksekliklerden alınmıştır. Toplanan bitki örneklerinin teşhisi, Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Sistematik Botanik Laboratuvarında Prof.Dr. Olcay Düşen tarafından yapılmıştır.



Şekil 8: Bitki materyali *Erysimum kotschyanum* Gay.



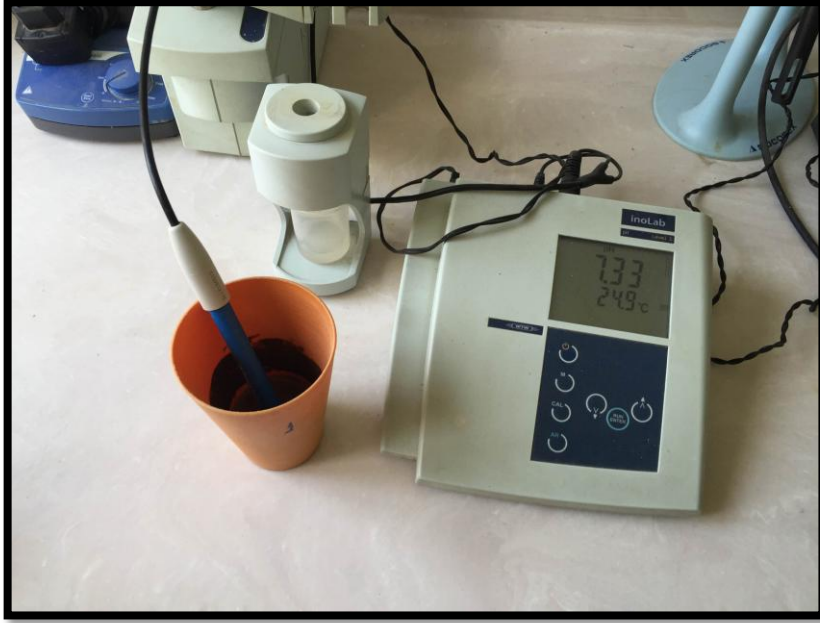
Şekil 9: Toprak materyali (Honaz Dağı)

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Toprak ve Bitki Örneklerinin Analizi

2.2.1.1 pH Tayini

Kurutulmuş, öğütülmüş ve 2 mm'lik elekten geçirilmiş toprak örneğinden 100 gr pH kabına koyulmuştur. Ölçü silindiri yardımıyla saf su azar azar dökülerek saturasyon macunu elde edilmiştir (parlak, kavi, akışkan). 2 saat beklendikten sonra pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra pH metrenin distu saturasyon macunu içine sokularak ölçüm yapılmıştır. Aynı zamanda saturasyon macununun ısısı ölçülmüştür (Kaçar 1972).



Şekil 10: Toprak örneğinin pH analizi

2.2.1.2 Tuzluluk Tayini

Kurutulmuş toprak örnekleri 2 mm' lik elekten geçirildikten sonra 100 gr pH kabına koyulmuştur. Ölçü silindiri yardımıyla saf su azar azar dökülerek saturasyon macunu elde edilmiştir (parlak, kavi, akışkan). 2 saat beklendikten sonra toprak örneğinin tuzluluk değeri ECM cihazı ile belirlenmiştir (Kaçar 1972).



Şekil 11: Toprak örneğinin tuz analizi

2.2.1.3 Kireç Tayini

Toprak örnekleri cam şişelerde 1 gr tartılmıştır. Scheible kalsimetresinde hacim ölçümü yapılmıştır. 100 ml teknik HCl-300 ml saf su karışımı (1/3 HCl karışımı) şişelerdeki toprak örnekleri üzerine dökülmüştür. Kalsimetrede eksilen KCl değeri ölçülmüştür (Kaçar 1972).

$$\%CaCO_3 = V \times (b-e) \times 273 / 760 \times (273+t) \times m$$



Şekil 12: Kalsimetre ile toprakların kireç analizi

2.2.1.4 Karbon, Nitrojen ve Sülfür (CNS) Tayini

CNS analizi, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarında Elementar Vario MICRO Cube Analiz cihazı kullanılarak, hizmet alımı kapsamında, tayin edilmiştir. Elementar Vario MICRO Cube Analiz cihazı, 1150°C' yi bulan sıcaklıkta, 1-10 mg olarak tartılan yaprak örneklerini yakma yoluyla C, H, N, S ve O element yüzdelerini yüksek hassasiyette tayin edebilmektedir (Bryant ve diğ. 1983).

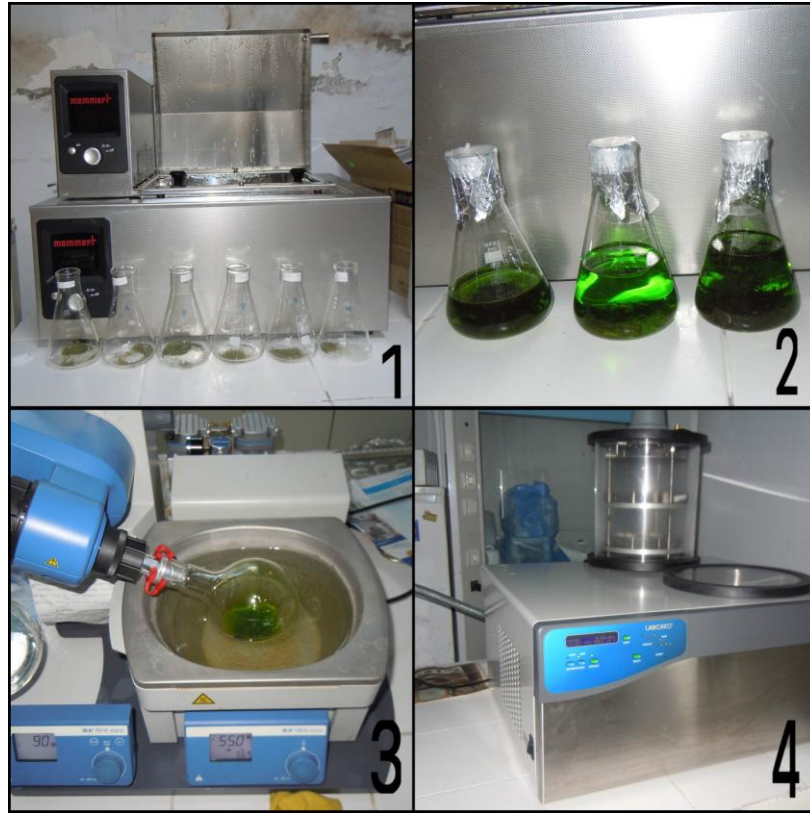
2.2.1.5 Bitki ve Toprak Örneklerinin Ağır Metal Analizi

Milestone Start D cihazında bitki/toprak numuneleri yakılır. Mikro dalga kaplarında, homojenize edilmiş numuneden 0.5 g alınıp, üzerine 9 ml 10 M HNO₃ ve 3 ml HCL eklenmiştir (EPA 3051A 1998). Yakma işlemine ait iki aşamalı sıcaklık programı şu şekildedir: ilk aşama, 15 dakika mikrodalga cihazının sıcaklığı 110 °C' ye çıkarılmıştır. İkinci aşamada 110 °C' lik sıcaklıkta 15 dakika beklenmiştir (Saltan ve diğ. 2015).

Bitki ve toprak örneklerinin ağır metal analizi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi' nde, ICPOES yöntemi kullanılarak, hizmet alımı kapsamında belirlenmiştir.

2.2.2 Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Çiçeklenme zamanında toplanan bitki örnekleri teşhis edildikten sonra gölgede kurutulmuştur. Kurutulan bitkiler blender yardımı ile parçalanmıştır. 10 gr kurutulmuş örnekler erlenlere aktarılıp üzerlerine 100 ml çözücü (etanol, aseton, su) eklenerek 6 saat boyunca 55 °C' ye ayarlanan çalkalamalı su banyosuna koyulmuştur. 6 saat sonunda su banyosundan çıkarılan örnekler Whatman no.1 filtre kağıdı kullanılarak amber şişelere süzölmüştür. Bu işlem, aynı prosedür izlenerek 2 kez tekrar edilmiştir. Süzölen çözeltilerden çözücüyü (etanol, aseton) uzaklaştırmak üzere 48°C, 70 rpm hıza ayarlanan rotary evaporator kullanılmıştır. Su ile hazırlanan ekstraktlar ve diğçer çözücülerle hazırlanan ekstraktların bünyesinde kalan su, liyofilizatör yardımı ile dondurularak kurutulmuştur. Elde edilen ekstraktlar -20°C' de muhafaza edilmiştir (Feresin ve diğç. 2000).



Şekil 13: Bitkilerin ekstraksiyon aşamaları

2.2.3 Biyolojik Aktivitelerin Belirlenmesi

2.2.3.1 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

2.2.3.1.1 β -Karoten/ Linoleik Asit Yöntemi

Bu metod linoleik asidin ısı ve hava oksidasyonu ile serbest radikal zincir reaksiyonu sonucu oluşan alkil peroksitler tarafından β -karotenin renk açılımının izlenmesi temeline dayanır. Reaksiyon mekanizması;

β -karoten stok çözeltisi, 2 mg β -karotenin 10 ml kloroformda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bu çözeltinin 1 mL, 40 mg linoleik asit ve 400 mg Tween 20 ilave edilmiştir. Kloroform rotary evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra 100 mL dH₂O ile karıştırılmıştır. Bu emülsiyonunun 4.8 mL 0.2 mg örnek içeren 0.2 mL ekstrakt çözeltileri bulunan test tüplerine ilave edilmiştir. Emülsiyon test tüplerine ilave edilir

edilmez spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japon) kullanılarak başlangıç absorbansları 470 nm' de ölçülmüştür. Tüpler 50°C'de inkübasyona bırakılmış ve β-Karotenin rengi kayboluncaya kadar inkübasyona devam edilmiştir (120 dakika). Bu test sisteminde BHA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deney üç tekrarlı yapılmıştır. Toplam antioksidan aktivite aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$AA: [1 - (A_0 - A_t / A_0^0 - A_t^0)] \times 100$$

Burada A_0 örneğin ilk absorbansı, A_t kontrolün ilk absorbansı, A_0^0 örneğin 120 dk sonraki absorbansı, A_t^0 kontrolün 120 dk sonraki absorbansıdır (Amin ve diğ. 2004). Bu test sisteminde standart olarak BHA ve BHT kullanılmıştır.

2.2.3.1.2 DPPH Serbest Radikal Giderim Kapasitesi

Ekstraktların serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir (Wu ve diğ. 2006). DPPH'm %0.004'lük (w/v) metanolik çözeltisinin 4 mL'si, ekstraktların 1 mL (0.2-1.0 mg)'si ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında , karanlık ortamda 30 dk. süresince inkübasyona bırakılmıştır . Bu süre sonunda örneklerin absorbansı 517 nm'de ölçülmüştür . Deney üç tekrarlı yapılmıştır.

Absorbans değerleri kullanılarak % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Elde edilen % inhibisyon değerleri, mg/mL olarak belirlenen ekstrakt derişimlerine karşı grafiğe geçirilmiş, buradan DPPH radikalinin yarısını süpürebilen konsantrasyon hesaplanmıştır (IC_{50}). IC_{50} değerinin düşük olması antioksidan kapasitenin yüksek olduğunu göstermektedir . Bu test sisteminde BHT standart olarak kullanılmıştır.

2.2.3.1.3 Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi

İndirgeme gücü kapasitesi Oyaizu (1986) tarafından belirlenen yöntemle göre tespit edilmiştir. Özütlelerin 2.5 ml'si (0.2–1.0 mg/ml) test tüplerine konularak her bir tüpe 2.5 ml 0.2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ve 2.5 ml % 1'lik potasyum ferrosiyaniür ilave edilmiştir. Karışım 50°C'de 20 dk. inkübe edilmiştir. Daha sonra tepkime karışımına 2.5 mL %10'luk triklorasetik asit ilave edilerek çözülden 2.5 mL alınmıştır. Örnek üzerine 2.5 mL dH₂O ve % 0,1'lik 0.5 mL FeCl₃ ilavesinden sonra 700 nm'de absorban değerleri belirlenmiştir. Kontrol olarak örnek yerine metanol kullanılmıştır. Bu test sisteminde BHT pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deney üç tekrarlı yapılmıştır.

2.2.3.1.4 ABTS Serbest Radikal Giderim Aktivite Yöntemi

ABTS•+ radikali, 7mM ABTS çözeltisi ve 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi arasındaki reaksiyonla oluşturuldu. 12 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Kullanmadan önce etanole (0.1M, pH=7.4), absorban 734 nm'de 0.7±0.025 olacak şekilde seyreltildi. 0.9 mL ABTS çözeltisi, 0.1 ml ve 0.2 ml ekstraktlara (100-200 µg/mL) eklendi. 15 dk sonra 734 nm'de absorban okundu (Ree ve diğ. 1999). Deney üç tekrarlı yapılmıştır. Aşağıdaki denkleme göre, % inhibisyon değerleri hesaplandı.

$$\text{ABTS radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ = Kontrol absorban değeri A₁ = Örnek veya standardın absorban değeri

2.2.3.2 Sekonder Metabolit Miktar Tayini

2.2.3.2.1 Folin-Ciocalteu Ayıracı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılarak gallik asite eşdeğer olarak (mgGAE/g) belirlenmiştir (Singleton ve diğ. 1999). 1 mg ekstrakt 1 mL metanolde çözülmüştür. 46 mL dH₂O ve 1 mL FCR ekstrakt ile karıştırıldıktan 3 dk. sonra %2'lik Na₂CO₃'dan 3 mL eklenmiştir. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakılıp periyodik aralıklarla çalkalanmıştır. Süre sonunda absorbans değerleri 760 nm'de tespit edilmiştir. Deney üç tekrarlı yapılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarları standart gallik asit elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir (Singleton ve diğ. 1999).

$$y = 1,158x - 0,0027 \quad (R^2 = 0,9959)$$

2.2.3.2 Toplam Flavonoid Madde Miktarı

Bitki ekstraktlarındaki toplam flavonoid madde miktarları, kuersetine eşdeğer olarak alüminyum kolorimetrik metodu kullanılarak belirlenmiştir (Arvouet-Grand ve diğ. 1994). Buna metoda göre %2'lik AlCl₃'ün metanolik çözeltisinden 1 ml alınarak aynı hacimde ve 2 mg/mL konsantrasyondaki bitki ekstraktı ile karıştırıldıktan sonra, 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyondan bırakılmıştır. Süre bitiminde 415 nm'de karışımın köre karşı absorbansı belirlenmiştir. Aynı işlemler standart flavonoid olan kuersetin için de yapılarak, ekstraktların toplam flavonoid madde içerikleri quercetine eşdeğer (mgQE/g) olarak verilmiştir. Deney üç tekrarlı yapılmıştır.

$$y = 0,0322(\text{mgQE/g})x - 0,005 \quad (R^2 = 0,997)$$

2.2.3.3 Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerini belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Daha önce hazırlanan bitki ekstraktları distile su içerisinde çözünerek %1 lik konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı (Erecevit 2007) ve bu çözeltiler Whatman no.10 geçirilerek steril edildi. Çözeltilerin 20µl lik miktarları 6 mm çaplı steril disklerle (Oxoid) emdirildi. Diskler 37 °C da kurutuldu ve kullanıldı. Bakterilerin katı besiyerlerinde (plak kültür) üretilmiş, 18-24 saatlik taze kültürlerinden öze ile alınan

koloniler serum fizyolojik içerisinde süspansiyon edildi ve McFarland 0.5 bulanıklık tüpleriyle kıyaslanarak 10^{-1} bakteri/mL lik dilüsyon hazırlandı ve inokulum olarak da bu sulandırım kullanıldı. Nutrient agar içeren petrilere yüzeyine eküvyon çubuğu kullanılarak ekim yapıldı. Daha sonra diskler petrilere uygun şekilde yerleştirildi. Bakteriler 37 °C da 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonlarının çapları milimetrik cetvelle ölçüldü (Sökmen ve diğ. 1999) Standart bakteri suşları olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach ATCC 12598 ; pozitif kontrol olarak ise amfisilin ve penisilin antibiyotikleri kullanılmıştır.

2.2.4 Brine- Shrimp Yöntemi ile Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

Brine Shrimp Letalite Testi (BSLT), bitki ekstraktlarının biyoaktivitesinin belirlenmesinde kullanılan basit, güvenilir ve uygun bir metottur (Meyer ve diğ. 1982). Ticari olarak satın alınan *A. salina* yumurtaları (Sera Artemia Mix, 18g, USA) 500 mL deniz suyunda, pH 7-8 ve sıcaklık 28°C olacak şekilde ışık altında inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra olgunlaşan larvalar pastör pipet yardımıyla toplanmış ve 4.5 mL deniz suyu içeren deney tüplerine 10'ar adet larva aktarılmıştır. Her bir tüpe 0.5 mL bitki ekstraktı da eklendikten sonra larvalar ışık altında ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda ölü larvalar tepegöz altında sayılıp, kaydedilmiştir (Krishnaraju ve diğ. 2005). Deney, dört farklı konsantrasyonda (100, 250, 500 ve 1000 mg/mL) ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Bitki ekstraktı olmayan (kontrol grubu) düzenekteki ölü larvalar ile deney grubundakiler karşılaştırılmıştır. Bütün uygulamalar için % ölüm oranları hesaplanmıştır, ayrıca LC₅₀ ve LC₉₀ değerlerinin tespit edilmesinde StatPlus Pro 5.9.8 versiyonu Analiz Programı kullanılmıştır.

2.2.5 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

HPLC teknikleri fenolik maddelerin ayrılması için en sık kullanılan metottur. Ters fazlı kolon kullanımı HPLC ile ayrılmayı daha duyarlı hale getirmiştir. Gıdalarda

bulunan fenolik maddeler genellikle UV görünür dalga boyunda UV -Vis dedektörleri ile ölçülmektedir (Naczka ve Shahidi 2004).

Polifenolik maddelerin tanımlanmasında kolonda alıkonulma süresi temel alınır. HPLC’de bileşiklerin kimyasal yapısı alıkonma süresi üzerine etkilidir, hidroksillenmiş ve glikozitlenmiş fenoliklerin alıkonma süreleri kısa iken, metillenmiş veya açillenmiş fenoliklerin alıkonma süreleri ise uzundur (Dao ve Takeoka 2002, Öztan 2006). Kromatografik süreç, kolona örneğin enjeksiyonu ile başlar. Bileşenlerin ayrılması analit ve hareketli fazın kolona pompalanmasıyla devam eder. Ayrılarak dilüe olan her bir bileşenin piki dedektörden gelen cevaba göre ‘kromatogram’ olarak kaydedilir. Fenolik bileşiklerin HPLC analizinde Caponio ve diğ.(1999) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Numune hazırlama işleminde ekstraktlardan 0.1 g alınıp 1 mL metanolde çözülmüştür. Gallik asit, protokateşuik asit, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinnamik asit, rutin, kuersetin ve kamferol standart olarak kullanılmıştır. Fenolik bileşiklerin tanımlanması ve kantitatif analizi standartlarla karşılaştırılarak yapılmıştır. Her bir fenolik bileşiğin miktarı mg/g olarak verilmiştir. HPLC analizi için Shimadzu Prominence cihazı kullanılmıştır. Mobil Faz: A: %3 Formik asit B: Metanol (HPLC analizinde Gomes ve diğ. (1999)’nun metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. 0.2 g numune tartılmış, Mobil fazda çözülmüş, 0.45 µm filtreden geçirilip HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Toprak Analizi

Honaz Dağı' nın üç farklı yüksekliğinden alınan toprak örnekleri kurutulup, elekten geçirildikten sonra tuz miktarı, pH değeri ve kireç miktarları analiz edilmiştir. Toprak örneklerine ait bu veriler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Toprak numunelerinin tuz, pH ve kireç analizleri

Yükseklik	Lokalite (GPS)	Toprak Yapısı	Toplam Tuz Miktarı ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH	CaCO ₃ (%)
2131 m	37° 41' 135" 29° 16' 233"	humuslu	427	7.33	1.26
2302 m	37° 40' 750" 29° 16' 761"	çok humuslu	386	7.47	3.07
2467 m	37° 40' 559" 29° 17' 159"	çok humuslu	217	5.87	0.47

Tablo 2' de verilen toprak analizi sonuçlarına göre *E. kotschyanum*' un yüksek rakımlarda, kireçsiz, tuzsuz ve hafif alkali toprakları tercih ettiği görülmektedir.

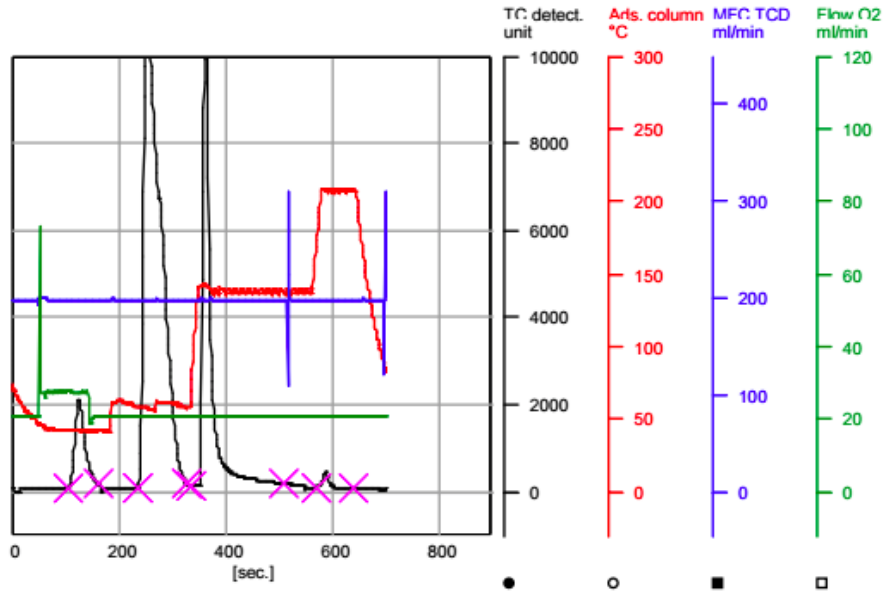
3.2 CNS Tayinine Ait Sonuçlar

Yaprak ve toprak örnekleri 1-10 gr tartılarak yakma yoluyla hesaplanan C, N, H, S element yüzdeleri Tablo 3' de gösterilmiştir. Şekil 14 ve Şekil 15' de ise veriler diyagram şeklinde gösterilmiştir. C:N oranı, toprağın verimliliği ve bitkinin sekonder metabolit içeriği ile alakalıdır.

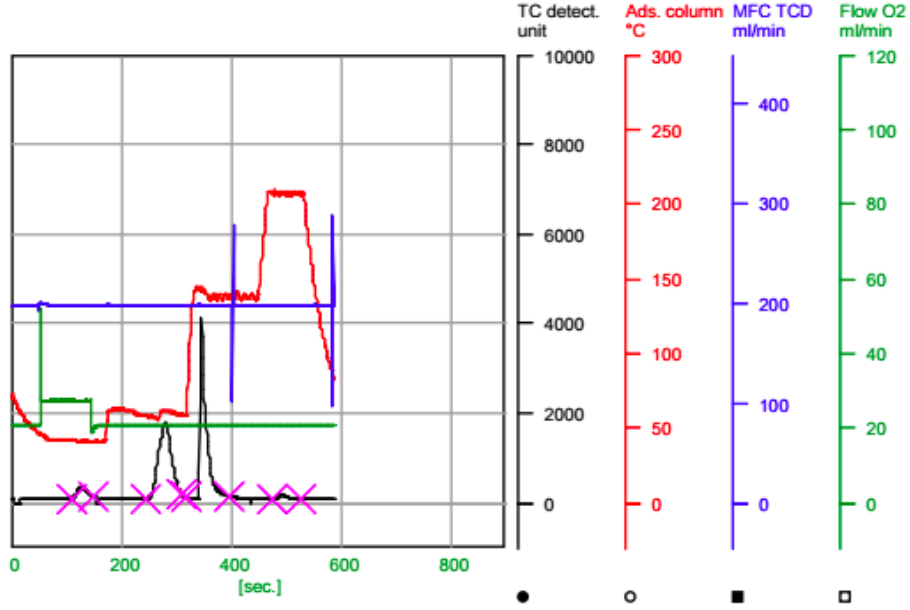
Tablo 3: Yaprak ve toprak örneklerinin CNS analizi

Numune	Genişlik (mg)	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)	N Bölge	C Bölge	H Bölge	S Bölge
Yaprak	45.100	3.00	39.16	5.517	1.026	4.430	40.791	19.229	436
Toprak	50.690	0.33	-	1.315	0.000	542	4 767	4 950	129

Yaprak ve toprak örneklerinin karbon, nitrojen, sülfür içeriklerinin gösterildiği Tablo 3, Şekil 14 ve Şekil 15’de, yapraktaki C oranının yüksek olduğu görülmektedir. C:N oranı ise 13.05 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 14: Yaprak örneklerinin CNS diyagramı



Şekil 15: Toprak örneğinin CNS diyagramı

3.3 Bitki ve Toprak Örneklerinin Ağır Metal Analizine Ait Sonuçlar

Honaz Dağı' nın üç farklı yüksekliğinden alınan toprak ve yaprak örnekleri ağır metal içerikleri bakımından araştırılmıştır. Toprak ve yaprak örneklerinin ağır metal içerikleriyle alakalı elde edilen verilen Tablo 4 ve Tablo 5' de gösterilmiştir.

Tablo 4: Toprak örneklerinin ağır metal içerikleri

Yüksekliklere Göre Toprak Numuneleri	Cr (µg/g)	Cd (µg/g)	Ni (µg/g)	Co (µg/g)	Fe (µg/g)	Cu (µg/g)	Pb (µg/g)
1.Toprak Numune (2131m)	104.11	-	226.11	-	4502.22	48.56	3.75
2.Toprak Numune (2302m)	106.11	-	235.19	-	3667.59	70.51	4.7
3.Toprak Numune (2467m)	193.9	-	13.8	-	24970	21.77	-

Tablo 4'de görüldüğü gibi üç farklı yükseklikten alınan toprak örneklerimizde en fazla miktarda Fe metali (24970 µg/g) bulunurken; Cd, Co metallerine rastlanılmamıştır.

Tablo 5: Yaprak örneklerinin ağır metal içerikleri

Yüksekliklere Yaprak Numuneleri	Göre Cr ($\mu\text{g/g}$)	Cd ($\mu\text{g/g}$)	Ni ($\mu\text{g/g}$)	Co ($\mu\text{g/g}$)	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)	Pb ($\mu\text{g/g}$)
1. Yaprak Numune (2131m)	<LOD	-	2.71	-	568.96	2.59	-
2. Yaprak Numune (2302m)	4.44	-	6.9	-	1291	5.47	-
3. Yaprak Numune (2467m)	10.68	-	6.6	-	2603	5.2	-

Tablo 5' e göre üç farklı yükseklikten alınan yaprak örneklerimizde en fazla miktarda Fe metali (2603 $\mu\text{g/g}$) bulunurken; Cd, Co ve Pb metallerine rastlanılmamıştır.

3.4 Antioksidan Aktivite Yöntemlerine Ait Sonuçlar

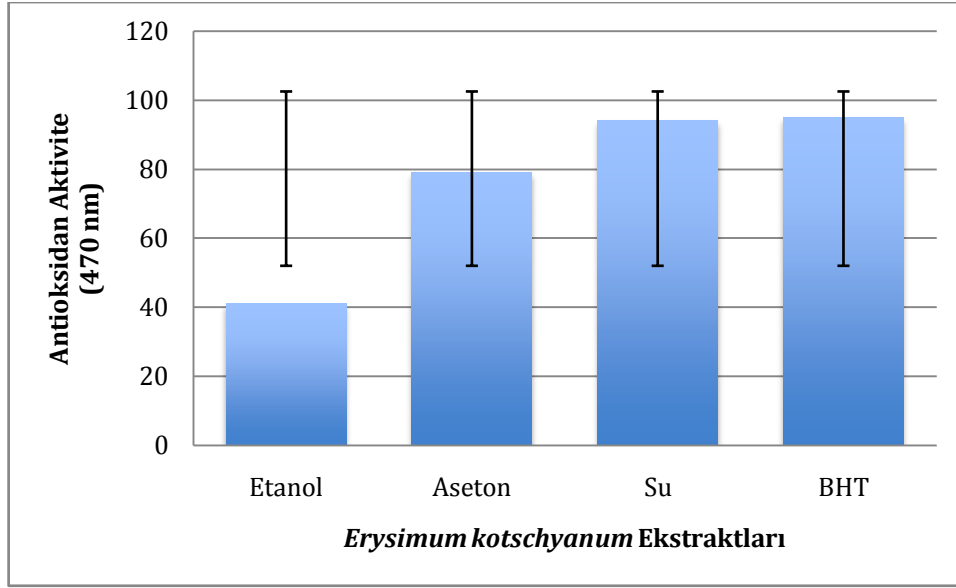
3.4.1 β -Karoten/ Linoleik Asit Yönteminin Sonuçları

Etanol, aseton ve su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri β -Karoten/ Linoleik Asit Yöntemi ile belirlenmiştir. Tablo 6 ve Şekil 16' da ekstraktların ve standart olarak kullanılan BHT' nin inhibisyon yüzdeleri \pm std sapma verilmiştir.

Tablo 6: *Erysimum kotschyanum* ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri

<i>E. kotschyanum</i> Bitki Ekstraktları	AA (%)
su	80.47 \pm 1.83
aseton	70.33 \pm 0.61
etanol	50.86 \pm 0.58

Yukarıdaki Tablo 6 incelendiğinde en yüksek antioksidan aktivite *E. kotschyanum*' un su ekstraktlarında (%80.47 \pm 1.83), en düşük antioksidan aktivite ise *E. kotschyanum* etanol ekstraktlarında (% 50.86 \pm 0.58) görülmüştür.



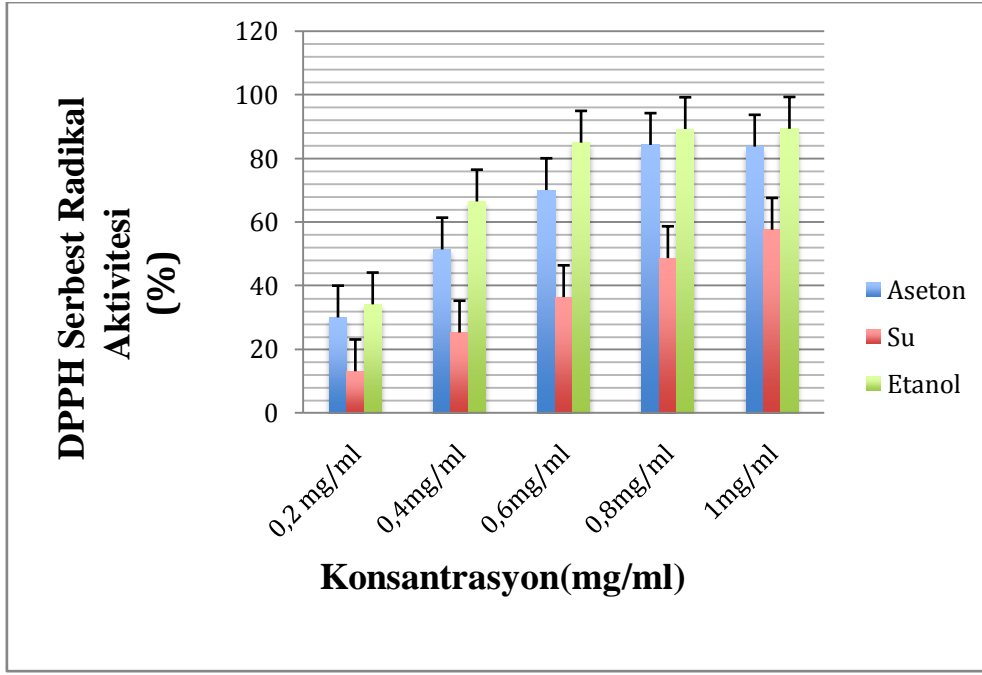
Şekil 16: *Erysimum kotschyannum* ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri (%)

3.4.2 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesine Ait Sonuçları

Erysimum kotschyannum ekstraktlarının DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri, beş farklı konsantrasyonda belirlenmiştir. Ekstraktların konsantrasyonlara göre inhibisyon değerleri±std sapma Tablo 7 ve Şekil 17' de gösterilmiştir.

Tablo 7: *Erysimum kotschyannum* ekstraktlarının DPPH serbest radikalini giderim aktivitesi

Çözücüler	0.2 mg/ml	0.4mg/ml	0.6mg/ml	0.8mg/ml	1mg/ml
Aseton	30.06±1.66	51.44±3.71	70.11±0.049	84.31±0.090	83.78±0.04
Su	13.14±2.80	25.32±2.21	36.45±1.03	48.72±6.74	57.66±8.20
Etanol	34.18±2.31	66.52±3.31	85.01±1.15	89.3±1.06	89.39±0.61



Şekil 17: *Erysimum kotschyanum* ekstraktlarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesi

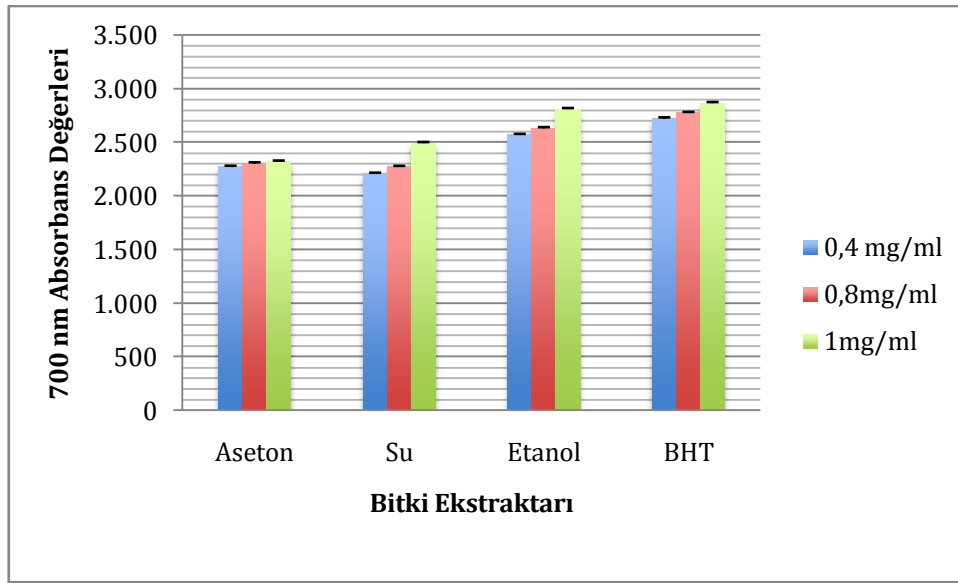
Tablo 7 ve Şekil 17 incelendiğinde, konsantrasyonun artmasıyla DPPH radikali giderim aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. En yüksek serbest radikal giderim aktivitesi etanol ekstraktının 1mg/ml (%89.39±0.61) derişiminde gözlenmiştir. En az aktivite ise su ekstraktlarının derişimlerinde tespit edilmiştir.

3.4.3 FRAP İndirgeme Gücü Kapasitesine Ait Sonuçlar

Farklı çözücülerle hazırlana bitki ekstraktlarının demir indirgeme gücü kapasitesi belirlenmiştir. Tablo 8 ve Şekil 18 den bitki ekstraktlarının ve BHT standardının 700 nm’deki absorbans değerleri verilirken, Tablo 9’da ise ekstraktların troloksa eşdeğer olarak hesaplanan FRAP değerleri gösterilmiştir. Absorbansın artması indirgeme gücünün yüksekliğini gösterir.

Tablo 8: Bitki ekstraktlarının 700 nm'deki absorbans değerleri

BİTKİ EKSTRAKTLARI	ABSORBANS DEĞERLERİ		
	0.4 mg/ml	0.8mg/ml	1mg/ml
Aseton	2.274	2.306	2.322
Su	2.209	2.273	2.495
Etanol	2.571	2.634	2.812
BHT	2.725	2.776	2.868



Şekil 18: Bitki ekstraktlarının konsantrasyonlara göre absorbans değerleri

Tablo 8 ve Şekil 18’ de bitki ekstraktlarının 700 nm’deki absorbans değerlerine bakıldığında en yüksek absorbans değerleri sırasıyla etanol, su ve aseton ekstraktlarında saptanmıştır. Konsantrasyon arttıkça absorbans değerlerinin de arttığı görülmektedir. Tablo 9’da ise ekstraktların troloksa eşdeğer olarak hesaplanan FRAP değerleri gösterilmiştir. En yüksek absorbans ve FRAP değerleri bitkinin etanol ekstraktlarında gözlemlenmiştir. Tablo 9’a bakıldığında, etanol ekstraktının 1 mg/ml derişimindeki FRAP değerinin standart olarak kullanılan BHT’ nin FRAP değerine yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 9: Bitki ekstraktlarının Troloksa eşdeğer FRAP değerleri

BİTKİ EKSTRAKTLARI	KONSANTRASYONLAR		
	0.4 mg/ml	0.8mg/ml	1mg/ml
Aseton	0.01373±0.000	0.01393±0.002	0.01402±0.001
Su	0.01334±0.001	0.01373±0.000	0.01508±0.001
Etanol	0.01554±0.000	0.01592±0.001	0.01701±0.001
BHT	0.01648±0.000	0.01679±0.000	0.01735±0.000

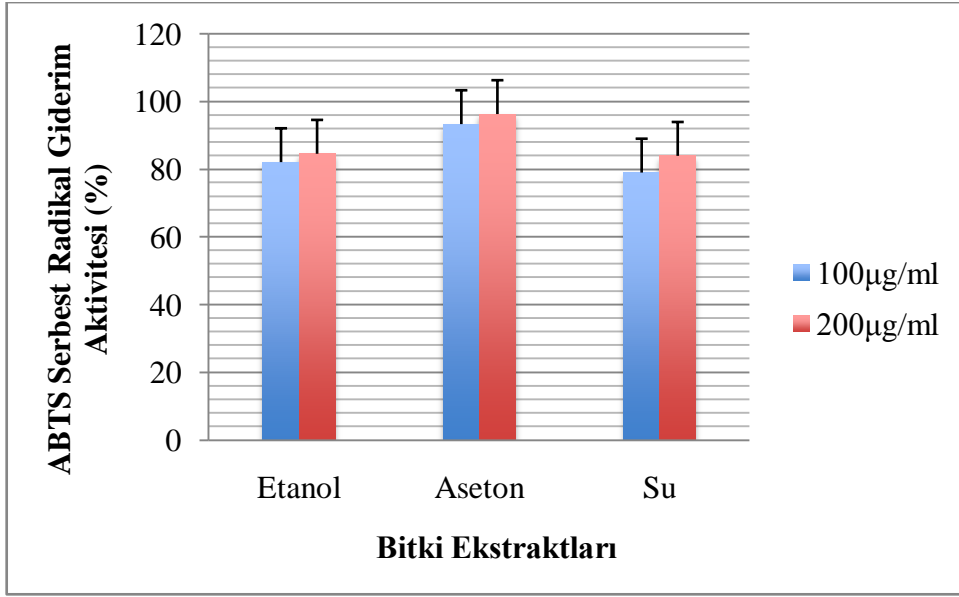
3.4.4 ABTS Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları

Etanol, aseton ve sui le hazırlanan üç farklı bitki ekstraktlarımızın iki farklı konsantrasyondaki ABTS serbest radikalini giderim aktiviteleri incelenmiştir. Tablo 10'da ve Şekil 19'da ekstraktların yüzde ABTS serbest radikal giderim aktiviteleri±std sapma verileri gösterilmiştir.

Tablo 10: Bitki ekstraktlarının ABTS serbest radikalini giderim aktiviteleri

Bitki Ekstraktları	Konsantrasyonlar	
	100µg/ml	200µg/ml
Etanol	82.1±0.10	84.57±0.39
Aseton	93.33±0.64	96.3±0.12
Su	79.02±0.49	83.96±1.08

İki farklı konsantrasyondaki bitki ekstraktlarının yüzde ABTS radikali giderim aktivitelerinin verildiği Tablo 10'da, bitki ekstraktının konsantrasyonunun artmasıyla serbest radikal giderim aktivitesinin de arttığı görülmektedir. En yüksek ABTS radikali giderim aktivitesi aseton ekstraktlarının 200µg/ml derişiminde (%96.3±0.12) saptanmıştır. Aseton ekstraktlarını takiben, etanol ekstraktının 200µg/ml derişimindeki serbest radikal giderim aktivitesi % 84.57±0.39, su ekstraktının aynı derişimdeki serbest radikal giderim aktivitesi %83.96±1.08 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 19: Bitki ekstraktlarının ABTS serbest radikalini giderim aktiviteleri

3.5 Sekonder Metabolit Miktar Tayini Sonuçları

Bitki ekstraktlarımızın sekonder metabolit tayininde toplam fenolik bileşen ve toplam flavonoid madde miktarlarına bakılmıştır.

3.5.1 Folin- ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Madde Miktarı Sonuçları

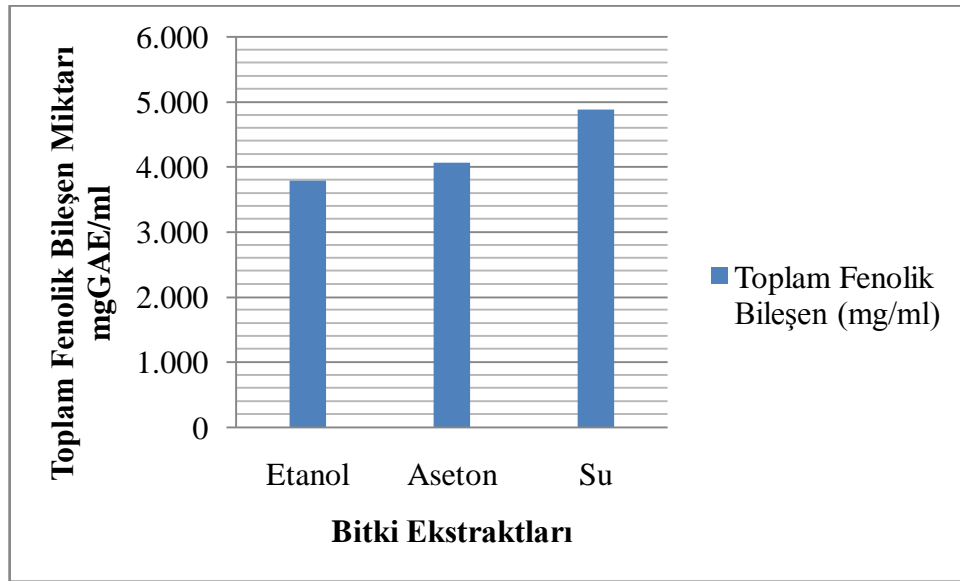
Farklı çözücülerle (etanol, aseton, su) hazırlanan bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Elde edilen Tablo 11' de ve Şekil 20'de gösterildiği gibidir.

Tablo 11: Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları

Bitki Ekstraktları	Toplam Fenolik Bileşen (mg/ml)
Etanol	3.798±0.29
Aseton	4.069±0.28
Su	4.883±0.47

Tablo 11'de gösterildiği gibi gallik asite eşdeğer olarak hesaplanan toplam fenolik bileşen içerikleri sırasıyla en fazla su ekstraktlarında 4.883±0.47, aseton ekstraktlarında 4.069±0.28 ve etanol ekstraktlarında 3.798±0.29 olarak tespit

edilmiştir. Şekil 20’ de toplam fenolik madde miktarlarının etanol, aseton ve su ekstraktlarına göre artışı gösterilmiştir.



Şekil 20: Bitki ekstraktlarının toplam fenolik bileşen miktarları

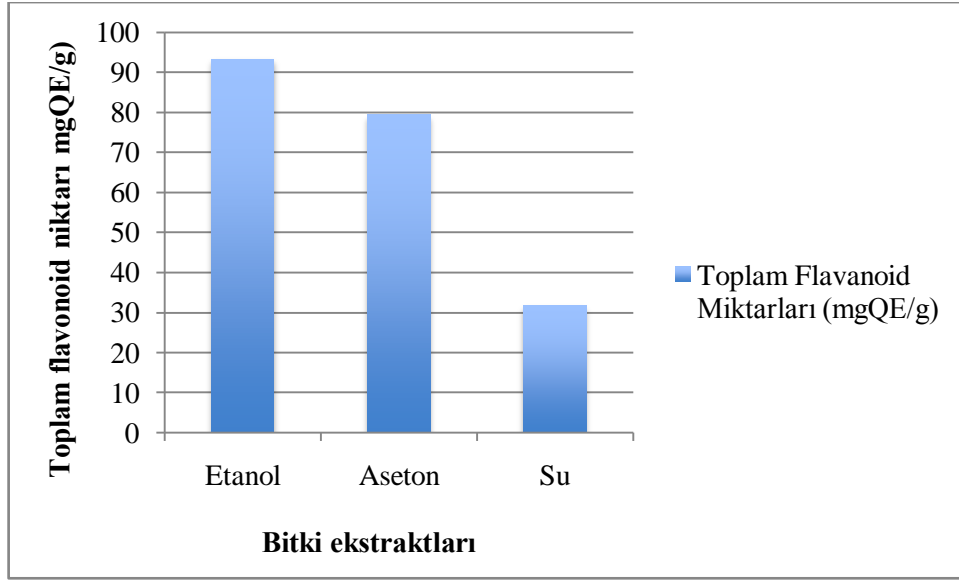
3.5.2 Total Flavonoid Miktarı Sonuçları

Farklı çözücülerde (etanol, aseton, su) hazırlanan bitki ekstraktlarının toplam flavonoşd madde miktarları kuersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ve standart sapmaları Tablo 12’de ve Şekil 21’ de belirtilmiştir.

Tablo 12: Bitki ekstraktlarının total flavonoid miktarları

Bitki Ekstraktları	Toplam Flavonoid Miktarları (mgQE/g)
Etanol	93.322±1.57
Aseton	79.37±0.23
Su	31.73±0.90

Tablo 12’ye göre bitki ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları en yüksek oranda etanol (93.322±1.57), daha sonra aseton (79.37±0.23) ve su ekstraktlarında (31.73±0.90) olarak saptanmıştır. Şekil 21’de ekstraktların toplam flavonoid madde miktarlarının çözücülerine göre değiştiği görülmektedir.



Şekil 21: Bitki ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları

3.6 Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

Etanol, aseton ve su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesini araştırmak üzere iki gram negatif ve bir gram pozitif bakteri seçilerek üç bakteri suşu (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*) kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarımızla 24 saat inkübasyona bırakılan bakteri suşlarında oluşan zonlar, süre bitiminde ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar ve standart sapmaları Tablo 13’de gösterilmiştir.

Tablo 13: Bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi

Bakteriler	Antibiyotikler ve Bitki Ekstraktları				
	A	P	BS	BE	BA
<i>E. coli</i>	18	NT	7 ±2	4 ±2	9 ±1
<i>S. aureus</i>	nt	nt	5 ±2	10 ±0	6 ±0
<i>P. aeruginosa</i>	nt	nt	6 ±2	11 ±1	3 ±1

Bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi incelendiğinde en etkili olan ekstraktın 11 ±1 mm zon çapı ile *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı *E. kotschyannum* türünün etanol ekstraktlarında tespit edilmiştir. Etanol ekstraktının en düşük antibakteriyel etkisi ise *E. coli* bakterisine karşı 4 ±2 mm zon çapında görülmüştür. Aseton ekstraktının en yüksek etkisi 9 ±1 zon çapı ile *E. coli* ye karşı, en düşük etki 3 ±1 zon çapıyla *P. aeruginosa*’ya karşı tespit edilmiştir. Su ekstraktı

7±2 zon çapı ile *E.coli* de en çok etkiyi; 5 ±2 zon çapı ile *S. aureus* da en az etkiyi göstermiştir.

3.7 Brine Shrimp Sitotoksosite Aktivite Yöntemi

Bitkinin dört farklı konsantrasyonda hazırlanan etanol ve su ekstraktlarının sitotoksik aktivitesi, *Artemia salina* larvalarının kullanıldığı Brine Shrimp Letalite (BSLT) ile belirlenmiştir. Deney sonucunda elde edilen % ölüm oranları Tablo 14’de belirtildiği gibidir.

Tablo 14: Bitki ekstraktlarının Brine Shrimp sitotoksosite sonuçları

	KONSANTRASYONLAR	ETANOL EKSTRAKTI	SU EKSTRAKTI
YÜZDE ÖLÜMLER (%)	100 µg/mL	16.6±0.57	10±0
	250 µg/mL	20±1	33.3±0.57
	500 µg/mL	43.3±0.57	76.6±0.57
	1000 µg/mL	56.6±0.57	86.6±0.57
LC50 ve LC90 DEĞERLERİ	LC ₅₀ MIN	389.53	197.01
	LC ₅₀	724.84	315.48
	LC ₅₀ MAX	9651.43	481.05
	LC ₉₀	4602.77	896.35

Tablo 14 incelendiğinde konsantrasyonun artmasıyla % ölüm oranlarının arttığı gözlemlenmiştir. en fazla ölüm oranının su ekstraktının 1000 µg/mL derişiminde %86.6 olarak hesaplanmıştır. Etanol ve su ile hazırlanan bitki ekstraktlarımızın sitotoksosite sonuçlarında en az LC₅₀ değeri dolayısıyla en yüksek sitotoksik etki su ekstraktında tespit edilmiştir.

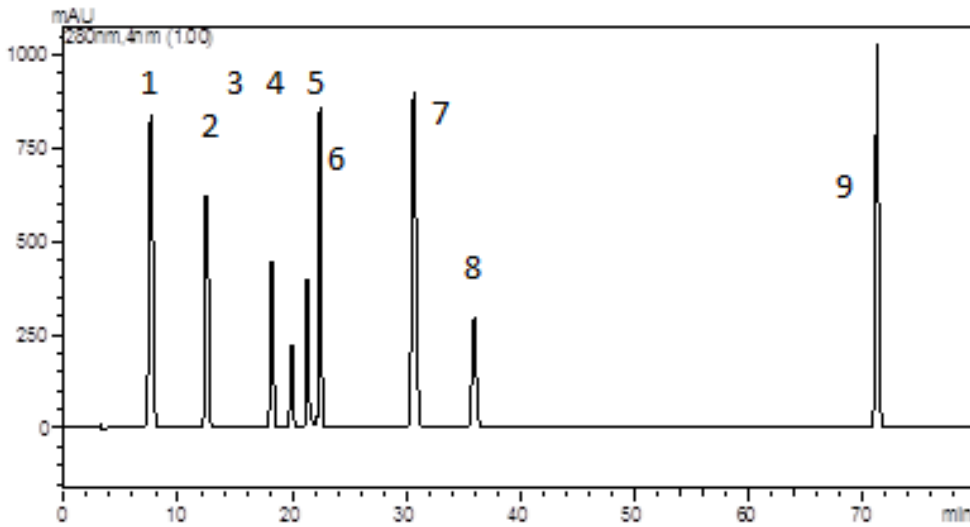
3.8 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Bitkimizin etanollü ekstraktlarının bazı fenolik bileşen içerikleri YPSK yöntemi belirlenmiştir. Fenolik bileşen içeriklerin belirlenmesinde gallik asit, 3,4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, vanilik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve sinnamik asit olmak üzere dokuz farklı standart madde kullanılmıştır. Fenolik bileşen içeriklerine ait elde edilen veriler Tablo 15’de gösterilmiştir.

Tablo 15: Bitkinin etanol ekstraktlarının bazı fenolik bileşen içerikleri

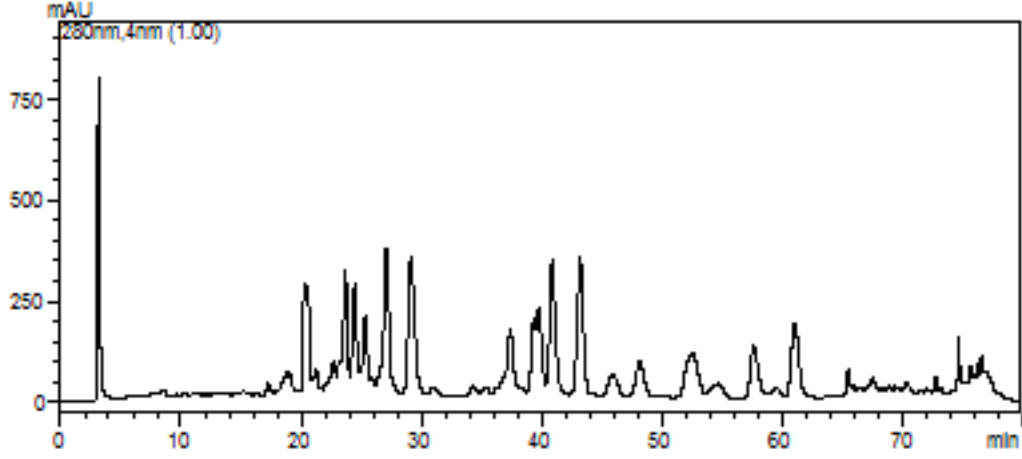
Numune Adı	Gallik asit (µg/g)	3,4dihidroksi roksi (µg/g)	4-hidroksi benzoik asit (µg/g)	Klorojenik asit(µg/g)	Vanilik asit(µg/g)	Kafeik asit (µg/g)	p-Kumarik asit (µg/g)	Ferulik asit(µg/g)	Sinamik asit (µg/g)
<i>E. kotschyana</i>	52.97	18.05	113.67	233.29	753.21	91.83	47.20	26.71	23.87

Yukarıdaki tabloya bakıldığında, etanol ekstraktında en yüksek fenolik bileşen içerikleri sırasıyla vanilik asit (753.21 µg/g), klorojenik asit (233.29), 4-hidroksibenzoik asit (113.67), kafeik asit (91.83), gallik asit (52.97), p-kumarik asit (47.20), ferulik asit (26.71), sinamik asit (23.87) ve en düşük fenolik bileşen içeriği olarak 3,4 hidroksibenzoik asit (18.05 µg/g) gözlenmiştir. Şekil 22’ de standartların kromatogramı ve Şekil 23’de bitkimizin etanol ekstraktının kromatogramı gösterilmiştir. Bu kromatogramlarda standart madde ve etanol ekstraktlarının dalga boyları ve alıkonma süreleri belirtilmiştir. Şekil 24’ de gallik asitin, Şekil 25’de 3,4-hidroksibenzoik asitin, Şekil 26’da 4-hidroksibenzoik asitin, Şekil 27’da klorojenik asitin, Şekil 28’de vanilik asitin, Şekil 29’da kafeik asitin, Şekil 30’da p-kumarik asitin, Şekil 31’de ferulik asitin ve Şekil 32’ de sinamik asitin kalibrasyon eğrileri verilmiştir.

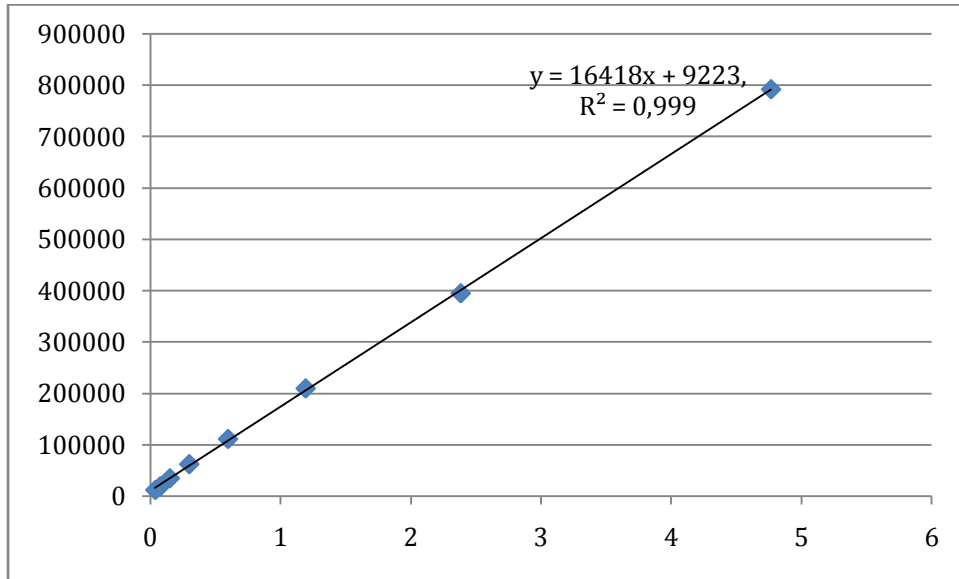


Şekil 22: YPSK'da bitkinin etanol ekstraktları için kullanılan standart kromatogramı

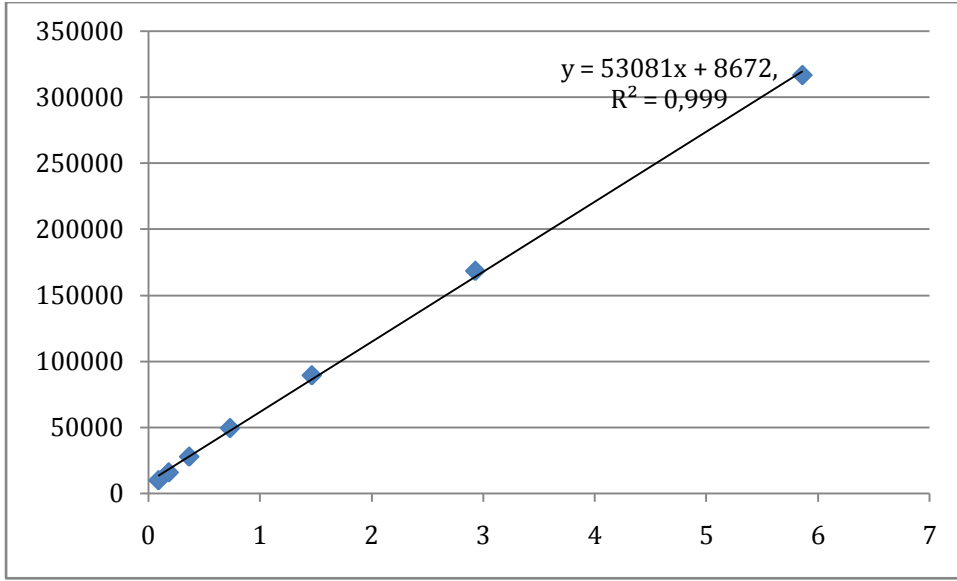
Şekil 22’de numaralandırılan standartlar şu şekildedir: ¹gallik asit, ²3,4 dihidroksi benzoik asit; ³4-hidroksibenzoik asit; ⁴klorojenik asit; ⁵vanilik asit; ⁶kafeik asit; ⁷p-Kumarik asit; ferulik asit; ⁸sinamik asit.



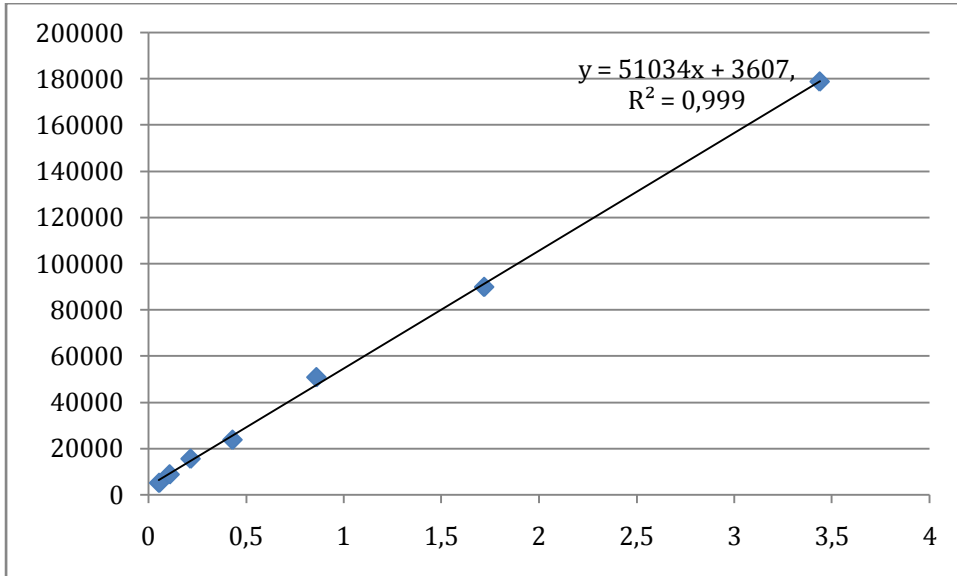
Şekil 23: Bitkinin etanol ekstraktlarının YPSK kromatogramı



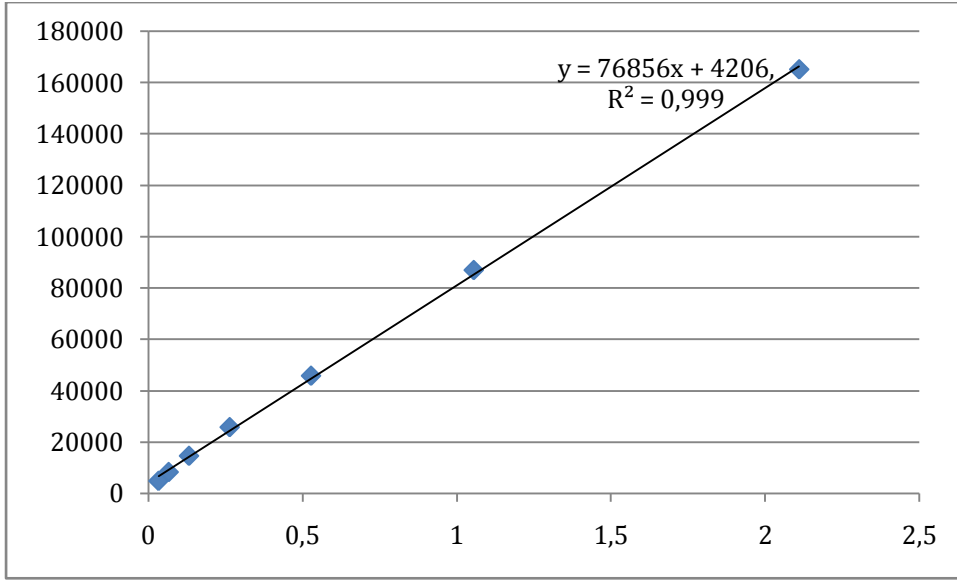
Şekil 24: Gallik asit kalibrasyon grafiği



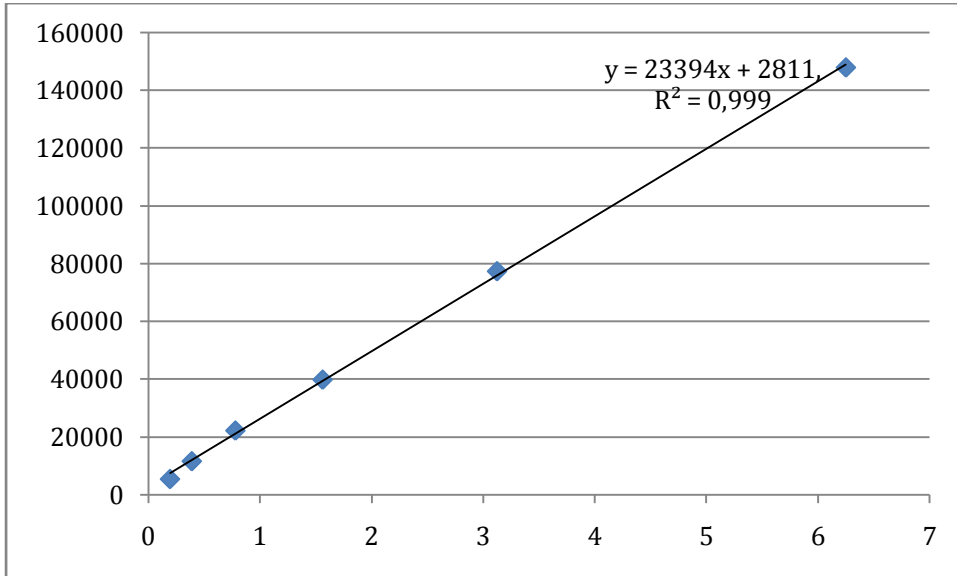
Şekil 25: 3,4-dihidroksibenzoik asit kalibrasyon grafiği



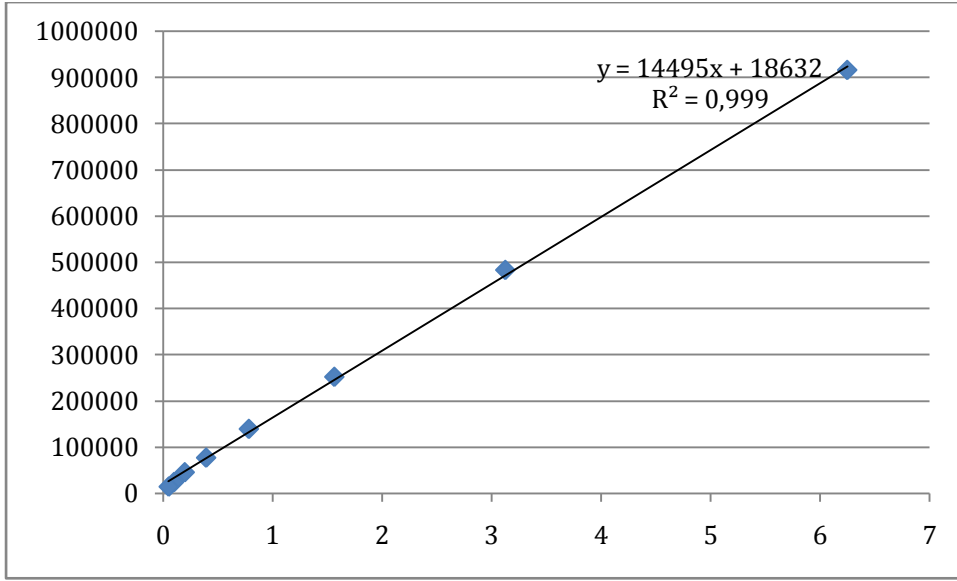
Şekil 26: 4-hidroksibenzoik asit kalibrasyon grafiği



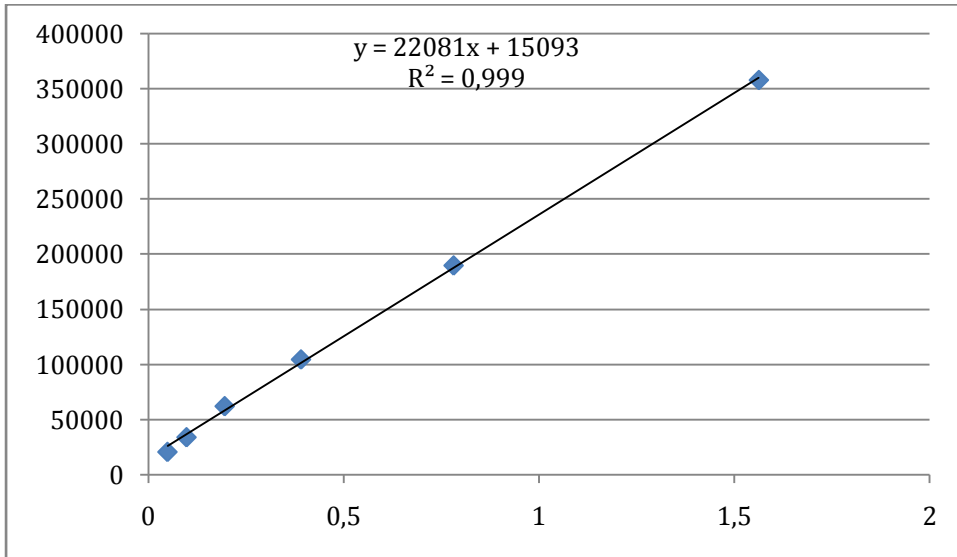
Şekil 27: Klorojenik asit kalibrasyon grafiği



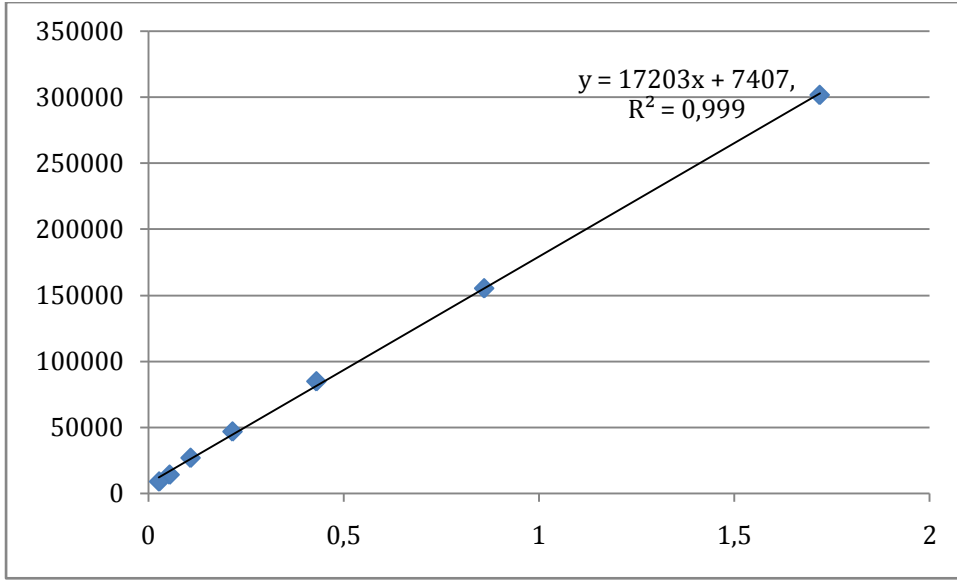
Şekil 28: Vanilik asit kalibrasyon grafiği



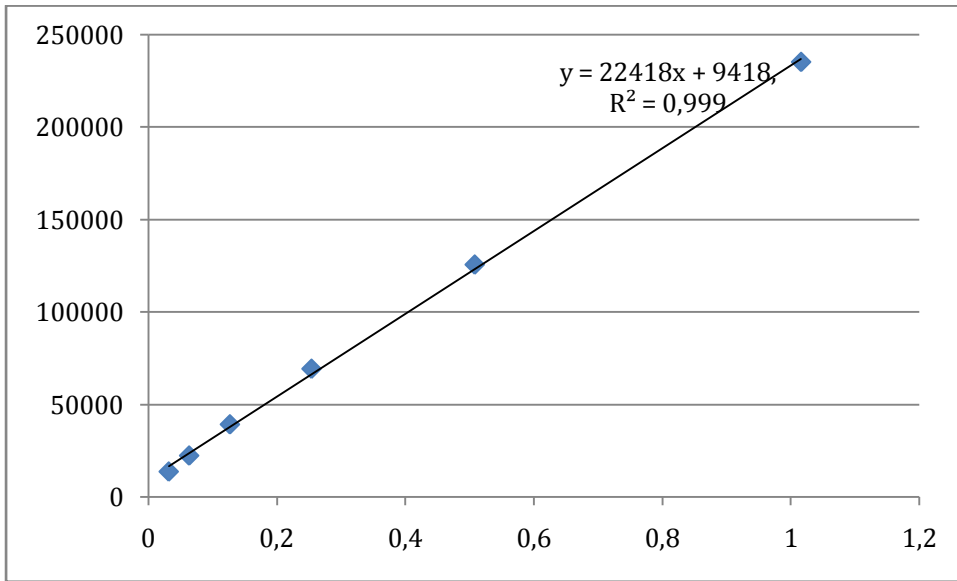
Şekil 29: Kafeik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 30: p-kumarik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 31: Ferulik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 32: Sinnamik asit kalibrasyon grafiği

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Erysimum türleri üzerinde çoğunlukla yapılan taksonomik, anatomik ve morfolojik çalışmaların yanı sıra, bu cinse ait çeşitli türlerin fitokimyasal içerikleri araştırılmıştır ve bazı biyolojik aktiviteleri bakımından incelenmiştir. Bu çalışmada *Erysimum kotshyanum* türünün ve bitki materyallerinin toplandığı bölgedeki toprak örneklerinin ağır metal içerikleri, CNS analizi ve toprak analizleri (PH, Kireç, tuz tayinleri) yapılmıştır. Bitki ekstraktının toplam antioksidan aktivitesi, serbest radikal giderim aktivitesi, total fenolik ve total flavonoid miktarları tespit edilmiştir ve bitkinin içermiş olduğu bazı fenolik bileşenlerin içerik tanımları YPSK yöntemi ile yapılmıştır.

Bitkiler; farklı bitki türlerinin metallere olan toleranslılığına göre ve bunların ekolojik çevrelerine göre 4 gruba ayrılırlar: Sadece metal içermeyen topraklarda yaşayan ve metallerce zengin topraklarda hiçbir populasyon ya da ekotipe sahip olmayan bitkiler (zorunlu metal sevmeyenler); sadece metallerce zengin topraklarda, buralara endemik olarak yaşayabilen bitkiler (zorunlu metal sevenler) olarak, diğer iki gruba giren bitkiler ise fakültatif metal sevenler olarak adlandırılırlar. Bu gruptaki bitkilerin bazı populasyonları metallere karşı toleranslıyken, bazı populasyonları toleranslı değildir (Pollard et al. 2002).

Düşük derişimlerde Cu, Cr, Mo, Ni, Se ve Zn gibi bazı iz elementler bitkilerin hayatta kalması için gerekli iken yüksek derişimlerde aynı temel elementler toksik etki yapabilir. As, Cd, Pb, Hg gibi bazı iz elementler ise temel olmadıkları gibi çevredeki çok düşük derişimleri bile bitkilerde toksisiteye yol açabilir (Prasad 2004). Aynı zamanda ağır metal olarak adlandırılan tüm bu elementlerin bitkide aşırı birikimi fizyolojik strese, büyüme ve gelişmede azalmaya sebep olmaktadır (Ouzounidou 1994). Ancak bazı bitkiler ağır metalleri herhangi bir toksisite semptomu göstermeksizin toprak üstü organlarında diğer bitki türlerine göre 100 ila 1000 kat daha fazla biriktirebilir. Bu tür bitkiler “hiperakümülatör” olarak adlandırılmaktadır (Brooks 1998). Yaklaşık 450 bitki türü hiperakümülatör olarak tanımlanmış olup; Brassicaceae, Asteraceae, Fabaceae, Lamiaceae ve Euphorbiaceae bu özelliğe sahip familyalardan yalnızca birkaç tanesidir (Reeves 2006).

Yapılan bir çalışmada birçok hiperakümülatörün Brassicaceae familyasına ait olduğu ve aynı zamanda glukozinolat üretiminin bu familyanın karakteristik özelliklerinden olduğu belirtilmiştir (Asad 2011). Daha önceki çalışmalar, Brassicaceae familyasına ait *Erysimum* L. cinsinin bazı türleri , metal biriktirmesi bakımından araştırılmıştır. *Erysimum linifolium* (Pers.) Gay subsp. *linifolium* türünün maden ocaklarında yetiştiği gösterilmiştir (Prasad 2003). Altınözlü (2012), Türkiye'nin Ni biriktiren bitkilerini araştırdığı bir çalışmada *Erysimum smyrnaeum* (117 mg/kg), *Erysimum crassipes* (114 mg/kg) ve *Erysimum kotschayanum*' un (755 Ni mg/kg) Ni biriktirdiği gözlemlenmiştir. Ancak bir Ni hiperakümülatörü türün bünyesinde bulundurduğu en düşük Ni miktarının kuru ağırlığı 1000 mg kg⁻¹ olmalıdır (Baker ve diğ. 2000).

Bizim yaptığımız çalışmada, üç farklı yükseklikten alınan toprak ve yaprak örnekleri 7 farklı metal (Cr, Cd, Ni, Co, Fe, Cu ve Pb) miktarları bakımından analiz edilmiştir. Tablo 4' e göre topraktaki en fazla Cr miktarı(193.9 µg/g) ve Fe miktarı (24970 µg/g) 2467 m' de; Ni (235. 19 µg/g), Cu (70.51 µg/g) ve Pb (4.7 µg/g) miktarı 2302 yükseklikten aldığımız numunelerde tespit edilmiştir. Tablo 5' de yapraktaki metal miktarlarına baktığımızda en yüksek Cr (10.68 µg/g) ve Fe miktarı (2603 µg/g) 2467m yükseklikten , Ni (6.9 µg/g) ve Cu (5. 47 µg/g) miktarları 2302 m yükseklikten tespit edilmiştir. Toprak ve yaprak örneklerini metal içeriği bakımından kıyasladığımızda, en fazla metal miktarları aynı yükseklikten toplanan yaprak ve toprak örneklerinde görülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlardan en yüksek Ni içeriğinin 6.9 (µg/g) olduğu tespit edilmesinden dolayı, *E. kotschyanum*' un Ni hiperakümülatörü olduğunu destekleyecek bir sonuç elde edilememiştir.

Bitkinin yetiştiği ortamda ve bitkinin yaprağındaki karbon-nitrojen varlığının, karbon içeren ve nitrojen içeren savunma bileşenlerinin üretimini etkilediğini savunan “Karbon besin hipotezinden” yola çıkarak Zn hiperakümülatörü olan *Thalaspia caerulescens* üzerine yaptıkları CNS analizinde; N, C ve S miktarları yüzde olarak sırasıyla %1.84; % 40.01 ve %S 0.83 şeklinde belirlenmiştir. Yapraktaki C/N oranının N içeren sekonder metabolitlerin üretimini etkilediğini öne sürdükleri bu araştırmada, bitkinin C/N oranını 25.29 bulurken ; toplam glikozinolat miktarını 4.58 µmol g⁻¹ bulmuşlardır. *E. kotschyanum* 'un yapraklarından elde ettiğimiz CNS analiz sonuçları Tablo 3' de de belirtildiği gibi şu şekildedir: N (% 3.00), C (%39.16), S

(%1.026) ve C/N oranı (13. 05). Toprak örneklerinde bu miktarlar daha az oranda tespit edilmiştir. C/N oranının az olması, bitkinin daha çok N içeren sekonder metabolitleri ürettiğini desteklemektedir.

Toprak; tohumun çimlenmesi, bitkinin şekillenmesi, yerüstü organlarının anatomisi ve morfolojisi, kök sistemi için ve bitkinin besin kalitesi açısından çok büyük bir öneme sahiptir. *Erysimum amasianum*' un toprağının fiziksel analizinin yapıldığı bir çalışmada bitkinin orta kireçli, tuzsuz ve genellikle hafif alkali toprakları tercih ettiği belirtilmiştir (Cansaran ve diğ. 2007). *Erysimum crepidifolium*' un toprak analizlerinin yapıldığı başka bir çalışmada ise bitkinin yüksek Zn/Pb/Cd bölgelerinde kalkerli toprakları tercih ettiği gözlemlenmiştir (Wenzel ve Jockwer 1999). Bulgularımızda yer alan Tablo 2' de gösterilen verilere göre *E. kotschyanum*' un kısmen alkali ya da asidik, kireç ve tuz oranı düşük topraklarda yetiştiği sonucuna varılmıştır.

E. kotschyanum üzerinde yapmış olduğumuz antioksidan ve antibakteriyel aktivite ve içerik tanımlama çalışmalarından elde etmiş olduğumuz sonuçlar söz konusu türün antioksidan kaynağı olduğunu ortaya koymaktadır.

E. kotschyanum bitkisinin etanol, aseton ve su ekstraktlarının toplam antioksidan aktiviteleri, linoleik asitin inkübasyonu sırasında oluşan peroksitli ürünlerin β -Karoten ile tepkimeye girmesiyle karakteristik sarı renginin açılması esasına dayanan β -Karoten/ Linoleik Asit yöntemine göre belirlenmiştir. Tablo 6 ve Şekil 16 incelendiğinde en yüksek antioksidan aktivite *E. kotschyanum*' un su ekstraktlarında 80.47 ± 1.83 , en düşük antioksidan aktivite ise *E. kotschyanum* etanol ekstraktlarında 50.86 ± 0.58 olarak gözlenmiştir.

Ekstraktların serbest radikal giderim aktivitesi ekstrakt içindeki antioksidan bileşiklerin hidrojenlerini vermelerine ve bileşiğin yapısal konformasyonuna bağlıdır (Eryiğit 2006). 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil 517 nm'de dalga boyu maksimumuna sahiptir ve bazı doğal bileşiklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Duran ve diğ. (2015) 30 tıbbi bitkinin antioksidan aktivitesini ve fenolik içeriklerini araştırdıkları çalışmalarında *Erysimum kotschyanum* 'un metanol ekstraktlarının serbest radikal giderim aktivitesini DPPH metodu ile hesaplamışlardır ve sonuç olarak yüzde serbest radikal giderim aktivitesini %70.074 tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda Tablo 7 ve Şekil 17 incelendiğinde tüm ekstraktların derişimi artması ile serbest radikal giderim aktivitelerinin de arttığı görülmektedir. *E. kotschyanum* türünün en yüksek serbest radikal giderim aktivitesi ekstraktların 1mg/ml derişimlerinde sırasıyla etanol ekstraktının serbest radikal giderim aktivitesi (%89.39±0.61), aseton ekstraktının serbest radikal giderim aktivitesi (%83.78±0.04), su ekstraktının serbest radikal giderim aktivitesi (57.66±8.20) şeklinde gözlenmiştir. Ekstraktlarımız, BHT'ye yakın antioksidan etki göstermektedir.

Yapılan indirgeme gücü kapasitesi deneylerinin Tablo 8 ve Tablo 9' daki verileri incelendiğinde konsantrasyonun artmasıyla absorbanların da arttığı görülmektedir. Bitki ekstraktlarımız arasında en yüksek ve pozitif kontrol olarak kullandığımız BHT' ye en yakın indirgeme gücü kapasitesi etanol ekstraktlarının 1 mg/ml derişiminde 0. 01701±0.001 olarak belirlenmiştir. Elde edilen en az FRAP değeri ise aseton ekstraktlarında 0.01402±0.001 olarak hesaplanmıştır.

Re ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edilen bitki ekstraktlarının ABTS radikali giderme aktiviteleri 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda ölçülmüştür. Konsantrasyon arttıkça absorbanın düştüğü dolayısıyla serbest radikal giderim aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Tablo 10 ve Şekil 19). ABTS radikali giderme aktivitesi tayininde; ekstraktların 200 µg/ml derişiminde elde edilen ABTS aktivite sonuçları sırasıya aseton (96.30±0.12), etanol (84.57±0.39), su (83.86±1.05) şeklindedir.

E. kotschyanum ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları FCR reaktifi kullanılarak ve gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Tablo 11 ve Şekil 20 incelendiğinde en yüksek toplam fenolik madde miktarı *E. kotschyanum*' un aseton ekstraktlarında (4. 883±0.47 mgGAE/g), en düşük toplam fenolik madde miktarı ise *E. kotschyanum* etanol ekstraktlarında (3.798±0.29 mgGAE/g) görülmüştür. *E. kotschyanum* ile birlikte 30 tıbbi bitkinin antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik miktarlarının araştırıldığı çalışmada, metanol, su ve asetik asit karışımı kullanılarak hazırlanan *E. kotschyanum* 'un ekstraktlarında total fenolik içeriğini 0.767 mg GAE/ 100ml olarak tespit etmişlerdir (Duran ve diğ. 2015). Sonuçlardaki bu fark, ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözücülerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kuersetin standart grafiğinden elde edilen formülden bitki ekstraktlarında bulunan toplam flavonoid bileşik miktarları kuersetine (QE) eşdeğer olarak hesaplanmıştır (R²:

0.997). Tablo 12 ve Şekil 21' de görüldüğü üzere çalışılan ekstraktlarda tespit edilen flavonoid bileşik içerikleri kıyaslandığında etanol ekstraktlarında 93.322 ± 1.57 mgQE/g olarak en fazla flavonoid bileşik bulunduğu belirlenmiştir. 31.73 ± 0.90 mgQE/g ile en düşük flavonoid içeriği su ekstraktlarında saptanmıştır.

Erysimum bitkileri, metiltiyoalkil, metilsülfinilalkil ve metilsülfolilalkil glukozinolatlarını bulundurmalarıyla nitelendirilmektedirler (Daxenbichler ve diğ. 1991). *Erysimum corinthium* Boiss. 'in taze yaprakları, kökleri ve tohumlarının doğal otoliziz ve eksojen mirosinaz hidrolizi yoluyla glukozinolat içerikleri incelenmiştir ve bunun sonucunda bu bitkide ilk kez 6 glukozinolatın varlığı belirlenmiştir; sinigrin, progoitrin, glukoiberin, 3-propil glukozinolat, glucoçerolin ve glucoerisolin (Gendy ve diğ. 2010). Bir diğer çalışmada *Erysimum crepidifolium*' un yapraklarından dört kardiak glikoziti izole edilmiştir. Lahana kelebeğinin (*Pieris rapae*) yumurtlamasının, *Erysimum cheiranthoides*'in yapraklarının yüzeyindeki glukozinolatlar ve kardenolidlerin dengesinden etkilendikleri düşünülmektedir. Yüzeydeki glukozinolatların konsantrasyonun doku seviyeleriyle pozitif olarak alakalı olduğu ancak, kardenolid konsantrasyonunun bu bitkilerde daha düşük yüzeye sahip olduğu bildirilmiştir (Hugentobler ve Renwick 1995). *Erysimum cheiranthoides*' in, lahana yapraklarına uygulandıklarında *Pieris rapae*' nin larvaları tarafından yenmesini engelleyen ekstrakte edilebilir bileşenler içerdikleri tespit edilmiştir (Dimock ve diğ. 1991). Radulovic ve diğ. (2011) yaptıkları bir çalışmada *Erysimum diffusum*' da tespit ettikleri 4-izotiyosiyanoatit asitin önemli insan patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi analiz edilmiştir ve önemli bir inhibitör olduğu gösterilmiştir.

Etanol, aseton ve su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesinin verildiği Tablo 13 incelendiğinde en etkili olan ekstraktın 11 ± 1 mm zon çapı ile *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı *E. kotschyanum* türünün etanol ekstraktlarında tespit edilmiştir. Etanol ekstraktının en düşük antibakteriyel etkisi ise *E. coli* bakterisine karşı 4 ± 2 mm zon çapında görülmüştür. Aseton ekstraktının en yüksek etkisi 9 ± 1 mm mm zon çapı ile *E. coli* ye karşı, en düşük etki 3 ± 1 mm zon çapıyla *P. aeruginosa*' ya karşı tespit edilmiştir. Su ekstraktı 7 ± 2 mm zon çapı ile *E.coli* de en çok etkiyi; 5 ± 2 mm zon çapı ile *S. aureus* da en az etkiyi göstermiştir.

Erysimum corinthium ile yapılan bir çalışmadan *E. corinthium*' un tohumlarının gram pozitif ve gram negatiflerin büyümesini inhibe ederek yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve HCT 116, hepatik HEPG2 ve Hela hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği belirtilmiştir (Gendy ve diğ. 2010). Brine Shrimp letalite testi ile yapılan sitotoksik çalışmalarımızdan aldığımız ve Tablo 14' de verdiğimiz sonuçlara göre en yüksek sitotoksik aktivite su ekstraktında LC₅₀ değeri 315.48 ppm bulunmuştur. Etanol ekstraktlarında ise LC₅₀ değeri 724. 84 ppm ile gözlenmiştir. LC₅₀ değerinin düşük olması yüksek sitotoksik aktiviteye işaret etmektedir.

E. kotschyianum' un etanol ekstraktlarının YPSK'da fenolik içerik tayini için 9 adet standart madde (gallik asit, 3,4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, vanilik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, sinamik asit) baz alınarak (Caponio ve diğ. 1999) fenolik bileşikler tespit edilmiştir. Tablo15' de bakıldığında, etanol ekstraktında en yüksek fenolik bileşen içeriği olarak vanilik asit (753.21 µg/g), en düşük fenolik bileşen içeriği olarak 3,4-hidroksibenzoik asit (18.05 µg/g) gözlenmiştir. Standartların kalibrasyon eğrileri Şekil 24-32' de görüldüğü gibidir.

Erysimum türleri, içermiş oldukları kimyasal bileşenlerden dolayı çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Yaptığımız literatür araştırmasına göre *Erysimum* cinsine ait bazı türlerde çeşitli fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarına rastlanırken, endemik bir tür olan *Erysimum kotschyianum* üzerinde DPPH ve total fenolik madde miktarı dışında herhangi bir biyolojik aktivite çalışmasında materyal olarak kullanılmamıştır. Çalışmamızın sonunda elde edilen bulgulara göre bu türün potansiyel bir antioksidan kaynağı olduğu ve sağlık alanında kullanılma potansiyellerinin olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen C/N oranı bulguları ileriki çalışmalarımızda bitki bünyesinde N içeren bileşenlerini buldurabilecekleri ve glukozinolatların azot içeren sekonder metabolit olmaları ve bu bileşenlere Brassicaceae familyasında oldukça sık rastlanması, daha sonraki çalışmalarımızda bu familyaya ait olan bitkimizin total glikozinolat içeriğinin saptanması konusunda bize fikir vermektedir.

5. KAYNAKLAR

Abbasoğlu, U., Őener, B., Günay., Y., Temizer, H., Gürbüz, S., “Bazı Inokulin Alkoloitlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri”, *IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Eskişehir, Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi Yayınları , No:1, (1992).

Açıkğz E., “Kolza ve Şalgam vb. Brassica Türleri”, *Uludağ Arıcılık*, 3(3):15, Bursa, (2003).

Agostini-Costa T, Vieira R, Bizzo HR, Silveria D, Gimenes MA., “Secondary metabolites”, *Chromatography and Its Applications*, Brazil, pp: 131-164, (2012).

Ahmad, I., M.J. Akhtar, Z.A. Zahir and J. Amer. “Effect of Cadmium on seed germination and seedling growth of four wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars”, *Pak. J. Bot.*, 44: 1569-1574, (2012).

Akyüz E ., “*Polygonum bistorta* ssp. *carneum* Bitki Ekstraklarının Kromotografik Yöntemlerle Kimyasal Bilesiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri”, *Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bil. Enst.*, Trabzon, (2007).

Al- Shehbaz I.A., Beilstein M.A., Kellog E.A., “Systematics and phylogeny of Brassicaceae (Cruciferae)”, *Plant. Syst. Evol.* 259: 89-120, (2006).

Albayrak S., Sağdıç O., Aksoy A., “Bitkisel rnlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4):401-409, (2010).

Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A., Bora U., “Indian Medicinal herbs as sources of antioxidants”, *Science Direct Food Research*, 41:1-15, (2008).

Amin, İ., Zamaliah, MM., Chin, WF., “Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables”, *Food Chem.*, 87: 581–586, (2004).

Anıl M., “Antioksidan Olarak Tahıllar”, *7-8 Eylül 2006 Hububat rnleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi*, Gaziantep, (2000).

Anonim, “Bitkilerde Doğal Renk Maddeleri ve Fenolik Bileşikler ”, *Mesleki Eğitim ve Őđretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi*, Ankara, (2006).

Anonymous, “The Secondary Metabolism of Plants: Secondary Defence Compounds ”, <http://www.biologie.uni-hamburg.de/bonline/e20/20.htm>, (2009).

Anonymous, “Analysis of Secondary Metabolites in Plant and Cell Culture Tissue of *Hypericum perforatum* L. and *Rhodiola rosea* L.”, <http://herkules oulu fi isbn9514271610/isbn9514271610.pdf> , (2003).

Apak, R., Kubilay, G., Demirata, B., Özyürek, M., Celik, E.S., Bektaşoğlu, B., Berker, I.K., Özyurt, D., “Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay”, *Molecules*, 12, 1496-1517, (2007).

Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., Legret, P., “Standardisation d’un extrait de propolis et identification des principaux constituants”, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, 462–468, (1994).

Asad SA., “Interactions between heavy metals and glucosinolates as defense mechanisms in *Thlaspi caerulescens*”, Ph.D Thesis, *University of Nottingham*, p. 177, (2011).

Aslan, R., Şekeroğlu, M.R., And Bayiroğlu, F. “Serbest Radical Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri Ve Hücrel Antioksidan Savunma” , *Sağlık. Bil. Derg.* 2:137-142, (1995).

Aydın, S.A, Üstün, F., “Tanenler 1 kimyasal Yapıları , Farmakolojik Etkileri , Analiz Yöntemleri”, *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 33 (1), 21-31, (2007).

Bağcı E., Dığrak, M., “Antimicrobial activity of essential oils of some *Abies* (Fir) species from Turkey”, *J. Flavour Fragrance*, 11: 251-256, (1996).

Baker AJM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC., “Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils”, (eds: Terry N., Bañuelos G., Vangronsveld J.), *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers, 85–107, (2000).

Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., and Bollinger, W.H., “Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials”, *Science*, 228: 1154–1160, (1985).

Baytop T., “Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi”, *İstanbul Üni.Yay.* No:40 İstanbul, (1984).

Baytop, T., “Türkiye’ de Bitkiler ile Tedavi , Geçmişte ve Bugün” İkinci Baskı , *Nobel Tıp Kitapevi*, 455, (1999).

Benavente-Garcia, O., “Uses and properties of citrus flavonoids”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4505-4515, (1997).

- Bilaloğlu, G. V., Harmandar, M., “Flavonoidler”, *Aktif Yayınevi*, İstanbul, 334-354, (1999).
- BLOIS, M.S., “Antioxidant Determination By The Use Of A Stable Free Radical”, *Nature*:181, 1199-1200, (1958).
- Blomhoff R., “Dietary Antioxidants And Cardiovascular Disease”, *Current Opinion in Lipidology*, 2005; 16: 47-54.
- Boissier, E., “Flora Orientalis”, 1-6, Geneva. (1867-1888).
- Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E., “Production of plant secondary metabolites: a historical perspective”, *Plant Science*, 5: 839-851, (2001).
- Brooks, R.R., “Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining”, CAB International, New York, pp. 1–14, (1998).
- Bryant, J. P., Chapin, F. S., & Klein, D. R. “Carbon/Nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory”, *Oikos*, 40, 357-368, (1983).
- Burt S., “Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods”, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 94, Issue 3, Pages 223–253, (2004).
- Byung, P.Y., “Cellular Defenses Against Damage From Reactive Species”, *Physiological Review*, 74(1), 139-172, (1994).
- Cansaran A., Akçin Ergen Ö., Kandemir N., “A Study on the Morphology, Anatomy and Autecology of *Erysimum amasianum* Hausskn. & Bornm. (Brassicaceae) Distributed in Central Black Sea Region (Amasya-Turkey)”, *International Journal of Science & Technology*, Volume 2, No 1, 13-24, (2007).
- Caponio, F., Alloggio, V. and Gomes, T., “Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil: Influence of Paste Preparation Techniques”, *Food Chemistry*, 64: 203-209, (1999).
- Cemeroğlu, B., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, vol 1, Ankara, 77-88, (2004).
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., “Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182, (2002).
- Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M.C., Mecocci C., “Potential markers of oxidative stress in stroke”, *Free Radical Biology & Medicine*, 39:841-852, (2005)

Çıkrıkçı S., “4'-dioktilamino -3-hidroksiflavon temelli floresans problemlerin sentezleri ve özelliklerinin incelenmesi ”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi*, İstanbul, (2005).

Coşkun, F., “Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular” , *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (2) 27-33, (2006).

Cowan, M.M., “Plant Products as Antimicrobial Agents Clinical Microbiology Reviews”, *Clin.Microbio.l Rev.*, 12: 564–582. (1999).

Dao, L. and Takeoka G., Anthocyanins. In. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. CRC Pres LLC, (2002).

Davis, P. H., “Flora of Turkey and the East Aegean Islands”, *Edinburgh Univ.Press*, Edinburgh, (1965).

Davis, P. H., Mill, R.R., Tan K., “Flora of Turkey and the East Aegean”, *Edinburgh Univ. Press*, (1988).

Davis, P.H., “Flora of Turkey and the East Aegeon Islands”, *Edinburgh Univ. Press*, Vol. 8, (1984).

Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B., Brinker, A.M., Powell, R.G., “Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants”, *Phytochemistry*,30, 2623–2638, (1991).

Demirbağ, Z., Belduz, A.O., Sezen, K., Nakacıoğlu, R., “Bazı bitki ekstraktlarının antibakteriyel etkilerinin araştırılması” , *Kükem Dergisi*, 20 (1): 49-58, (1997).

Dewick P.M., “Medicinal Natural Products”, *2nd A Biosynthetic Approach*, Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 6-12, (2002).

Dimock M.B., Renwick J.A.A, Radke C.D, Sachdev-Gupta K., “Chemical constituents of an unacceptable crucifer, *Erysimum cheiranthoides*, deter feeding by *Pieris rapae*.”, *J.Chem.Ecol.*, 17:525-533, (1991).

Diplock A., “Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients”, *ILSI Europe concise monograph series*, 59 p., Belgium, (1998).

Dığrak, M., İlçim, A., Alma, H., Şen, S., “Antimikrobiyal aktivites of the extracts of various plants (Valex, mimosa bark, gallnut powders, *Salvia sp.* And *Phlomis*)”, *Tr. J. of Biology*, 23: 241-248, (1999).

Elliot J.G., “Application of antioxidant vitamins in foods and beverages” *Food Tech.* 53(2); 46-48. (1999).

Farnsworth, N.R., Akerev, O. Bingel, A.S., The Bulletin of WHO., 63: 9865-9871, (1985).

Faydaoğlu E. ve Sürücüoğlu M.S., “Geçmisten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi”, *Kastamonu Üni. , Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1): 52 – 67, (2011).

Feresin G.E., Tapia A.A., Bustos D.A., “Antibacterial activity of some medicinal plants from San Juan, Argentina”, *Fitoterapia*, 71(4), 429-432, (2000).

Gendy A.A., El-Gindi O.D., Hafez Al.S., Ateya A.M. “Glucosinolates, volatile constituents and biological activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae)” *Food Chemistry*, 118 519–524, (2010).

German D.A., Al-Shehbaz IA., “Five additional tribes (Aphragmeae, Biscutelleae, Calepineae, Conringieae and Erysimeae) in the Brassicaceae (Cruciferae)”, *Harvard Papers in Botany*, 13: 165-170, (2008).

Gök V., Serteser A., “Doğal Antioksidanların Biyoyararlılığı”, 2-4 Ekim 3. *Gıda Mühendisliği Kongresi*, Ankara, (2003).

Gugel R.K., Falk K.C. “Agronomic and seed quality evaluation of *Camelina sativa* western Canada”, *Can. J.Plant Sci.*, 86:1047-1058, (2006).

Günaydın B., Çelebi H., “Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller Ve Antioksidanlarla İlişkileri”, *Anestezi Dergisi*, 11: 87-98, (2003).

Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M.T., “Türkiye Bitkileri listesi (Damarlı Bitkiler)”, *Nezhat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını*, İstanbul, (2012).

Güngör, N., “Dut Pekmezinin Bazı Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Depolamanın Etkisi ”, Yüksek Lisans Tezi , *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, (2007).

Gür E., Altug T., Antioksidanlar Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım, 17-30, İzmir, (2001).

Gutteridge, J.M., “Lipid Peroxidation And Antioxidants As Biomarkers Of Tissue Damage”, *Clin.Chem.* 41(12): 1819-1828, (1995).

Haber F., Weiss J.J., “The Catalytic Decomposition Of Hydrogen Peroxide ByIron Salts”, *Proc. R. Soc. Lond. Ser.*,147: 332-351, (1934).

Han, K.H., “Molecular Biology of Secondary Growth”, *Journal of Plant Biotechnology*, 3: 45–57, (2001).

Harvell CD., Tollrian R., “Why inducible defenses? In The ecology and evolution of

inducible defenses”, (eds: Tollrian R., Harvell CD.) Princeton, New Jersey: *Princeton University Press*, pp: 3-9. 1999.

Hewitt, E.J., *Metals and micronutrients: uptake and utilization by plants*, (Ed.: D.A. Robb and W.S.) Pierpoint Academic Press London, pp. 277-300, (1983).

Heywood, V. H., Tutin, G. T., *Flora Europaea*, Cambridge Univ. Press, I-V, Cambridge, UK. (1964-1981)

Hugentobler U., Renwick J.A.A., “Effets of plant nutrition on the balance of insect relevant cardenolides and glucosinolates in *Erysimum cheiranthoides*.”, *Oecologia*, 102:95-105, (1995).

Işıksal D. D., “Türkiye Florası İçin Endemik Olan *Silene Ruscifolia* Hub.Mor. Taksonunun Anatomik, Morfolojik, Palinolojik, Karyolojik ve Ekolojik Özelliklerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Cumhuriyet Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas, (2013).

Jackson R. S., *Wine Science*, Second Edition, Elsevier, 633s, (2000).

Jadhav SJ, Nimbalkar SS, Kulkarni AD, Madhavi DL., “*Lipid oxidation in biological and food systems*”, (eds: Madhavi DL., Deshpande SS., Salunkhe DK.), Food antioxidants, New York: Marcel Dekker. p 5–64, (1996).

Kacar, B., *Toprak ve Bitki Analizleri*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, (1972).

Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T., “Bazı Üzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri”, *II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, Tokat, 309-312, (2006).

Karban R., Baldwin IT., “*Induced responses to herbivory*”, Chicago: University of Chicago Press, (1997).

Kavas G., “Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri”, *Türkiye Klinikleri*, Cilt 9, Sayı 1, Ankara ,(1989).

Kırbağ S. Ve Zengin F., “Elazığ Yöresindeki Bazı Tıbbi Bitkilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri”, Yüzüncü Yıl Üniversitesi , Ziraat Fakültesi , *Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, 16(2): 77-80, (2006).

Kırbağ, S., “*Hypericum perforatum* L.’un değişik ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi”, *Journal of Quafqaz Univ.*, V:II,N:1 102-108, (1999).

Kırbağ, S., Bağcı, E., “*Picea abies* (L.) karst. ve *Picea orientalis* (L.) link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma” , *Journal of Quafqaz Univ.* V:III,N:1 183-1882, (2000).

Kochl M., Kiefer C., Vogel J., “Three times out of Asia Minor-the phylogeography of *Arabis alpine* L. (Brassicaceae). *Mol. Ecol.*15:825-839, (2006).

Koçyiğit M., Yalova İlinde Etnobotanik Bir Arastırma, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul.

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN., “Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods”, *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17, (2002).

Kossel A., “Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle”, *Archiv für Physiologie*, 181–186, (1891).

Lee J., Koo N., Min DB., “Reactive Oxygen Species, Aging, And Antioxidative Nutraceuticals” , *Food Science and Food Safety*, 3: 21- 33, (2004).

Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Andrioli, G., Brocco, G. and Bellavite, P., “A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma”, *Anal. Biochem.*, 269, 38–44, (1999).

Mammadov, R., *Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler*, Nobel Press, 428, (2014).

Martin E., Akçiçek E., Çetin Ö., Duran A., “Cytogenetical analysis of endemic *Matthiola Montana* (Goldlack) from Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 4(1):198-202, (2011).

Mathew, S., Abraham, T.E., “Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models”, *Food Chemistry*, 94, 520-528, (2006).

Matthews, P., Haas, J.G., “Antimicrobial activity of some edible plants: lotus, coffee and others”, *J.of Food Projection*, V:56 N:1 66-68, (1993).

Mccord J.M, Fridowich I., “Superoxide Dismutase, An Anzymic Function Of Erythrocyte”, *J. Biol. Chem.*, 244: 6049-55, (1969).

Meriçli, F., “Yukarı Fırat bölgesinde yetişen endemik *Thymus* türlerinin uçucu yağlarının değerlendirilmesi” , *Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkiler Sempozyumu*, 137, 6-8 Ekim Elazığ, (1986).

Miller N.J., Rice E.C., Davies M.J., Gopinathan V., and Milner A., “A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates”, *Clinical Science*, 84:407-412, (1993).

Moldovan L, Moldovan NI. “Oxygen Free Radicals And Redox Biology Of Organelles”, *Histochemistry and Cell Biology*, 122: 395 – 412, (2004).

Mutlu B., “New morphological characters for some *Erysimum* (Brassicaceae) species”, *Turk. J. Bot.*, 34 115-121, (2010).

Naczki, M. and Shahidi, F., “Extraction and analysis of phenolics in food”, *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111, (2004).

Nawar W.W., *Lipids*, Food Chemistry, O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York, (1996).

Nizamlioglu, M.N., Nas, S., “Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bilesikler Yapıları ve Önemleri”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, No:1, 5, 20-35, (2010).

Öğüt S., “Doğal Antioksidanların Önemi”, *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11(1): 25 – 30, (2014).

Onat T., Emerk K., Sözmen E., *İnsan Biyokimyası*, 2. Baskı, Palme Yayıncılık, (2006).

Oskay D., Oskay M., “Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi”, *Journal of New World Sciences Academy*, Volume: 4, Number: 2, Article Number: 5A0006, (2009).

Oskay M., Aktaş K., Sarı D., Azeri C., “*Asphodelus aestivus* (Liliaceae)'un Antimikrobiyal Etkisinin Çukur ve Disk Diffüzyon Yöntemiyle Karşılaştırmalı Olarak Belirlenmesi”, *Eko ve Çevre Der.*, 16, 62, 62-65, (2007).

Oturgan M.H., “Cruciferae Familyasına Ait Bazı Türlerde Biyolojik Aktivite Çalışmaları”, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD, İstanbul, (2007).

Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer, E.K., “Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study”, *J. Agric. Food Chem.*, 50(11); 3122-3128, (2002).

Ouzounidou G., “Copper Induced Changes on Growth, Metal Content and Photosynthetic Functions of *Alyssum montanum* L. Plants”, *Environmental and Experimental Botany*, 34, p 165-172, (1994).

Oyaizu M., “Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine”, *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315, (1986).

Özgen M., Ertunç F., Kınacı G., Yıldız M., Birsin M., Ulukan H., Emiroğlu H., Koyuncu N., Sancak C., “Tarım Teknolojilerinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar” *Bitki Biyoteknolojisi*, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Cilt 1, 315–346, Ankara, (2005).

- Özkal N., “Fırat havzasında yetişen *Glycyrrhizata* L. meyan varyetelerinin kimyasal içeriği ve antimikrobiyal etkileri” *Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkiler Sempozyumu*, 261-273, 6-8 Ekim Elazığ, (1986).
- Pehluvan M ., Güleryüz M., “Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi”, *Bahçe*, 33 (1-2): 51 – 57, (2004).
- Pokorný, J., “Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants?”, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 629-642, (2007).
- Polatschek A & Snogerup S., *Erysimum* L. In: Strid A & Tan K (eds.), *Flora Hellenica* 2: 130. Germany: Koeltz Scientific Books, (2002).
- Pollard AJ., Powell KD., Harper FA., Smith JAC., “The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 539-566, (2002).
- Prasad MNV., “Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems”, *Narosa Publishing House*, New Delhi, (2004).
- Prior R.L., Wu X., Karen S., “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements”, *Journal of Agriculture. Food Chemistry*, 53:4290-4302, (2005).
- Ramachandra R, Ravishankar GA., “Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites”, *Biotechnology Advances*, 2: 101-153, (2002).
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., “Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radic Biol Med*, 26,1231-1237, (1999).
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., ve Rice E.C., “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radicale Biology and Medicine*, 26: 1231-1237, (1999.).
- Reeves R., “Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: Phytoremediation of metalcontaminated soils”, *NATO Sci Ser IV Earth Environ Sci*, 68,25–52, (2006).
- Reeves, R.D., “Hyperaccumulation of Trace Elements by Plants”, In: Morel, J.L., Echevarria, G. ve Goncharova, N. (Eds.). *Phytoremediation of Metal- Contaminated Soils*, *NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences*, Springer, NY, pp. 1-25, (2006).
- Ribéreau-Gayon,P., Glories Y., *Handbook of Enology*, Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2nd Edition. Wiley, 451s, (2006).

Saldamlı İ., *Gıda Kimyası*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 463-492, (2007).

Saltan F.Z., Canbay H., “Eskişehir’de halk arasında kullanılan bazı bitkilerdeki ağır metal ve besin elementlerinin belirlenmesi”, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 19(1), 83-90, (2015).

Sekher Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA., “Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics”, *Biochem Biophys Res Commun*, 282: 1161-1168, (2001).

Seregin I.V., Kozhevnikova A. D., Kazyumina E. M., Ivanov V. B., “Nickel toxicity and distribution in maize roots”, *Fiziol Rast*, 50: 793-800, (2006).

Shier W. T., “Metals as toxins in plants”, *Toxin Reviews*, 13: 205-216, (1994).

Sibanda T., Okoh I., “The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents”, *Afr J Biotechnol*, 6, 25, 2886-2896, (2007).

Siemens DH., Garner SH., Mitchell-Olds T., Callaway RM., “Cost of defense in the context of plant competition: *Brassica rapa* may grow and defend”, *Ecology*, 83(2): 505-517, (2002).

Singleton V.L., Rossi J.A., “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents”, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158, (1965).

Sizer F, Whitney E., *Nutrition: Concepts and Controversies*, West/Wadsworth, New York, (1997).

Sökmen A, Gürel E., “Sekonder Metabolit Üretimi”, (Eds: Babaoğlu M., Gürel E., Özcan S.), *Bitki Biyoteknolojisi*, Cilt 1 Doku Kültürü Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 211-261, (2001).

Sökmen A., Jones BM., Ertürk M., “The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants”, *J Ethnopharmacol*, 67: 79-86, (1999).

Söylemezoglu G., “Üzümdeki fenolik bileşikler” , *Gıda*, Vol. 28(3) pp. 277-285, (2003).

Sözmen E.Y., *Yaşlanma Biyokimyası*, Ankara, Palme Yayıncılık, 665-674, (2002).

Sür, D., Gürkan, E, Köksal, P., “*Chrysanthemum coronarium* L. ve *Inula viscosa* (L.) Bitkilerinin antinbakteriyel ve antifungal etkileri” “233-237. *Proceeding of XII th International Symposium on Plant Originated Crude Drugs*, Ankara Turkey, May 20-22, (1998).

Taga M.S., Miller H.E., Pratt D.E., "Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 928-931, (1984).

Taiz L, Zeiger E., *Plant Physiology*, Santa Cruz, Los Angeles. Vol. 5, pp. 322, (2008).

Tanker M., Tanker N., *Farmakognozi*, Cilt 2, Ankara Üniv . Eczacılık Fakültesi Yayınları No:65, Ankara , (1990).

Tansı V., Kumova U., Kızıl S., "Bazı yem bitkilerinin arı merası olarak kullanılma olanakları ve tohum verim kalitelerinin saptanması üzerine araştırma", *Ç.Ü.Z.F. Dergisi*, 14(4):81-90, (1999).

Taysi S., Kocer I., Memişogulları R., Kızıltunc A., "Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behcet's disease", *Ann. Clin.Lab.Sci*, 32(4), 377-382, (2002).

Taysi S., Polat F., Gul M., Sarı R.A., Bakan E., "Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis", *Rheumatology International*, 21(5), 200-204, (2002).

Theis N, Lerdau M., "The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites", *International Journal of Plant Sciences*, 162: 93-102, (2003).

Theis N., Lerdau M., "The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites", *International Journal of Plant Sciences*, 164: 93–102, (2003).

Thomas MJ., "The Role Of Free Radicals And Antioxidants: How Do We Know That They Are Working?", *Critical Reviews in Food Science*, 35:21-39, (1995).

Uysal İ., "Morphological, Anatomical and Ecological studies on the two Turkish endemic species collected from Kaz Dağı (B1 Balıkesir) "*Allium sibthorpiatum* Schultes & Schultes fil. and *Allium reuterianum* Boiss.", *Tr. J. of Botany*, 23:137-148, (1999).

Vanisree M., Tsay H.S., "Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites" *International Journal of Applied Science and Engineering*, 1: 29–48, (2004).

Vanisree M., Lee C.Y., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.Y., Tsay H.S., "Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture", *Botanical Bulletin Academia Sinica*, 45: 1–22, (2004).

Velioğlu Y.S., Mazza G., Gao L., Oomah B.D., "Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables and Grain Products", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 46(10):4113-4117, (1998).

Verpoorte R., Heijden R., Hoopen HJG., Memelink J., "Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals",

Biotechnology Letters, 21: 467–479.

Warwick S.I., Gugel R.K., Gomez-Campo C., “Genetic variation in the *Eruca vesicaria* L.”, *Cav. Plant Genet Resour Charact Util*, 5: 142-153, (2007).

Warwick S.I., Sauder C., “Phylogeny of tribe Brassicaceae based on chloroplast restriction site polymorphisms and nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast trnI intron sequences”, *Can. J. Bot.*, 83:467-483, (2005).

Warwick SI., Sauder CA., Al-Shehbaz IA., Jacquemond F., “Phylogenetic relationships in the tribes Anthonieae, Chorisporeae, Euclideae and Hesperideae (Brassicaceae) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences”, *Ann Missouri Bot Gard* 94: 56-78, (2007).

Warwick SI., Francis A., Al-Shehbaz IA., “Brassicaceae: Species checklist and database on CD-Rom”, *Pl Syst Evol* 259: 249-258, (2006).

Wenzel W.W., Jockwer F., “Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralized soils of the Austrian Alps”, *Environ. Pollut*, 104, 145-155,(1999).

Wootton C.P., Ryan L., “Improving public health : The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages”, *Food Research*, 44:3135-3148, (2011).

Wu C., Chen F., Wang X., Kim H., He G., Haleyzitln V., Huang G., “Antioxidant constituents in fewerfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification”, *Food Chemistry*, 96: 220–227, (2006).

Yıldız M., Terzi H., “Ağır Metaller ve Fitoremediasyon: Fizyolojik ve Moleküler Mekanizmalar”, *AKÜ-FEBİD*, 11 011001, 1-22, (2011).

Young I.S., Woodside J.V., “Antioxidants in health and disease”, *J. Clin.Pathol*, 54:176-186, (2001).

Yücel U, Ötles S., “Sarabın bilesimi ve beslenmedeki önemi”, *Dünya Gıda*, 6, 5, 79-82, (2001).

Zor, M., “Depolamanın Ayva Reçelinin Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkisi ”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, (2007).

6. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge Kılınçarslan
Doğum Yeri ve Tarihi : Yozgat- 11.04.1990
Lisans Üniversite : Pamukkale Üniversitesi
Y. Lisans Üniversite (varsa) : Pamukkale Üniversitesi
Elektronik posta : oklncrsln@gmail.com
İletişim Adresi :Pamukkale Üni. Fen-Edebiyat Fak. B Blok.
Kınıklı/Denizli

Yayın Listesi :

Özay C., Kılınçarslan Ö., Mammadov M., “Brassicaceae Familyasında Savunma Mekanizmaları Olarak Ağır Metaller ve Glikozinolatlar Arasındaki İlişki”, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 9(1), 12-22, (2016).

Konferans Listesi :

C. Özay, Ö. Kılınçarslan, R. Mammadov (2014) “Bitkilerde Savunma Mekanizmaları Olarak Ağır Metaller ve Glukozinolatlar Arasındaki İlişki”, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir (Poster sunum).

C. Özay, R. Rammadov, Ö. Kılınçarslan (2014) Interactions Between Heavy Metals and Glucosinolates as Defense Mechanisms in *Alyssum L.* (Brassicaceae), II. International Symposium “Secondary Metabolites: Chemistry, Biology and Biotechnology” ISSMET 2014, 19-23 May 2014, Moscow/RUSSIA, p. 48 (Sözlü sunum)

Deniz N., Kocamaz E., Yaka Gül H., Kılınçarslan Ö., Mammadov R., Determination Of The Cytotoxic Activity Of *Crocus cancellatus* Spp. *Mazziracus*'s Extracts. *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN.*

Kılınçarslan Ö., Özay C., Deniz N., Mammadov R. Distribution Of Ni Hyperaccumulators Belonging To The Brassicaceae In Turkey. *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN.*

Mammadov T., Kılınçarslan Ö., Mammadov R. *Ornithogalum* L. Species Of Northeastern Caucasus (Azerbaijan Land). *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN*

Sevim M. L., Gediz Ç., Yaka Gül H., Kılınçarslan Ö., Düşen O., Düşen S., Mammadov R. Cytotoxic Activity Of Hacıhalililoglu Apricot Variety From Turkey. *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2015) 01-05 June 2015, Baku, AZERBAIJAN*

Kılınçarslan Ö., Mammadov R., “Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Erysimum kotschyanum* Extracts”, *Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2016) 23-27 Mayıs 2016, Antalya, TÜRKİYE.*

Azmaz M., Kılınçarslan Ö., Rakhimzhanova A., Katılmış Y., Mammadov R., “Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Acetonic and Ethanolic Extracts of *Andricus quercustozae* (Bosc, 1792) Gall”, *International Scientific and Practical Conference Modern Problems of Biotechnology: From Laboratory Researches to Productio, 7-8 Nisan, Almata, KAZAKİSTAN.*