

Apium graveolens Linn. (Apiaceae) tohumu uçucu yağının kimyasal bileşimi ve in vitro antioksidan aktivitesi

Serap ŞAHİN BAŞAK*, Ferda CANDAN

C.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı, 58140, Sivas

Özet

Bu çalışmada halk arasında kereviz olarak bilinen, Apium graveolens Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşiminin ve in vitro antioksidan aktivitesinin saptanması amaçlanmıştır. Kereviz tohumundan elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi GC-MS analiziyle saptanmış ve uçucu yağın % 96.54'üne karşılık gelen 19 bileşen belirlenmiştir. Uçucu yağın ilk dört ana bileşeni d-limonen (87.10%), α -terpinolen (2.87%), 2- α -pinen (1.55%) ve p-simen (1.19%) olarak gözlenmiştir. Uçucu yağın antioksidan özelliği, reaktif oksijen türlerinden (ROT) olan hidrokسيل ($\cdot OH$) ve süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) radikalleri ile, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve kararlı serbest radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)'i inhibisyon özellikleri çalışılarak incelenmiştir. Elde edilen veriler, uçucu yağın antioksidan özelliğiyle bağlantılı olan toplam flavonoid, toplam fenol ve toplam antioksidan çalışmalarıyla desteklenmiştir. Deneylerde standart olarak bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır. Kereviz tohumundan elde edilen uçucu yağın, Fe^{+3} -askorbat-EDTA- H_2O_2 sistemi ile oluşturulan hidrokسيل radikalini ($\cdot OH$), ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot -}$) ve kararlı bir radikal olan DPPH'ı süpürme aktivitesinin pozitif kontrollerden daha iyi olduğu gözlenmiştir. Uçucu yağın, hidrojen peroksidi süpürme aktivitesi göz ününe alındığında ise; uçucu yağın, kurkumin ve BHT'den daha düşük, askorbik asitle benzer süpürme aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Elde edilen verilere dayanılarak, kereviz tohumu uçucu yağının radikalleri temizleyerek in vitro antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doğal bir antioksidan kaynak olabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae), kereviz, serbest radikal, uçucu yağ, antioksidan, GC-MS.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Serap ŞAHİN BAŞAK. wserap@yahoo.com; Tel: (346) 219 10 10 / 2143.

Makale metni 02.09.2008 tarihinde dergiye ulaşmış, 28.10.2008 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.03.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Chemical composition and in vitro antioxidant activity of *Apium graveolens* Linn. (apiaceae) seeds essential oil

Extended abstract

Apium graveolens Linn. (Apiaceae), grows widely in the foothills of North-Western Himalayas and the outlying hills of Punjab, Himachal Pradesh and Uttar Pradesh. Celery (*Apium graveolens*) is one of the most well known plants used in the history of mankind as a medicament or spice. Celery seeds are reported to possess carminative, diuretic aphrodisiac, anti-inflammatory, and analgesic properties. Celery seeds have been used for medicinal purposes as rheumatoid arthritis, bronchitis, dropsy and asthma.

Because of essential oils have been discovered to have many functional properties such as antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities, many research groups are focusing their investigation in the pharmacological actions.

Free radicals, which have one or more uncoupled electrons, are produced in normal or pathological cell metabolism. Reactive oxygen species (ROS) are various forms of activated oxygen which including superoxide anion radicals (O_2^-) and hydroxyl radicals (OH) as well as non-free radical species hydrogen peroxide (H_2O_2) and the singlet oxygen (1O_2). The generation of ROS beyond the antioxidant capacity of a biological system gives rise to oxidative stress. Free radical oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of a variety of human diseases such as atherosclerosis, diabetes mellitus, hypertension, inflammation and cancer.

The present study was designed to determine chemical composition and in vitro antioxidant activity of the essential oil, obtained by using a Clevenger distillation apparatus of *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) seeds. The antioxidant activities were determined by using four complementary in vitro assays; inhibition of oxygen radicals such as hydroxyl and superoxide radicals, hydrogen peroxide and stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical.

The chemical composition of the essential oil from celery seeds was analyzed by GC-MS and resulted in the identification of 19 compounds, representing

96.54% of the total oil; d-limonene (87.10%), α -terpinolene (2.87%), 2- α -pinene (1.55%) and p-cymen (1.19%) were the major components.

It was determined that essential oil of *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) seeds, scavenging hydroxyl radicals (OH) generated by Fe^{3+} -ascorbate-EDTA- H_2O_2 system. Hydroxyl radical scavenging activity of essential oil greater than BHT and curcumin, which used positive standarts. Because the ascorbic acid was in a experiment of hydroxyl radical environment, it was not used as a positive standard in hydroxyl radical scavenging inhibition. Curcumin's hydroxyl radical scavenging activity have greater than BHT.

Essential oil and positive standards have been found to scavenged superoxide radicals (O_2^-) generated by a xanthine and xanthine oxidase system. It was similar to hydroxyl radical scavenging activity, essential oil have possess greatest scavenging property of superoxide radicals. Süperoxide radical scavenging activity of standarts decrease; curcumin, BHT and ascorb acid, respectively.

Reducing property of essential oil of stable free radicals DPPH radicals were observed, essential oil greatest reducing activity among all samples. DPPH radical reducing activity of standarts decrease; ascorbic acid, curcumin and BHT, respectively.

It was seen that all examples had lower hydrogen peroxide scavenging properties than the curcumin being used as a positive control. The other positive control BHT was found to have a higher hydrogen peroxide scavenging properties than the essential oil and ascorbic acid. Hydrogen peroxide scavenging properties of essential oil similar to ascorbic acid.

Then data was further supported by total flavonoid, total phenolics and total antioxidant analysis indicating that the antioxidative potential of the oil.

In conclusion, the results presented here show that essential oil of celery seeds have possessed antioxidant activity and could be considered as a natural antioxidant source.

Keywords: *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae), celery, free radical, essential oil, antioxidant.

Giriş

Apium graveolens Linn. (Apiaceae), kuzeybatı Himalayaların dağ eteklerinde ve Punjab, Himachal Pradesh ile Uttar Pradesh'in uzak tepelerini kapsayan coğrafyada yetişmektedir. Genellikle 'Ajmod' olarak bilinmekte ve meyveleri ise kereviz tohumu olarak adlandırılmaktadır (Bahar vd., 2002). Kereviz (*Apium graveolens*), insanlık tarihinde tıbbi amaçlı veya baharat olarak kullanıldığı bilinen önemli bitkilerden biridir. Bitkinin tümü, özellikle yapraklar ve kökleri, spesifik tat ve aromatik kokuya sahiptir (Popovic vd., 2006).

Kereviz tohumunun karminatif, diüretik, anti-inflamatuvar ve analjezik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Sultana vd., 2005; Popovic vd., 2006). Kereviz tohumu ayrıca romatoid artrid, bronşit ve astımda iyileştirici olarak da kullanılmaktadır (Satyavati ve Raina, 1976; Wichtl, 1994). Daha önce yapılan çalışmalarda kereviz tohumu uçucu yağının antibakteriyel ve antifungal özellikleri göstermiştir (Lewis vd., 1985; Atta ve Alkofahi, 1998). Uçucu yağlar, bitkilerin birçok bölümünde bulunmaktadır.

Uçucu yağlar birçok bitkide bulunan doğal türlerdir. Bitkisel kaynaklı uçucu yağlar çok kompleks yapıya sahip olup; yapıları gereği uçucu, suda çok az veya hiç çözünmeyen, keskin ve genellikle hoş kokulu türlerdir (Tanker ve Tanker, 2003). Uçucu yağlar bitkilerin yaprak, çiçek, kök, gövde gibi farklı kısımlarında bulunurlar ve bitkinin özel yağ hücrelerinde, yağ geçitlerinde depolanırlar (Sangwan vd., 2001). Uçucu yağlar, bitkilerden elde edildiklerinde kimyasal olarak saf olmayıp birçok bileşen içermektedirler. Bazen bir uçucu yağ türünde 100 ayrı madde saptanabilmektedir (Sotomayor vd., 2004). Her uçucu yağ taşıyan bitkinin kendine özgü kokusu ve aromaterapik özellikleri, o uçucu yağı oluşturan maddelerin kombinasyonu ve derişimlerine bağlıdır (Carrapiso vd., 2002). Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar; özellikle ilaç, gıda ve kozmetik sektörlerinin vazgeçilmez bir parçasıdır.

Uçucu yağların antimikrobiyal, antioksidan, antikanser vb., gibi birçok fonksiyonel özelliğe sahip oldukları keşfedildiğinden (Hammer vd., 1999; Jayaprakasha vd., 2002; Lee ve Shibamoto, 2002; Vardar-Unlü vd., 2003) birçok araştırma grubu, uçucu yağların farmakolojik özelliklerinin araştırılmasına odaklanmıştır (Benencia ve Courreges, 2000; Mahmoud ve Croteau, 2001; Carnesecchi vd., 2002).

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve normal veya patolojik hücre metabolizma süreçlerinde oluşan türlerdir. Reaktif oksijen türleri (ROT), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikalleriyle (OH) birlikte, serbest radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijeni (1O_2) de içeren, oksijenin farklı aktif formlarıdır (Halliwell, 1994; Squadriato ve Peyor, 1998). Reaktif oksijen türlerinin vücutta meydana getirdiği hasarları önlemek üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri adı verilir. Reaktif oksijen türleri oluşumunun biyolojik sistemin antioksidan kapasitesinden daha fazla olması, oksidatif stres oluşumuna yol açmaktadır (Gutteridge ve Halliwell, 1994; Sies, 1991). Serbest radikallerden kaynaklanan oksidatif stres ise atheroskleroz, diyabet, yüksek tansiyon, inflamasyon ve kanser gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol almaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Bu çalışmada *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın, in vitro antioksidan aktivitesinin ve kimyasal bileşiminin saptanması amaçlanmıştır. Uçucu yağın antioksidan aktivitesi; hidroksil (OH), süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil (DPPH) radikalleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'i süpürme aktiviteleri incelenerek, dört farklı yöntemle çalışılmıştır. Antioksidan aktiviteyle bağlantılı olan toplam flavonoid, toplam fenol ve toplam antioksidan içerik çalışılarak, elde edilen veriler desteklenmiştir. Uçucu yağın kimyasal bileşimi GC-MS analiziyle belirlenmiştir.

Materyal ve yöntem

Bitki materyalinin elde edilmesi

Kereviz tohumları Sivas ilinden yerel marketten temin edilmiş ve Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Yrd. Doç. Dr. Erol DÖNMEZ tarafından tanımlanmıştır.

Uçucu yağ elde edilmesi

Havanda ezilen 100g örnek clevenger cihazında 500 mL destile su ile 3 saat süresince su buharı distilasyon yöntemiyle özütlenmiştir. Elde edilen uçucu yağlar karanlıkta ve +4 °C'de saklanmıştır.

HS-GC-MS analizi

Apiumgraveolens Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi TÜBİTAK-MAM (Gebze-Kocaeli)'de Terma GC-MS sistemiyle yapılmıştır. Trace-GC-ultra sistemi, Agilen Innova kapiler kolonla (uzunluk=60m, iç çap=0.25mm ve film kalınlığı=50µm) desteklenen thermo-FINNIGAN Trace-DSQ Mass spektrometre ile birleştirilmiştir.

Headspace koşulları - 1 mL uçucu yağ örneği (1/100 oranında asetonla seyreltilmiş) 85 °C sıcaklığa sahip iğne ile enjekte edilerek, 80 °C'de 15 dakika bekletilmiş ve 90 °C'de GC'ye transfer edilmiştir.

GC-MS koşulları - Enjektör sıcaklığı 200 °C'ye ayarlanmış ve akış hızı 1 mL dk⁻¹ olan helyum gazı taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Sıcaklık programlamasına 50 °C'de 2 dk beklenerek başlanmış, dakikada 5 °C arttırılarak 250 °C'a ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 5 dakika beklenmiştir. MS koşulları ise sırasıyla; transfer sıcaklığı 250 °C, mass selective dedektör sıcaklığı 200 °C, iyonizasyon enerjisi 70 eV olup, m/z=50-450 aralığı taranmıştır. Bileşiklerin saptanmasında rölatif alikonulma indeksleri (RI) ile, NIST02 ve WILEY07 MS kütle spektrum haritalarından yararlanılmıştır.

Hidroksil radikalini süpürme aktivitesi

Bu amaçla 3 mL'lik deney ortamına uçucu yağın n-hekzanda seyreltilerek hazırlanmış farklı derişimlerdeki çözeltilerine, 100 µL 3.0 mM deoksiriboz, 100 µL 1 mM FeCl₃, 100 µL 1 mM

EDTA, 100 µL 1 mM askorbik asit ve 100 µL 1 mM H₂O₂ eklenerek son hacim 20 mM fosfat tampon (pH 7.4) ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Tepkime karışımı 37 °C 'ta 1 saat inkübe edilmiştir. 1 mL % 1'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ve 1 mL % 2.8'lik trikloroasetik asit (TCA) eklenerek 30 dakika kaynatılmıştır. Açığa çıkan malondialdehitin (MDA), TBA ile oluşturduğu renkli kompleksin 532 nm dalga boyundaki absorbansı kontrol örneğe (100 mL deoksiriboz, 2.9 mL pH 7.4 fosfat tampon) karşı okunmuştur (Kunchandy ve Rao, 1990).

Uçucu yağın ve standartların inhibisyon yüzde-leri aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Antioksidan besin katkı maddesi olarak kullanılan butillenmiş hidroksi toluen (BHT), ve antioksidan bir bitki bileşeni olan kurkumin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Süperoksit radikalini temizleme aktivitesi

Bu amaçla 2 mL'lik deney ortamına uçucu yağın hekzanda seyreltilerek hazırlanmış farklı derişimlerdeki çözeltilerine, 100 µL 2 nM ksantin, 100 µL 12 nM NBT, 100 µL 1.0 U mL⁻¹ ksantin oksidaz ve 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) eklendi. 25 °C'ta 10 dakika inkübe edildikten sonra 560 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları kontrole (100 µL NBT, 1.9 mL tampon) karşı okunmuştur (Robak ve Gryglewski, 1988). Uçucu yağın inhibisyon yüzde-leri hidroksil radikalini temizleme özelliğindeki gibi hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak BHT, kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır.

Hidrojen peroksit temizleme aktivitesi

Uçucu yağın metanolde seyreltilerek hazırlanmış farklı derişimlerdeki 0.6 mL çözeltilerine 0.17 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile hazırlanmış olan 2 mM hidrojen peroksit çözeltilisinden 0.6 mL eklenmiştir. Örnekler, 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek 230 nm dalga boyundaki absorbansları kontrol örneğe (0.6 mL 2 mM H₂O₂, 0.6 mL metanol) karşı okunmuştur (Ruch vd.,1989). Uçucu yağın inhibisyon yüzde-leri

hidroksil radikalini temizleme özelliğindeki gibi hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak BHT, kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır.

DPPH radikalini temizleme aktivitesi

Uçucu yağın, metanolle seyreltilerek hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltilerine metanolde hazırlanan DPPH çözeltilerinden (% 0.004) 5 mL eklenerek 30 dakika inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbanları 517 nm dalga boyunda kontrol örneğe (5 mL DPPH çözeltilisi) karşı okunmuştur (Cuendet vd., 1997). Uçucu yağın inhibisyon yüzdeleri hidroksil radikalini temizleme özelliğindeki gibi hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak BHT, kurkumin ve askorbik asit kullanılmıştır.

Toplam flavanoid içeriğinin saptanması

Uçucu yağın metanolde çözülerek hazırlanan örneklerin 1 mL'sine 1mL % 2'lik metanolik $AlCl_3$ çözeltilisi eklenmiş ve tepkime karışımı 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Örneklerin absorbanları 394 nm dalga boyunda kontrol örneğe (1 mL metanol, 1 ml % 2'lik $AlCl_3$) karşı okunmuştur (Lamaison vd., 1990). Flavanoid derişimi kuersetin standart eğrisi çizilerek hesaplanmış ve uçucu yağların toplam flavanoid miktarları, $mg\ g^{-1}$ yağ şeklinde kuersetin eşdeğeri olarak verilmiştir.

Toplam fenol içeriğinin ölçümü

Uçucu yağın toplam fenol içeriklerinin saptanmasında Folin-Ciocalteu belirteci kullanılmıştır (Taga ve Ark., 1984). Metanol:su (60:40, v/v) ile hazırlanmış olan % 0.3'lük HCl ile seyreltilmiş 150 μ L uçucu yağ örneklerine 3 mL % 2'lik Na_2CO_3 eklenmiştir. 2 dakika sonra 150 μ L Folin-Ciocalteu belirteci (1:1, v/v distile su ile seyreltilmiş) ilave edilerek, 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve örneklerin absorbanları 765 nm dalga boyunda kontrol örneğe (150 μ L metanol, 150 μ L Folin-Ciocalteu belirteci ve 3 mL Na_2CO_3) karşı okunmuştur. Standart eğrinin hazırlanması için metanol: su (50:50, v/v)'da hazırlanan gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. Uçucu yağın toplam fenol içeriği $mg\ g^{-1}$ yağ şeklinde gallik asit eşdeğeri olarak verilmiştir.

Toplam antioksidan kapasitenin saptanması

Yöntemin temeli asidik Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesiyle asidik pH'ta yeşil renkli fosfat/Mo (V) kompleksinin oluşmasına dayanmaktadır (Prieto vd., 1999). Uçucu yağlarının

metanolde çözülmesiyle hazırlanan örneklerden 0.2 mL alınmış ve 2 mL belirteç çözeltilisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) eklendikten sonra 95 °C'ta 90 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler buz banyosunda oda sıcaklığına soğutulmuş ve 695 nm dalga boyunda kontrol örneğe (0.2 ml metanol, 2 mL belirteç çözeltilisi) karşı okunmuştur. Toplam antioksidan kapasite, α -tokoferol asetat standart eğrisi çizilerek hesaplanmış ve uçucu yağların toplam antioksidan kapasiteleri mM α -tokoferol asetat g^{-1} yağ şeklinde verilmiştir.

İstatistiksel çalışmalar

Araştırma kapsamında yapılan tüm deneysel çalışmalar üç tekrarlı yapıp, sonuçlar standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. Sigma Plot grafik ve istatistik programı kullanılarak 't' regrasyon testi uygulanmış ve anlamlılık için $p < 0.01$ seçilmiştir.

Deneysel çalışma sonuçları

Uçucu yağın GC-MS analizi

Uçucu yağların kimyasal bileşimleri mevsim, iklim koşulları, analiz şartları, toplanma zamanı vb., gibi birçok parametreden etkilendiğinden, öncelikle uçucu yağın kimyasal bileşimi saptanmış ve Tablo 1'de verilmiştir.

Apium graveolens Linn. (Apiaceae) çekirdeklerinden elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi sonucunda, uçucu yağın % 96.54'üne karşılık gelen 19 bileşen saptanmıştır. d-limonen (87.10%), α -terpinolen (2.87%), 2- α -pinen (1.55%) ve p-simen (1.19%) ilk dört ana bileşen olarak gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda kereviz tohumu uçucu yağının ilk iki ana bileşeni limonen ve selinen olarak bulunurken, başka bir çalışmada ise santanolün alfa ve beta formları, eudosmolun alfa ve beta formları, apiol ve myriscin ana bileşenler olarak saptanmıştır (Wichtl ve Bisset, 1994; Barnes vd., 2002). Diğer bir çalışmada da kereviz tohumu uçucu yağında limonen (50.9%), β -selinen (19.53%), 3-n-bütülfitalid (6.92%), nerolidol (2.29%), α -selinen (1.63), β -pinen (1.22%), d-karvon (1.86%), n-amilbenzen (1.63%), β -myrecen (1.3%) ve cis limonen bileşenleri yüksek oranlarda olmak üzere 44 bileşen saptanmıştır (Jagan Mohan Rao vd., 2000). Kereviz tohumu uçucu yağının verimi % 0.52 v/w olarak bulunmuştur.

Tablo 1. *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi

No	Bileşen	RI ^a	^b % Bileşim
1	kamphen	949	0.06
2	2- α -pinen	974	1.55
3	α -myrcen	998	0.96
4	cis-sabinen hidrat	1009	0.34
5	d-limonen	1027	87.10
6	1,8-sineol	1034	0.28
7	menta-1,4,8-trien	1036	0.32
8	γ -terpinen	1052	0.62
9	p-simen	1068	1.19
10	α -terpinolen	1074	2.87
11	6-butyl-1,4-sikloheptadien	1102	0.06
12	pentenil benzen	1146	0.59
13	linalool	1198	0.09
14	kamphor	1211	0.07
15	dihidrokarvon	1251	0.07
16	3-Ethoxy-p-menth-1-en-8-ol	1256	0.06
17	karvomenthenal	1258	0.05
18	cis-dihidrokarvon	1264	0.14
19	(-)-trans-pinokarvilasetat	1267	0.12
	Toplam		96.54

^a Alıkonma indeksi

^b Uçucu yağ bileşenlerinin % bağıl bulunma oranları

Antioksidan kapasite

Daha önce yapılan çalışmalarda tek yöntemin antioksidan aktivitenin belirlenmesinde yeterli olamayacağı, bu nedenle antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi için birden fazla yöntemin gerekli olduğu belirtilmiştir (Frankel vd., 1994; Koleva vd., 2002). Çalışılan materyalin polar veya apolar olmasına göre ve kullanılan test yöntemlerine göre materyalin antioksidan aktivitesinde farklılıklar gözlenmektedir. Bazı test yöntemleri lipofilik türlerin antioksidan özelliklerinin saptanmasında kullanılırken, bazı yöntemler ise hidrofilik ve/veya lipofilik türlerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Kulisic vd., 2004). Uçucu yağların seyreltilmeden ve farklı çözücülerde seyreltilerek (test yönteminde kullanılan tampon, tween 80, diklorometan, metanol, hekzan) antioksidan aktivitelerinin saptandığı çok sayıda yayın bulunmaktadır (Burits ve Bucar, 2000; Burits vd., 2001; Grassmann vd., 2003; Mımıca-Dukic vd.,

2004; Jirovetz vd., 2006). Antioksidan aktivitenin doğru saptanmasında, çalışılan materyalin optimum derişiminin saptanması gereklidir. Çünkü, kullanılan çözücü ve test yöntemine göre; materyalin bazı derişimlerinde kullanılan çözücü nedeniyle oluşan bulanıklık nedeniyle antioksidan aktivite ölçülememekte, bazı derişimlerde ise, materyal antioksidan özellik göstermemektedir. Bu nedenle materyalin birçok farklı derişimde çalışılmalıdır.

Sonuç olarak antioksidan aktivite, kullanılan materyalin derişimi, doğası ve fizikokimyasal özellikleri ile seçilen yöntemle göre farklılık göstermektedir (Koleva vd., 2002). Bu nedenle, *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın antioksidan aktivitesi sırasıyla; hidroksil (\cdot OH) ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve kararlı serbest radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'i inhibisyon özellikleri çalışılarak, dört farklı yöntemle incelenmiştir. Uçucu yağ ve pozitif kontrollerin (kurkumin, askorbik asit ve BHT) hidroksil, süperoksit ve DPPH radikalleri ile hidrojen peroksidi %50 inhibe eden derişimleri (IC_{50} ; $\mu g mL^{-1}$) Tablo 2'de verilmiştir. IC_{50} değerleri Sigma Plot Grafik ve İstatistik Programında (Sigma Plot 9.0) inhibisyon yüzdelere karşı uçucu yağın derişim değerleriyle çizilen doz-bağımlı eğrilerden hesaplanmıştır.

Tablo 2. *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın ve pozitif kontrollerin hidroksil, süperoksit ve DPPH radikalleri ile hidrojen peroksit için %50 inhibisyon sağlayan (IC_{50} ; $\mu g mL^{-1}$) değerleri

Örnek	Hidroksil	Süperoksit	DPPH	Hidrojen Peroksit $IC_{50} \times 10^4$
Uçucu yağ	0.672 \pm 0.045	1.22 \pm 0.32	4.44 \pm 0.45	0.363 \pm 0.007
Kurkumin	13.563 \pm 0.62	8.655 \pm 0.222	9.60 \pm 0.461	3.70 \pm 0.10
Askorbik asit	Tespit edile-	92.45 \pm 4.143	6.275 \pm 3.358	17.57 \pm 2.864
BHT	32.00 \pm 0.120	92.45 \pm 4.143	23.750 \pm 0.500	6.984 \pm 0.337

Hidroksil radikali süpürme aktivitesi

Oksijen radikalleri arasında en reaktif ve zararlı olan tür hidroksil radikalidir. Uçucu yağın hidroksil radikalini süpürme özelliği, deoksiribozum

indirgenmesi ölçümüyle saptanmıştır. Uçucu yağın deoksiribozu koruma özelliği, şekerden fenton tepkimesiyle oluşan hidroksil radikallerini süpürme özelliğinin bir ölçüsüdür ve uçucu yağın antioksidan kapasitesi şekerin indirgenmesini önlemektedir. Uçucu yağın ve pozitif kontrollerin hidroksil radikalini %50 inhibe eden derişimleri (IC₅₀) Tablo 2’de görülmektedir. Azalan IC₅₀ değeri artan antioksidan aktiviteyle paralel olduğundan, uçucu yağın hidroksil radikali süpürmede $0.672 \pm 0.045 \mu\text{g mL}^{-1}$ olan en düşük IC₅₀ değeriyle, en yüksek aktiviteye sahip olduğu, kurkuminin hidroksil radikali süpürme aktivitesinin ise BHT’den daha yüksek olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrollerden olan askorbik asit deney ortamında bulunduğundan, askorbik asidin hidroksil radikali süpürme aktivitesi çalışılmamıştır.

Süperoksit radikalini temizleme aktivitesi

Uçucu yağın, ksantin /ksantin oksidaz sistemi ile oluşturulan süperoksit radikalini de temizlediği gözlenmiştir. Tablo 2’de verilen IC₅₀ değerleri göz önüne alındığında; uçucu yağın en düşük IC₅₀ değeriyle en yüksek süperoksit radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrollerin süperoksit radikali süpürme aktivitelerinin ise; askorbik asit, BHT ve kurkumin sıralamasıyla arttığı saptanmıştır.

DPPH radikalini temizleme aktivitesi

DPPH ölçümü, uçucu yağın elektron veya hidrojen atomu alma özelliğinin araştırılmasına dayanmaktadır. Uçucu yağın antioksidan aktivitesindeki artışla DPPH’nin karakteristik mor rengi açılmaktadır. Tablo 2’de verilen sonuçlara göre; hidroksil ve süperoksit radikallerini süpürme aktivitelerine benzer olarak uçucu yağın, DPPH radikali temizlemede en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrollerde DPPH radikali süpürmede en yüksek aktivite askorbik asitte, daha sonra kurkuminde gözlenirken en düşük aktivite BHT’de gözlenmiştir.

Hidrojen peroksit temizleme aktivitesi

Hidrojen peroksidin kendisi çok reaktif olmakla birlikte, en reaktif radikal olan hidroksil

radikalinin oluşumuna sebep olduğundan, hücre içinde bazı durumlarda toksik olmaktadır (Gülçin vd., 2003). Bu nedenle, hidrojen peroksidin uzaklaştırılması hücredeki antioksidan savunma için oldukça önemlidir. Tablo 2’deki sonuçlara göre, uçucu yağın hidrojen peroksit temizleme aktivitesinin, kurkumin ve BHT’den daha düşük iken askorbik asitle benzer aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Apium graveolens Linn. (Apiaceae) tohum ve yapraklarının farklı çözücülerle elde edilen özütleriyle yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Kereviz tohumu metanol özütünün antihepatotoksik özellik gösterdiği, Wistar ratlarda hepatokarsinogenesizi inhibe ettiği saptanmıştır (Singh ve Handa, 1995; Sultana vd., 2005). Başka bir çalışmada ise, kerevizin farklı özütlerinin albino ratlarda CCl₄ kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (Ahmed vd., 2002). Kereviz tohumu metanol özütünden böcek uzaklaştırıcı ve antifungal bileşenler izole edilmiş, kereviz tohumundan ise antioksidan bileşenler ile siklooksijenaz ve topoizomeraz inhibitörleri izole edilmiştir (Momin ve Nair, 2001; 2002). Kerevizin sulu özütünün antihyperlipidemik, etanol özütünün antiinflamatuvar özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Tsi vd., 1995; Atta ve Alkofahi, 1998). Kereviz tohumu ve yapraklarının eter, kloroform, etil asetat, n-bütanol ve sulu özütlerinin hidroksil ve DPPH radikalleri süpürdükleri, lipozomal peroksidasyon düzeyini düşürdükleri; bu özütlerle beslenen ratların kan ve karaciğer homejanatında antioksidan sistemler (GSHP_x, GSHR, P_x, CAT, XOD, GSH içerikleri ve lipizomal peroksidasyon miktarı) çalışıldığında, tüm özütlerin, özellikle n-bütanol özütünün, koruyucu etki gösterdikleri saptanmıştır (Popoviç vd., 2006).

Kereviz tohumu uçucu yağının daha çok kimyasal bileşimiyle ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte; *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumu uçucu yağının farelerde benzo[a] pyren kaynaklı tümör ilerlemesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Zheng vd., 1993). Kereviz tohumundan süperkritik akış ekstraksiyonu ve hidrodistilas-

yonla elde edilen uçucu yağının antimikribyal özeliğe sahip olduğu saptanmıştır (Misic vd., 2008).

***Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın toplam flavonoid, fenol miktarı ve toplam antioksidan kapasitesi**

Bitki uçucu yağları çoğunlukla terpenik bileşikler olan monoterpenler, seskuiterpenler ve bunların oksijenlenmiş türevlerini içermektedirler (Russell ve Southwell, 2002; Rasooli ve Owlia, 2005). Uçucu yağların farklı biyolojik etkinliklere sahip oldukları ve bu etkinliklerin içeriklerinde esas bileşenler olan monoterpenlerden kaynaklandığı bildirilmektedir (do Amaral ve Ark., 2007). Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (Skerget ve Ark., 2005). Bu bileşiklerin içerisinde en fazla bulunanları flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik terpenlerdir (Javanmardi ve Ark., 2002). Uçucu yağın antioksidan aktivitesini desteklemek amacıyla uçucu yağlarda az miktarlarda bulunan flavonoid ve fenol miktarları da çalışılmıştır. *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın mg g⁻¹ yağ şeklinde kuersetin eşdeğeri olarak verilen toplam flavonoid ve mg g⁻¹ yağ şeklinde gallik asit eşdeğeri olarak verilen toplam fenol miktarı ile mM α -tokoferol asetat g⁻¹ yağ olarak verilen toplam antioksidan kapasitesi Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın toplam flavonoid, fenol miktarı ve toplam antioksidan kapasitesi

Örnek	Toplam flavonoid	Toplam fenol	Toplam antioksidan
Uçucu yağ	0.679±0.040	4.92 ± 0.03	9.50 ± 0.02

Bitkilerde, sebze ve meyvelerde bulunan fenolik türler, antioksidanların büyük bir sınıfını oluşturmaktadır (Ho vd., 1992). Diyetel fenolik türlerin en önemli grupları, antioksidan özelliklere

sahip olan fenoller, fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Yağlarda bulunan fenollerin ve diğer bileşiklerin antioksidan aktiviteleri bir çok araştırmacı tarafından geniş bir şekilde çalışılmaktadır (Baldioli vd., 1996; Litridou vd., 1997; Visioli vd., 1998).

Sonuçlar

- *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşimi GC-MS analiziyle saptanmıştır.
- *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın hidroksil, süperoksit ve DPPH radikalleri ile hidrojen peroksidi temizleyerek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.
- *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın, toplam flavonoid ve toplam fenol miktarı ile toplam antioksidan aktivite değerlerinin antioksidan aktiviteyle pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır.
- Tüm sonuçlar doğrultusunda; *Apium graveolens* Linn. (Apiaceae) tohumlarından elde edilen uçucu yağın antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve doğal bir antioksidan kaynak olarak göz önüne alınabileceği saptanmıştır.

Kaynaklar

- Ahmed, B., Alam, T., Varshney, M., Khan, S.A., (2002). Hepatoprotective activity of two plants belonging to the Apiaceae and the Euphorbiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**(3), 313-316.
- Atta, A.H., Alkofahi, A., (1998). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **60**, 117-124.
- Bahar, A., Tanveer, A., Manoj, V., Shah, A. K., (2002). Hepatoprotective activity of two plants belonging to the Apiaceae and the Euphorbiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 313-316.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., Montedoro, G.F., (1996). Antioxidant activity of tocoferols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of American Chemical Society*, **73**, 1589-1593.

- Barnes, J., Anderson, A.L., Phillipson, J.D., (2002). Herbal Medicines, Barnes J, Anderson AL, Phillipson JD (eds). Pharmaceutical Press: London, Chicago; 118.
- Benencia, F., Courreges, M.C., (2000). In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. *Phytotherapy Research*, **14**, 495-500.
- Burits, M., Asres, K., Bucar, F., (2001). The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy Research*, **15**(2), 103-8.
- Burits M, Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, **14**(5), 323-328.
- Carnesecchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F., Raul, F., (2002). Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **301** (2), 625-630.
- Carrapiso, A.I., Jurado, A., Timón, M.L., García, C., (2002). Odor-active compounds of Iberian hams with different aroma characteristics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**(22):6453-8.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O.H., (1997). Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, **80**, 1144-1152.
- do Amaral, J.F., Silva, M.I., Neto, M.R., Neto, P.F., Moura, B. altering expression of deoxyxylulose A., de Melo, C.T., de Araújo, F.L., de Sousa, D.P., de Vasconcelos, P.F., de Vasconcelos, S.M., de Sousa, F.C., (2007). Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biol Pharm Bull.*, **30**(7), 1217-1220.
- Frankel, E.N., Huang, S.W., Kanner, J. and J., German, B., (1994). Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**, 1054-1059.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Vollmann, R., Elstner, E.F., (2003). Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**(26), 7576-7582.
- Gutteridge, J.M.C., and Halliwell, B., (1994). Oxidative stress. In, Antioxidants in Nutrition, Health and Disease., Oxford University Press, Oxford., 90-102.
- Gülçin, I., Büyükokuroglu, M.E., Oktay, M., Küfrevioğlu, O.I., (2003). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology*, **86**(1):51-8.
- Halliwell, B., (1994). Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence? *Lancet*. **91**, 721-724.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., (1989). Free Radicals in Biology and Medicine, 2nd ed, Clarendon Press, Oxford. 416-494.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T.V., (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**, 985-990.
- Ho, C.T., Lee, C.Y., Huang, M.T., (1992). Phenolic compounds in Foods and Their Effect on Health. Analysis, Occurrence, and Chemistry, Washington DC: *American Chemistry Society*, **1**, 2-7.
- Jagan Mohan Rao, L.; Nagalakshmi, S., Pura Naik, J., Shankaracharya, N.B., (2000). Studies on chemical and technological aspects of celery (*Apium graveolens*. Linn) seed. *Journal of Food Science and Technology*, **37**(6), 631-635.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M., (2002). Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**(21), 5878-5883.
- Jayaprakasha, G.K., Jena, B. S., Negi, P.S., Sakariah, K.K., (2002). Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: A byproduct from curcumin production. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C*, **57C**, 828-835.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E., (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**(17), 6303-6307.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N., (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, **13**, 8-17.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, **85**(4), 633-640.
- Kunchandy, E., Rao, M.N.A., (1990). Oxygen Radical Scavenging Activity of Curcumin. *International Journal of Pharmacology*, **58**, 237-240.
- Lamaison, J.L., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., (1990). Tannin content and inhibiting activity of

- elastase in Rosaceae. *Annual Pharmaceutical*, **48(6)**:335-40.
- Lee, K.G., Shibamoto, T., (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 4947-4952.
- Lewis, D.A., Tharib, S.M., Veitch, G.B.A., (1985). The anti-inflammatory activity of celery *Apium graveolens* L. *International Journal of Crude Drug Research*, **23**, 27-32.
- Litridou, M., Linssen, J., Schols, H., Bergmans, M., Posthumus, M., Tsimidou, M., Bosiou, D., (1997). Phenolic compounds in virgin olive oils: fractionation by solid-phase extraction and antioxidant activity assessment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **74**, 169-174.
- Mahmoud, S.S., Croteau, R.B., (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy Sciences, U.S.A.* **98**, 8915-8920.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N., (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52(9)**, 2485-2489.
- Mišić, D., Zizovic, I., Stamenić, M., Ašanin, R., Ristić, M., Petrović, S.D., Skala, D., (2008). Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. *Biochemical Engineering Journal*, **42(2)**, 148-152.
- Momin, R.A., Nair, M.G., (2001). Mosquitocidal, nematocidal, and antifungal compounds from *Apium graveolens* L. seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **49(1)**, 142-145.
- Momin, R.A., Nair, M.G., (2002). Antioxidant, cyclooxygenase and topoisomerase inhibitory compounds from *Apium graveolens* Linn. seeds. *Phytomedicine*, **9(4)**, 312-318.
- Popoviç, M., Kaurinoviç, B., Triviç, S., Mimica-Dukiç, N., Bursaç M., (2006). Effect of Celery (*Apium graveolens*) Extracts on Some Biochemical Parameters of Oxidative Stress in Mice Treated with Carbon Tetrachloride. *Phytotherapy Research*, **20**, 531-537.
- Prieto, P.M., Pineda, M., Aguilar, M., (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Analytical Biochemistry*, **269**, 337-341.
- Rasooli, I., Owlia, P., (2005). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, **66(24)**, 2851-6.
- Robak, J., Gryglewski, R.J., (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, **37**, 837-41.
- Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, **10**, 1003-1008.
- Russell, M., Southwell, I., (2002). Monoterpenoid accumulation in *Melaleuca alternifolia* seedlings. *Phytochemistry*, **59(7)**, 709-16.
- Sangwan, N., S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S., (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant growth Regulation*, **34**, 3-21.
- Satyavati, G.V., Raina, M.K., (1976). Medicinal Plants of India, Indian Council of Medical Research, New Delhi, India, **1**, 80- 107
- Sies, H., (1991). Oxidative stress: Introduction. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants, Academic Press, London,
- Singh, A., Handa, S.S., (1995). Hepatoprotective activity of *Apium graveolens* and *Hygrophila auriculata* against paracetamol and thioacetamide intoxication in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **49(3)**, 119-126.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z., (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, **89(2)**, 191-198.
- Sotomayor, J.A., Martínez, R.M., García, A.J., Jordán, M.J., (2004). *Thymus zygis* subsp. *Gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52(17)**:5418-24.
- Squadriato, G.L., Peyor, W.A., (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the role of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology and Medicine*, **25**, 392-403.
- Sultana, S., Ahmed, S., Jahangir, T., Sharma, S., (2005). Inhibitory effect of celery seeds extract on chemically induced hepatocarcinogenesis: modulation of cell proliferation, metabolism and altered hepatic foci development. *Cancer letters*, **221**, 11-20.
- Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E., (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants.

- Journal of American Oil Chemists' Society*, **61**, 928-931.
- Tanker, M., ve Tanker, N., (2003). Farmakoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık fakültesi yayınları, Cilt 2. No:65: 296-297.
- Tsi, D., Das, N.P., Tan, B.K., (1995). Effects of aqueous celery (*Apium graveolens*) extract on lipid parameters of rats fed a high fat diet. *Planta Medical*, 61(1), 18-2.
- Vardar-Unlü, G., Candan, F., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, M., Donmez, E., Tepe, B., (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 63-67.
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C., (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **247**, 60-6
- Wichtl, M., (1994). Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. CRC Press, Stuttgart, (Ed.), 81-82.
- Wichtl M., Bisset, N.G., (1994). Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals, Wichtl M, Bisset NG (eds). Medpharm Scientific Publisher: Stuttgart; 446.
- Zheng, G.Q., Kenney, P.M., Zhang, J., Lam, L.K., (1993). Chemoprevention of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by natural phthalides from celery seed oil. *Nutrition and Cancer*, 19(1), 77-86.