

***PAPAVER SOMNIFERUM* L. ÇİÇEKLERİNİN ESANSİYEL
YAĞ İÇERİĞİ, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS

Alparslan GÜLTEPE

DANIŞMAN

Doç. Dr. Meltem DİLEK

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz, 2013

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

***PAPAVER SOMNIFERUM* L. ÇİÇEKLERİNİN ESANSİYEL YAĞ
İÇERİĞİ, ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Alparslan GÜLTEPE

DANIŞMAN

Doç. Dr. Meltem DİLEK

KİMYA ANABİLİM DALI

Temmuz, 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Alparslan GÜLTEPE tarafından hazırlanan “*Papaver somniferum* L. çiçeklerinin esansiyel yağ içeriği, antimikrobiyal ve antifungal özelliklerinin belirlenmesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 03/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı’ nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : (Doç. Dr. Meltem DİLEK)

Başkan : Doç. Dr. Nuray ÖZTAŞAN İmza
A.K.Ü. Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bil. Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Do. Dr. Meltem DİLEK İmza
A.K.Ü. Müh. Fak. Kimya Müh. Bölümü

Üye : Doç. Dr. Nuray ÖZTAŞAN İmza
A.K.Ü. Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bil. Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. DR. Aysel BÜYÜKSAĞIŞ İmza
A.K.Ü. Fen Edeb. Fak. Kimya Bölümü

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

03/07/2013

Alparslan GÜLTEPE

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

PAPAVER SOMNIFERUM L. ÇİÇEKLERİNİN ESANSİYEL YAĞ İÇERİĞİ,
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİFUNGAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Alparslan GÜLTEPE
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Meltem DİLEK

Haşhaş bitkisinin ülkemizde ve dünyanın birçok bölgesinde çok eski dönemlerden beri yetiştirildiği bilinmektedir. Milattan 5000 yıl önce Mezopotamya’ da yaşamış olan Sümerlerin kullandıkları dilde afyona ait bazı kelimelere ve Asurlara ait bazı kabartmalarda haşhaş resimlerine rastlanıldığı, Avrupa’ da da milattan yaklaşık 4000 yıl önce bu bitkinin bilindiği ve tarımının yapıldığı bildirilmektedir. Anadolu’ da Hititler döneminden beri haşhaş tarımının yapıldığı bir çok yazar tarafından belirtilmektedir.

Tüm dünyada ekiminden üretimine ve satışına kadar ilgi ile izlenen haşhaş, ülkemizde tohumunun %50 civarında yağ içermesi nedeniyle geleneksel olarak gıda amaçlı, kapsülünün ise ihtiva ettiği morfin, diğer alkaloidlerin ise tıbbi ve bilimsel amaçlı kullanımı yönünden önemli bir endüstriyel bitki olma özelliği taşımaktadır.

Ülkemizde ve dünyada kaliteli parfümeri ve kozmetik ürünlerin kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. Bu yaygınlaşmaya paralel olarak aromatik nitelik taşıyan bitkilerin önemi de tüm dünyada artmaktadır. Zengin bitki florasına sahip ülkemiz kokulu bitkiler açısından da zenginlik göstermektedir. Ne var ki, bir çok bitki türü, aromatik nitelikler taşıdığı bilinmesine karşın, uçucu yağ nitelikleri açısından henüz araştırılmamıştır. Haşhaş çiçeği de uçucu yağ nitelikleri ve optimal üretim koşulları açısından tam olarak araştırılmamış bir bitkidir.

Güzel kokuları ve tedavi edici özellikleri nedeniyle çoğu aromatik bitkiler endüstride ve

halk arasında yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada haşhaş çiçeğinden (*Papaver somniferum* L.) hidrodistolasyon metodu ile elde edilen uçucu yağların bileşenleri Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometresi (GC-MS) metodu ile araştırılmış ayrıca esansiyel yağı karakterize etmek için yoğunluk tayini ve kırılma indisine de bakılmıştır.

Ayrıca çiçekten elde edilen esansiyel yağın biyolojik aktivitesini incelemek amacıyla antibakteriyel zellikleri Disk Difüzyon ve Buyyonda Mikrodilüsyon yöntemleri ile, antifungal özellikleri ise Agar Difüzyon Plak Metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre haşhaş çiçeği uçucu yağının antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

2013, xii + 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: Haşhaş, haşhaş çiçeği, uçucu yağlar

ABSTRACT

M.Sc Thesis

DETERMINATION OF ESSENTIAL OIL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL PROPERTIES OF *PAPAVER SOMNIFERUM* L. FLOWERS

Alparslan GÜLTEPE

Afyon Kocatepe University

Faculty of Science and Arts

Department of Chemistry

Assoç: Doç. Dr. Meltem DİLEK

It is known that opium poppy has been grown since ancient times in both our country any many parts of the world. Some words similar to opium poppy were found in the language used by Sumerians lived in Mesopotamia 5000 years before Christ and some relief paintings of opium poppy belong to Assyrian were found. It is also known that opium poppy has been known in Europa and used in agriculture since 4000 BC. It is reported by lots of authorities that cultivation of opium poppy has been made in Anatolia since Hittites.

Opium poppy, which is followed from sowing to selling in the whole world, is an important industrial plant in our country since it is used in the food industry because of its %50 oil content and for medicinal and scientific purposes since it includes morphine and the other alkaloids.

The use of high quality perfumes and cosmetic products in our country and the whole word is becoming widespread. The importance of these aromatic plants in all over the world is parallel with this increase. Our country has also a rich flora of these aromatic plants. However, a lot of kinds of aromatic plants have not been searched about their essential oil content. Poppy flower is a kind of these plants which have not been searched yet about its essential oil content and optimum production conditions.

Lots of aromatic plants have been used in industry and by people because of their perfume and therapeutic properties. In this study volatile oils components, that were obtained from the poppy flower (*Papaver somniferum* L.) by hydrodistilled method,

will be searched by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) methods. Also to characterize the essential oil, the determination of density and index of refraction were examined.

Also in order to examine the biological activity of the essential oil obtained from the flower antibacterial properties were determined by Disc Diffusion Method and Broth Microdilution, antifungal properties were determined by the Agar Diffusion Plate Method. Obtained according to the results, antimicrobial property has been found in poppy flower volatile oil.

2013, xii + 73 pages

Key Words: Poppy, poppy flower, essential oil

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana değerli görüş ve katkılarıyla yol gösteren, sabır ve hoşgörüsüyle her zaman bana destek olan tez danışmanım ve hocam Sayın Doç. Dr. Meltem DİLEK' e;

Tez konusunun belirlenmesindeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Nuray ÖZTAŞAN' a;

GC Analizleri için Doç. Dr. Sait BULUT' a;

Mikrobiyolojik analizler için Doç. Dr. Elif KORCAN' a;

Bitki örneklerin teminini ve tanımlanmasını gerçekleştiren Afyon Alkaloid Fabrikası Haşhaş Islah ve Tohum Üretim Şube Müdürü Sayın Fatih LEBLEBİCİ' ye;

Örneklerin toplanması ve değerlendirilmesi aşamasında bilgi ve yardımları ile katkıda bulunan çalışma arkadaşlarım Hasan ÇİÇEK, Sefa KURT, Hasan YELKEN ve Muhammed ZENGİN' e;

Çalışmam süresince ilgi ve desteklerini esirgemeyen eğitimim için her türlü fedakârlığı gösteren, hayatım boyunca desteğini ve sevgisini hissettiğim eşime ve canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Alparslan GÜLTEPE
AFYONKARAHİSAR, 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	2
2.1 Haşhaş Bitkisinin Tarihçesi	2
2.2 Haşhaş' ın Genel Özellikleri.....	2
2.3 Haşhaş' ın Oluşum Süreci.....	4
2.4 Dünya' da ve Türkiye' de Haşhaş Ekimi Yapılan Yerler	5
2.5 Haşhaş' tan Faydalanma Şekilleri.....	7
2.5.1 Kapsülden Faydalanma.....	7
2.5.2 Tohumdan Faydalanma	9
2.6 Uçucu Yağlar ve Genel Özellikleri.....	9
2.7 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri	11
2.7.1 Su Buharı Damıtması	11
2.7.1.1 Suyula Damıtma	11
2.7.1.2 Buharla Damıtma	12
2.7.1.3 Su ve Buharla Damıtma	12
2.7.2 Kuru Distilasyon.....	12
2.7.3 Hidrodifüzyon.....	13
2.7.4 Ekstraksiyon Yöntemi	13
2.7.4.1 Organik Çözücü Ekstraksiyonu	13
2.7.4.2 Maserasyon	14
2.7.4.3 Anfloranj	14
2.7.4.4 Soxhlet Ekstraksiyonu	14
2.7.4.5 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	15
2.7.4.6 Mikrodalga Ekstraksiyonu	17
2.7.4.7 Solvent İçermeyen Mikrodalga Ekstraksiyonu.....	17

2.7.4.8 Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu.....	18
2.7.4.9 Katı Faz Mikro Ekstraksiyon.....	19
2.7.5 Presleme Yöntemi	19
2.8 Uçucu Yağların Kalite Parametreleri.....	20
2.8.1 Verim.....	20
2.8.2 Kimyasal Yapısı	20
2.8.3 Özgül Ağırlık.....	20
2.8.4 Kırılma İndisi.....	21
2.8.5 Alkoldeki Çözünürlüğü	21
2.8.6 Optik Çevirme	21
2.9 Uçucu Yağların Sınıflandırılması	21
2.9.1 Kimyasal Bileşimlerine Göre Uçucu Yağlar	22
2.9.1.1 Terpenik Maddeler.....	22
2.9.1.2 Aromatik Özelliklerine Göre Uçucu Yağlar	26
2.9.1.3 Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre Uçucu Yağlar.....	27
2.10 Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri	27
2.10.1 Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Tespit Edilmesi .	28
2.11 Uçucu Yağların Farmakolojik Etkisi ve Kullanım Alanları	29
2.11.1 Bitki Uçucu Yağlarının Endüstride Kullanım Alanları.....	30
2.12 Uçucu Yağları İle İlgili Yapılan Çalışmalar	31
3. MATERYAL ve METOT	37
3.1 Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler	37
3.1.1 Bitkisel Materyal	37
3.1.2 Kimyasal Maddeler.....	37
3.1.3 Aletler	38
3.2 Deneysel Çalışma	38
3.2.1 Clevenger Düzeneği ile Sudan Hafif Yağın Distilasyonu	38
3.2.2 Analitik Çalışmalar.....	40
3.2.2.1 Yoğunluk Tayini	40
3.2.2.2 Kırılma İndisi.....	40
3.2.2.3 Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrofotometresi (GC-MS).....	40
3.2.3 BF ₃ Metanol Yöntemi İle Metil Esterlerin Hazırlanması.....	42
3.2.3.1 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağlarının Yağ Asitlerinin Belirlenmesi.....	42
3.2.3.2 Gaz Kromatografisi (GC)	42
3.2.4 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi	43

3.2.4.1 Antimikrobiyal Aktivite Tespitinde Kullanılan Besiyerler	44
3.2.5 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Antibakteriyel Aktivitelerin Araştırılması. 45	
3.2.5.1 Disk Difüzyon Testi.....	46
3.2.5.2 Buyyonda Mikrodilüsyon Testi	46
3.2.6 Fungus Aktivitesinin Araştırılması.....	47
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	48
4.1 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağının Fiziksel Özellikleri	48
4.2 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağının Bileşenlerini Tespiti.....	48
4.3 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağının Doymuş ve Doymamış Yağ Asitleri.....	50
4.4 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Disk Difüzyon Tekniği İle Antibakteriyel Etkinin Saptanması	52
4.5 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Buyyonda Mikrodilüsyon Testi	53
4.6 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Antifungal Etkilerin Belirlenmesi.....	53
5. SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	67
EKLER	68

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

BF ₃	Boron trifluoride
dH ₂ O	Distile su
C ₁₀	Monoterpenler
C ₁₅₋₃	Seskiterpenler
C ₂₀	Diterpenler
C ₃₀	Triterpenler
CH ₂ Cl ₂	Diklormetan
CH ₃ OH	Metanol
n-C ₆ H ₁₄	n-Hekzan
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat

Kısaltmalar

AMC	Amoxicilin / clevulinic acid
ASE	Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
BMT	Birleşmiş Milletler Teşkilatı
CRO	Cetrixane
DMSO	Dimetil sülfoksit
D	Dilüsyon
GC	Gaz kromatografisi
GC-MS	Gaz kromatografisi / Kütle spektrofotometresi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
MAHD	Mikrodalga destekli hidrodestilasyon
McF	Mc Farland
MEM	Meropenem
MIK	Minimal inhibitör konsantrasyonu
NA	Nutrient ager
NB	Nutrient buğer
P	Penicillin
PAH	Poliaromatik hidrokarbonlar
PCB	Poliklorlanmış bifeniller
P _C	Kritik basınç
PDA	Potato dextrose agar
SFE	Süperkritik sıvı ekstraksiyonu
SFME	Çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonu
SPME	Katı-Faz mikro ekstraksiyon
TMO	Toprak Mahsulleri Ofisi
T _C	Kritik sıcaklık
VA	Vancomisin
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Haşhaş bitkisinin yapısal gösterimi.....	3
Şekil 2.2 Çiçeklenme döneminde bitkinin durumu	5
Şekil 2.3 Ana üreticiler bazında yasal haşhaş ekim alanları (%)	6
Şekil 2.4 Türkiye’ de haşhaş ekimine izin verilen iller.....	7
Şekil 2.5 Haşhaş kapsülü.....	8
Şekil 2.6 Soxhlet ekstraktörü	15
Şekil 2.7 Saf bir madde için sıcaklık-basınç faz diyagramı	16
Şekil 2.8 SFME ve MAHD şematik diagram süreçleri	18
Şekil 2.9 İzopren molekülü	22
Şekil 2.10 Bazı asiklik monoterpenlerin yapısal gösterimi.....	23
Şekil 2.11 Bazı asiklik monoterpenler	23
Şekil 2.12 Bazı monosiklik monoterpenler	24
Şekil 2.13 Bazı monosiklik monoterpenler	24
Şekil 2.14 Bazı bisiklik monoterpenler	24
Şekil 2.15 Bazı seskiterpenler	25
Şekil 2.16 Bazı seskiterpenler	25
Şekil 2.17 Diterpen tetradekatetraenal yapısı	26
Şekil 2.18 Bazı aromatik maddeler	27
Şekil 3.1 Afyon Alkaloidleri Fabrikası ekim alanları	37
Şekil 3.2 Kurutulmuş haşhaş çiçekleri	38

Şekil 3.3 Clevenger düzeneği.....	39
Şekil 3.4 Döner buharlaştırıcı ve elde edilen uçucu yağ.....	39
Şekil 3.5 Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrofotometresi (GC-MS).....	41
Şekil 3.6 Gaz Kromatografisi (GC)	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1 Haşhaş çiçeği uçucu yağının yoğunluk, kırılma indisi ve erime noktası değerleri	48
Çizelge 4.2 Haşhaş çiçeği uçucu yağının bileşenleri ve bileşenlerinin relatif yüzdeleri	48
Çizelge 4.2 (Devam) Haşhaş çiçeği uçucu yağının bileşenleri ve bileşenlerinin relatif yüzdeleri	49
Çizelge 4.3 Yağ asiti metil esteri standartları.....	50
Çizelge 4.3 (Devam) Yağ asiti metil esteri standartları	51
Çizelge 4.4 Haşhaş çiçeği uçucu yağında bulunan doymuş ve doymamış yağ asitleri..	51
Çizelge 4.5 Disk difüzyon tekniği ile antibakteriyal etkinin saptanması	52
Çizelge 4.6 Buyyonda testi ile MİK belirlenmesi	53
Çizelge 4.7 Haşhaş çiçeği uçucu yağının antifungal etkileri.....	53

1. GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada kaliteli parfümeri ve kozmetik ürünlerin kullanımları giderek yaygınlaşmaktadır. Bu yaygınlaşmaya paralel olarak aromatik nitelik taşıyan bitkilerin önemi de tüm dünyada artmaktadır. Zengin bitki florasına sahip ülkemiz kokulu bitkiler açısından da zenginlik göstermektedir. Ne var ki, birçok bitki türü, aromatik nitelikler taşıdığı bilinmesine karşın, uçucu yağ nitelikleri açısından henüz araştırılmamıştır (Öztürk 1990).

Günümüzde ekonomik yönden oldukça önemli olan tıbbi bitkilerin ve bunlara ait uçucu yağ ve etken maddelerinin değerlendirilmesi sonucunda, büyük bir kısmının ilaç, parfümeri ve endüstride kullanılabilmesinin yararlı olacağı bilinmektedir (Kırbağ vd. 2000).

Haşhaş kapsüllerinin ihtiva ettiği alkaloidler ilaç hammaddesi olarak kullanılır. Ayrıca tohumu ve yağından gıda olarak yararlanılan haşhaş, süs bitkisi olarak ta değerlendirilen önemli endüstriyel bir bitkidir. Ülkemizde morfolojik ve farmakolojik olarak en çok araştırılan *Papaveraceae* familyasına ait alt türlerden biri olan *Papaver somniferum* L.(Linnaeus) çiçeğinden uçucu yağ eldesine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Haşhaş çiçeği de uçucu yağ nitelikleri ve optimal üretim koşulları açısından tam olarak araştırılmamış bir bitkidir. Bu çalışma, *Papaver somniferum* L. türüne ait ülkemizde ilk çalışma olması yönü ile ayrıca öneme sahip olacaktır.

Bu çalışmada Afyon' un Bolvadin ilçesinde faaliyet gösteren Alkaloid Fabrikası' ndan toplanan haşhaş çiçeğinden hidrodistilasyon metodu ile elde edilen uçucu yağların bileşenleri GC ve GC-MS metodu ile araştırılmış ve elde edilen uçucu yağı karakterize etmek için diğer analitik tekniklerden de yararlanılmıştır. Ayrıca çiçekten elde edilen esansiyel yağın biyolojik aktivitesini incelemek amacıyla antibakteriyel özellikleri Disk Difüzyon ve Buyyonda Mikrodilüsyon yöntemleri ile, antifungal özellikleri ise Agar Difüzyon Plak Metodu ile belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Haşhaş Bitkisinin Tarihçesi

Haşhaş bitkisinin ülkemizde ve dünyanın birçok bölgesinde milattan önceki çağlardan beri yetiştirildiği bilinmektedir. Milattan 5000 yıl önce Mezopotamya’ da yaşamış olan Sümerlerin kullandıkları dilde afyona ait bazı kelimelere ve Asurlulara ait bazı kabartmalarda haşhaş resimlerine rastlanıldığı, Avrupa’ da da milattan yaklaşık 4000 yıl önce bu bitkinin bilindiği ve tarımının yapıldığı bildirilmektedir (İnt.Kyn.1).

Asuri lisanında manası haşhaş ve afyon anlamını veren kelimeler bulunduğu ve Asurluların afyonu tıp alanında uyku verici bir ilacın ham maddesi olarak kullandığını yazmaktadır. Mısırlılarda haşhaşı çok eski dönemlerden beri bilmektedir. Ancak ilk ekim yerinin Asya (Anadolu) olduğuna dair iddialar daha geçerlidir. Birçok kültür bitkisinin bulunduğu Türkiye’ de çok eski devirlerden beri haşhaş tarımının yapıldığı bilinmektedir. Bu nedenle Anadolu, haşhaşın anavatanı ve kültür kaynağı olması bakımından ayrıca bir öneme sahiptir (TMO 2005).

2.2 Haşhaş’ ın Genel Özellikleri

Ülkemizde geleneksel olarak tarımı yapılan haşhaş, botanikte *Papaver somniferum* L. olarak adlandırılır. Latince’ de “*fructus papaveris immaturi*”, Almanca’ da “*mohn koepfe*”, Fransızca’ da “*tete de pavot*”, İngilizce’ de “*poppy head*” olarak geçmektedir.

Bu tür, ilk olarak Linnaeus tarafından *Genera plantarum* olarak sınıflandırılmıştır (Trease and Evans 1972, Erdurmuş ve Öneş 1990). Farklı şekillerde faydalanılan haşhaşın (Şekil 2.1) diğer bitkiler arasındaki yeri şöyledir:

Takım : *Rhoedales*
Familya : *Papaveraceae*
Cinsi : *Papaver*
Tür : *Papaver Somniferum* L.



Şekil 2.1 Haşhaş bitkisinin yapısal gösterimi (İnt.Kyn.2)

Papaveraceae familyasına ait türler genellikle kuzey yarımkürenin ılıman ve sıcak bölgelerinde yayılış göstermektedir. Bu familyada 41 cins ve yaklaşık 250 tür vardır. Ülkemizde bu familyaya ait 7 cins bulunmaktadır (Seçmen vd. 1995).

Papaver, Latince’ de gelincik, *somniferum* ise uyku verici, rüya gördürücü anlamına gelmektedir. Buna göre haşhaş, gelincikle uzaktan akrabadır (TMO 2010).

Kültürü yapılan *Papaver somniferum* L. bitkisinin iki alt türü vardır. Bunlar:

1- *Papaver Somniferum* Subps. *Subspontaneum*

Bu alt türün kapsülleri olgunlaşınca üstten delikler açılır ve tohumları dökülür. Bu alt türün Türkiye’ deki adı “açık haşhaş” tır.

2- *Papaver Somniferum* Subps. *Anatolicum*

Bu alt türün kapsülleri olgunlaşsa bile kapalı kalır. Bu alt türün Türkiye’ deki adı “kör

haşhaş" tır. *Papaver somniferum subps. anatolicum* ise 4' e ayrılır:

- a- *Papaver somniferum album* (beyaz çiçekli)
- b- *Papaver somniferum nigrum* (mor çiçekli)
- c- *Papaver somniferum setigerum* (koyu mor çiçekli)
- d- *Papaver somniferum glabrum* (kırmızı mor çiçekli)

Anadolu' da genellikle ikinci alt türün a ve b' nci türlerinin ekimi yapılmaktadır (Baytop ve Saraçoğlu 1982). İkinci alt tür *Papaver somniferum subsp. turcium* adı ile de anlatılmaktadır. Bu tür Anadolu' nun yerlisidir (Zhukovsky and Bazilevskaya 1976).

Ayrıca *Papaver somniferum* bitkisi 7 coğrafik gruba ayrılır:

- 1- Avrupa grubu, *Subsp. Eurasiaticum*
- 2- Merkezi Asya grubu, *Subsp. Centro-asiaticum*
- 3- Mongol grubu, *Subsp. Mongolicum*
- 4- Tiyan-şan grubu, *Subsp. Tianshanicum*
- 5- Anadolu grubu, *Subsp. Anatolicum*
- 6- Hindistan grubu, *Subsp. Indicum*
- 7- Yabani grup, *Subsp. Subspontaneum* (İncekara 1964).

2.3 Haşhaş' ın Oluşum Süreci

Kültür haşhaşı tek yıllık bir bitkidir, diğer bir ifadeyle ömrünü bir yıl içerisinde tamamlar. Tohumlar yeterli rutubeti ve sıcaklığı bulursa 7-12 günde çimlenip, filizlenir. Çıkış gecikirse ya rutubet yetersiz ya da toprak sıcaklığı yeterli değildir. Haşhaş, ilk çıkışında görülen iki kulakçık (kotiledonlar) dikkate alınmazsa, ilk çift yaprağı 10-14 günde, ikinci çift yaprağını 6-10 günde, üçüncü çift yaprağını 5-8 günde, dördüncü çift yaprağını ise 4-6 günde meydana getirir. Bitki rozet dönemine (6-8 yapraklı dönem) ulaştığında normal kış şartlarından zarar görmez. Yaprak çıkartmayan ve iki kulakçık döneminde -5 °C soğuğa maruz kalan bitkicikler ölür. Kışlık ekilen (sonbaharda) haşhaş kıştan çıkınca çok hızlı bir gelişme gösterir.

Yazlık ekilen (ilkbaharda) haşhaş ise çıkıştan itibaren hızlı bir gelişme göstermektedir. Kışlıklarda tomurcuklanma 190-200 günde başlarken, yazlıklarda bu süre 50-60 gün olmaktadır. Tomurcukların görülmesinden 9-13 gün sonra haşhaş çiçek açmaya başlar (Şekil 2.2). Tohumların ekilmesinden kapsüllerin kurumasına kadar geçen süre; kışlık, haşhaşta 270-280 gün, yazlıklarda ise 110-120 gün olmaktadır.

Ekim ortasında ekilen kışlık haşhaşla, Mart ortasında ekilen yazlık haşhaş arasında ekim zamanı bakımından 150 günlük bir fark olmakla birlikte, bu süre kapsül olgunlaşmasında 7-15 güne düşer. Yani kışlıklar yazlıklardan 1-2 hafta daha erken olgunlaşır (İnt.Kyn.3).

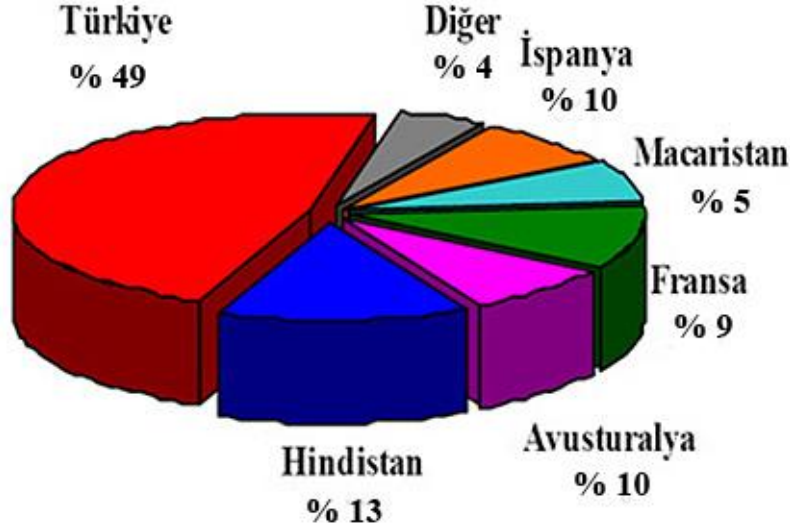


Şekil 2.2 Çiçeklenme döneminde bitkinin durumu(İnt.Kyn.4).

2.4 Dünya’ da ve Türkiye’ de Haşhaş Ekimi Yapılan Yerler

Haşhaş’ tan elde edilen ürünler nedeniyle, haşhaş ekimi ve alkaloid üretimi yapan ülkeler arasında haşhaş narkotik karakteri açısından çok önemli bir yere sahiptir. Dünya’ da haşhaş ekimi yapan ülkeler (Şekil 2.3) Birleşmiş Milletler Teşkilatı (BMT)

denetiminde yasal ana üretici olarak Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan ve diğer ülkelerden Çek Cumhuriyeti ile son yıllarda Çin’ de sayılabilir. Türkiye ve Hindistan BMT’ nca geleneksel haşhaş üreticisi ülkeler olarak kabul edilmektedir (TMO 2012).



Şekil 2.3 Ana üreticiler bazında yasal haşhaş ekim alanları (%) (TMO 2012)

Grafikten de görüleceği üzere son beş yıllık kesin verilerin ortalamasına göre ülkemiz dünya yasal haşhaş ekim alanları içerisinde %49’ luk bir paya sahip bulunmaktadır (TMO 2012).

İç Ege’ de haşhaş üretimi yapılan bölgelerde son yıllarda ciddi don olayları yaşanması nedeniyle tohumların donması %50’ ye varan ürün kayıplarına neden oldu. Haşhaş üretimi yarı yarıya düşünce 2012 yılı sonbaharından itibaren yeni ekim alanlarına izin verilmiştir.

Artık Afyon, Burdur, Isparta, Denizli, Kütahya, Uşak ve Konya’ nın yanı sıra Amasya, Tokat, Çorum, Balıkesir, Eskişehir ve Manisa’ nın bazı bölgelerinde de bu yıl itibarı ile haşhaş ekimine başlanmıştır (Şekil 2.4).

Yeni bölgelerle birlikte Dünya yasal haşhaş üretimindeki payımızın %50’ nin üzerine çıkması beklenmektedir (TMO 2012).

ülkemizde afyon olarak bilinmektedir. Afyon' un ihtiva ettiği morfin, kodein gibi alkaloidlerinden tıpta faydalanılmakla birlikte, bağımlılık yapan ve yasa dışı pazarlanan uyuşturucuların imalatında da kullanılmaktadır (TMO 2010).

1974 yılından itibaren kapsül çizimi yasaklanmış olup, günümüzde çizilmemiş haşhaş kapsüllerinin tohumları alındıktan sonra geriye kalan kabuklar morfin üretimi için Bolvadin' de kurulmuş olan 20 000 ton/yıl kapasiteli Afyon Alkaloidleri Fabrikası' nda işlenmektedir. Kapsül üzerinde yapılan çalışmalarda 40' a yakın değişik alkaloid bileşenleri bulunmuştur. Haşhaş kapsül kabuklarından (Şekil 2.5) üretilen morfin, diğer alkaloid türevlerine de işlenerek tıbbın hizmetine sunulmaktadır.



Şekil 2.5 Haşhaş kapsülü (İnt.Kyn.5).

Afyon Alkaloidleri Fabrikası normal kapasitesi ile üretim yaptığında ürünlerin %90' ından fazlasını ihraç etmektedir. Kapsül kabuklarının morfini alındıktan sonra geriye kalan küspe tam olarak değerlendirilememesine rağmen %8,5 oranında organik madde içerdiğinden organik maddece zayıf toprakların geliştirilmesinde kullanılması çalışmaları denenmektedir. Bu çalışmalardan alınan ilk sonuçlar oldukça olumludur (Erdurmuş ve Öneş 1990).

2.5.2 Tohumdan Faydalanma

Haşhaş yağı ülkemizde halen, tohumların sıcak usulle preslenmesi şeklinde elde edilmektedir. Haşhaş eken yörelerde bu iş ile uğraşan yerler mevcuttur. İyi kalitede haşhaş yağı elde etmek için tohumların çok iyi temizlenmesi, acı tada sebep olan kapsül parçacıkları ve diğer yabancı maddelerden arındırılması gerekmektedir. Haşhaş yağı üreticileri tohumları eleyip, savurmakta ve temizliği bu şekilde sağlamaktadır.

Tohumlardan yağın alınmasıyla geriye kalan küspenin üreticilerimiz için ayrı bir önemi vardır. Presleme suretiyle yağı alınan haşhaş küspesi ortalama %36 ham protein ve %12 civarında ham yağ içermektedir. Bu değerler özellikle süt hayvanlarının beslenmesinde önem taşımaktadır.

Haşhaş yağının başlıca bileşenleri linoleik ve oleik asittir. Yetiştirildiği yörelerde yemeklik yağ olarak halen faydalanılmaktadır. Ayrıca, kozmetik ve boya sanayinde, sabunlarda kullanıldığı dabilinmektedir (TMO 2010).

2.6 Uçucu Yağlar ve Genel Özellikleri

Uçucu yağ, bitkilerin değişik organlarından elde edilen yaklaşık 24-25 °C' de sıvı olan, güzel kokulu genellikle renksiz doğal bir üründür. Hoş kokusu nedeniyle esans yada eterik yağ adı verilmektedir. (Ceylan 1983).

Bitki uçucu yağları bitkilerin öncelikle çiçek ve yaprakları olmak üzere herhangi bir organında (kabuk, kök, meyva, tohum vb.) bulunabilirler. Bazen bitkinin bütün dokularında, bazen de sadece özel doku ve organlarda meydana gelirler. Uçucu yağ bitkilerin bağlı bulunduğu familyaya göre salgı tüyleri, cepleri ve kanalları ya da salgı hücrelerinde ya doğrudan ya hücre duvarındaki reçinemsî tabakanın dekompozisyonu ile ya da glikozitlerin hidrolizi ile oluşurlar (Baytop 1972, Ceylan 1987).

Uçucu yağların bitkide hangi amaçla salgılandığı tam bilinmemekte ancak bitkinin yaralanmalara karşı oluşan reçinesi için çözücü görevi gördüğü sanılmaktadır. Ayrıca

bitkinin uçucu yağı üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlemek amacıyla salgılandığı ve bitkiyi çeşitli doğal dış etkenlerden koruduğu da ileri sürülmektedir (Berk 1953).

Çoğu uçucu yağ sudan hafiftir ve su ile karışmazlar. Sulu etanolde çözünebildiği için sabit yağlardan ayrılırlar. Ayrıca kırılma indisleri oldukça yüksek olup optikçe aktiftirler. (Tanker 1976, Tyler et al. 1988, Evans 1989).

Uzun yıllardan beri değişik amaçlara yönelik olarak kullanılan uçucu yağların, kullanım alanlarının başında kozmetik, ilaç, gıda sanayi, aromaterapi ve filoterapi gelmektedir (Hammer and Carson 1999). Bilim adamları geniş bir kullanım alanına sahip olduğu için uçucu yağların kimyasal yapılarını ve biyolojik aktivitelerini incelemişlerdir. Bu araştırmalar sonucunda da doğal ürünlerin özellikleri uygulamaya konulmuştur (Mouhssen 2004).

Birkaçı dışında uçucu yağlar çok fazla sayıda bileşikten oluşmuştur. Bu nedenle de kimyasal yapıları oldukça karmaşıktır. Kimyasal bileşimleri, biyosentetik orjinleri temel alınarak terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevleri olarak iki geniş gruba ayrılabilirler. Günümüzde uçucu yağlarda 2000' den fazla kimyasal bileşiğin bulunduğu belirlenmiştir ve bunların büyük çoğunluğunu terpenik maddeler oluşturmaktadır. Pek azı aromatik benzen türevlerinin terpenlerle karışımı halindedir (Baytop 1986).

Uçucu yağların ana bileşenleri karbonhidrat, alkol, eter, keton, fenol, aldehit içeren mono ve seskiterpenlerdir. Diğer uçucu yağlar ise fenilpropenler ve spesifik sülfür yada nitrojen içeren maddeleri içerirler. Bu maddeler uçucu yağa aromatik ve tıbbi bitki özellikleri kazandırmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı eski çağlardan beri çeşitli baharatlar yemeklere sadece tat vermesi için değil aynı zamanda koruma amaçlı da eklenmiştir (Tepe vd. 2004). Uçucu yağların koku ve tadı oksijenli bileşenlerden ileri gelmektedir. Oksijenli türevler ise terpenlerin oksitlenmesi ile meydana gelir. Genel olarak yağ bileşeni çeşitli bileşenlerin belli oranda bir araya gelmesi ile oluşur (Delamare 2007).

2.7 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri

Bitkilerden uçucu yağ eldesi için kullanılan geleneksel yöntemlerin birtakım dezavantajlarının olması, araştırmacıları bitkilerden uçucu yağ eldesinde daha güvenilir ve ekonomik yöntemlerin arayışına yönlendirmiştir. Bugün klasik distilasyon yöntemlerinin yanı sıra ileri teknolojiyi kullanan modern yöntemlerde uygulanmaktadır.

2.7.1 Su Buharı Damıtması

Su buharı ile damıtma yöntemi en çok kullanılan yöntemdir. Genelde en iyi verim, saf ürün, oldukça basit donanımlı en ucuz üretim bu yöntemle sağlanır. Fakat su buharı sıcaklığında bozulan bileşenleri olan uçucu yağlar, bu yöntemle elde edilemez. Ayrıca suda çözünebilen eterik yağlar da su buharı damıtmasıyla elde edilmez. Çünkü damıtılan yağ su fazından ayrılmaz.

Uçucu yağların elde edilmesinde başlıca 3 tip damıtma yöntemi vardır. Bunlar:

- 1- Suyla damıtma
- 2- Buharla damıtma
- 3- Su ve buharla damıtma

2.7.1.1 Suyla Damıtma

Kaynamaya dayanıklı olan kurutulmuş bitkisel materyalin damıtılmasında tercih edilen bir yöntemdir. 100 °C' de kaynayan su yardımıyla kaynama noktası çok yüksek olan maddelerin su molekülleri tarafından sürüklenmesi sağlanır. Eterik yağ üretiminde kullanılan imbikler ve laboratuvar tipi cleveger aparatı bu yöntem esasına göre çalışır.

Eterik yağ içeren bitkisel materyal suyla kaynatılır. Genelde 1 hacim materyal için 3 hacim su kullanılır. Kaynatma sırasında su buharı ile uçucu yağ soğutucuya sürüklenir ve buradan yoğunlaşarak toplama kabına birikir. Sudan hafif olan uçucu yağ su yüzeyinde toplanarak ayrı bir kaba alınır (Baydar 2005).

2.7.1.2 Buharla Damıtma

Taze bitkilerin damıtılmasında kullanılan bu yöntemde, damıtma kazanının ızgarası üzerine konan materyalin içerisinden doğrudan sıcak su buharı geçirilir. Buhar, damıtma kazanının dışında tesis edilen bir buhar kazanından veya basit olarak kazanın altında yakılan ateş ile üretilir. Damıtma işlemi çok hızlı yapıldığından tercih edilen bir yöntemdir.

Sıcak su buharı materyalde bulunan yağ keseciklerini patlatır ve uçucu yağları alarak soğutucu ünitesine kadar sürükler. Soğutucu ünitesinde yoğunlaşan ürün toplama kabında aromatik su altta, uçucu yağ üstte kalacak şekilde toplanır. Çoğunlukla aromatik suda uçucu yağ tamamen ayrılmadığı için bu sular ayrı bir kazanda ikinci defa damıtılarak uçucu yağın tamamı alınmaya çalışılır (Baydar 2005).

2.7.1.3 Su ve Buharla Damıtma

Özellikle kaynamaya dayanıklı olmayan hem kuru hem de taze bitkisel materyalin damıtılmasında tercih edilen bir yöntemdir. Diğer damıtma yöntemlerinden farkı, içinde bitkisel materyal olan suyun içine direkt buhar verilerek hem çabuk kaynama sağlanır hem de distilasyon işlemi kısalmır.

Materyal içinden geçen buharın aşırı sıcak ve basınçlı olmaması önemli bir husustur. Su buharı ile sürüklenerek soğutucu ünitesine sürüklenen uçucu yağlar yoğunlaşarak damıtık su ile birlikte toplama kabında biriktirilir (Baydar 2005).

2.7.2 Kuru Distilasyon

Bazı droglar ısıtıldıklarında uçucu maddeler kısmen parçalanarak distile olurlar. Materyal odun ya da dal ise küçük parçalar halinde yüksek sıcaklıkta havasız ortamdaki bir kazana yerleştirilir ve kuru kuruya distilasyonu sağlanır. Elde edilen ürün soğutucudan geçirildikten sonra bir kapta toplanır (Kıvanç 1986).

2.7.3 Hidrodifüzyon

Bitkisel dokularda yağın bir kısmı yüzeyde bulunurken, bir kısımda iç kısımda bulunur. İç kısımdaki yağ buhar ile almak mümkün değildir. Bitkiye buhar distilasyonunun aksine buhar, bitkisel materyal dolu kazana üstten verilir, alttan çıkan buhar ise yoğunlaştırılır. Distilasyon süresinin kısalığı, az buhar kullanımı ve maliyetinin düşük olması nedeniyle tercih edilir (Kıvanç 1986).

2.7.4 Ekstraksiyon Yöntemi

Distilasyon yöntemi ile birçok durumda kabul edilebilir bir saflık ve hoş bir aroma elde edilebilmesine rağmen bu metodun stabil olmayan veya yüksek buhar sıcaklığından zarar gören aromatik bileşiklere uygulanması verimi düşürür. Bu faktörler göz önüne alınarak koku bileşenlerinin çiçeklerden ayrılmasında çeşitli çözücüler kullanılır. Bu amaçla kullanılan çözücüler uçucu olan ve olmayan olmak üzere ikiye ayrılır. Anfloraj ve maserasyon uçucu olmayan çözücülerle ekstraksiyon yöntemleridir (Polat ve Ötleş 1997).

Ekstraksiyon yöntemleri iki gruba ayırabilir:

- Geleneksel Yöntemler
- Modern Yöntemler

Geleneksel metodlar arasında soxhlet ve maserasyon yöntemlerini, modern metodlar arasında da mikrodalga ve süperkritik akışkan ekstrasyonlarını gösterebiliriz (Moyler 1993).

2.7.4.1 Organik Çözücü Ekstraksiyonu

Bitkisel materyal, uçucu yağ kolaylıkla çözebilen benzen, hekzan, petrol eteri, kloroform gibi kaynama noktası düşük organik çözücülerle çözülür. Organik çözücünün alçak basınçta uçurulması ile bir miktar (sabit yağ, boya maddeleri, mum vs.) yabancı

madde içeren uçucu yağ elde edilir ve bu karışıma da konkret adı verilir. Konkret, önce alkolle muamele edilir ve sonra vakum distilasyonu ile alkol uçurulur. Böylelikle absölü (absolute) adı verilen, pahalı ve kullanılması kolay bir yağ elde edilmiş olur (Özatlı 1999, Baydar 2005).

2.7.4.2 Maserasyon

Maserasyon, çiçeklerden uçucu yağ eldesi için kullanılan ilkel metotlardan biridir. 60-70 °C' deki erimiş hayvansal yağa veya bitkisel yağa batırılan çiçekler ısı etkisiyle parçalanarak aroma maddelerinin yağa geçmesi sağlanır. Yağ içinde kalan çiçek parçaları ortamdaki uzaklaştırılarak üzerlerinde kalan yağ hidrolik basınç uygulamasıyla alınır ve aroma maddelerini içeren yağa katılır. Bu işlem, yağ iyice aroma maddeleriyle doyana kadar devam ettirilir. Maserasyon, oldukça fazla zaman alan verimsiz bir işlemdir (Mukhopadhyay 2000).

2.7.4.3 Anfloraj

Çiçeklere ve diğer aromatik bitkisel ürünlere uygulanan bir diğer ilkel metot olan anfloraj, örneklerin soğuk hayvansal yağa temas ettirilmesiyle gerçekleştirilir (Mukhopadhyay 2000). Tahta çerçevelerle desteklenmiş cam plakaların yüzeyine sürülen yağ ile temas eden çiçek, bu plakalar arasında sıkıştırılarak aroma maddelerinin yağ tarafından absorbe edilmesi sağlanır. Esansiyel yağın anfloraj yağından ekstraksiyonunda ise petrol eteri kullanılır (Polat ve Ötleş 1997). Anfloraj yöntemi de Maserasyon gibi zaman alan bir işlemdir (Mukhopadhyay 2000).

2.7.4.4 Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet Metodu bir katının sıcak çözücü ile ekstraksiyonunda kullanılır. Ekstraksiyon boyunca balonda kaynayan çözücünden gelen buhar cam tüp içerisinde yükselmeye başlar. Yükselen buhar ekstraksiyon çemberine girer ve su ile soğutulmuş kondensatör tarafından yoğunlaştırılır. Yoğuşturulan çözücü ekstraksiyon çemberini doldurur ve çemberdeki kağıt ekstraksiyon yüksüğü içindeki maddenin yağını çözer. Çemberin

altına bağlı olan sifon tp de zcyle dolar. Üzücü seviyesi çember içerisinde yükseldikçe, sifon otomatik olarak zcy ve ekstrakte edilmiş olan yağı aşağıda bulunan balona geri akıtmaya başlar. Bu ekstraksiyon döngüsü tüm yağ ekstrakte edilene kadar 10-15 dakikada bir kendiliğinden tekrarlanır. Analiz işlemi daha sonra prosedürde tanımlandığı gibi yapılır. Soxhlet düzeneği Şekil 2.6' da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Soxhlet ekstraktörü (İnt.Kyn.6).

Soxhlet ekstraksiyonu birçok organik ve biyolojik madde yağ tayininde kullanılabilir. Ekstraksiyon ncesi, yağ tayini yapılacak olan madde tamamen kuru olmalı (105 °C' de en az 1-2 saat kurutulmalı), nem içermemeli ve çok iyi bir Şekilde ğtlmş olmalıdır.

2.7.4.5 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

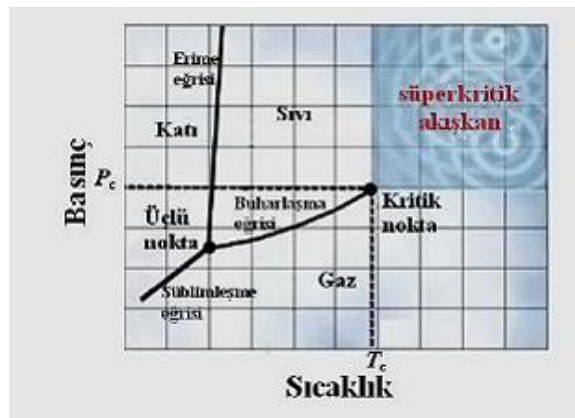
Birçok kimyasal atığın neden olduğu çevresel kirlenme, yeşil kimya diye bir kavramın doğmasına yol açmıştır. Kimyacılar artık kimyasal ve üzücü kullanımında çok daha dikkatli davranmaya ve evre dostu zmler geliştirmeye başlamışlardır. Doğal rnlerin ekstraksiyonu ve izolasyonunda yüksek miktarlarda atık organik üzücü oluşmaktadır. Bu nedenle süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE), doğal ürünlerin ekstraksiyonunda bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır (Sarker et al. 2006)

1822 yılında Cagniard de la Tour' un, değişik sıvıları kapalı bir kaptaki ısıtarak sıvı fazını kaybettiği gözlemi açıklaması süperkritik alanında yayınlanan ilk çalışma kabul edilmektedir (Aymonier et al. 2007).

SFE ilk olarak 1930' lu yıllarda petrokimya alanında kullanılmaya başlandığı ve çeşitli patentler alındığı bilinmektedir. Gıda üzerindeki çalışmalar ise 1970' li yıllarda başlamış ve özellikle şerbetçi otu, kahve, çay, tütün ve baharatlar gibi pek çok ürünün SFE' yi içeren birçok patent alınmıştır. Süperkritik akışkanlar, endüstriyel ölçekte olduğu kadar, analitik ölçekteki örnek ekstraksiyonlarında da giderek artan bir ilgiye sahiptir. Hava ve su gibi çevresel matrislerden poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) ve poliklorlanmış bifeniller (PCB) gibi maddelerin ayırımından gıda ürünlerine kadar değişen pek çok örnekte, genellikle 30 dakikadan daha kısa bir süre içinde ve kantitatif geri kazanımla ekstraksiyon gerçekleştirilebilmektedir (Hısısl ve Ünlü 1996).

Her maddenin bir kritik sıcaklığı (T_c) ve kritik basıncı (P_c) vardır. Maddenin kritik sıcaklığı ve basıncı, gaz ve sıvı fazlarının bir arada bulunabildiği en yüksek sıcaklık ve basıncıdır. Bilindiği gibi maddeler katı, sıvı ve gaz olarak üç gruba ayrılırlar. Ancak maddeye, kritik sıcaklığının ve kritik basıncının üzerindeki koşullar uygulandığında "Süperkritik Akışkan" olarak adlandırılan dördüncü gruba girer (Hugh and Krukoniş 1986).

şekil 2.7' de saf maddeler için basınç sıcaklık diyagramında süperkritik bölge gösterilmiştir (olak ve Tülek 2003).



şekil 2.7 Saf bir madde için sıcaklık-basınç faz diyagramı (Dinçer vd. 2007).

İlk kez 1879’ da Royal Society seminerlerinde (Londra) Hannay ve Hogart tarafından, bir katının yüksek basınçtaki gazda çözüldüğü, basınç düşürülünce katının çöktüğü açıklanmıştır. Bir kaç yıl sonra Eduard Buchner, bir model bileşik olarak naftalinin süperkritik karbon dioksit içindeki çözünürlüğünü ölçmüştür (Froning et al. 1990).

2.7.4.6 Mikrodalga Ekstraksiyonu

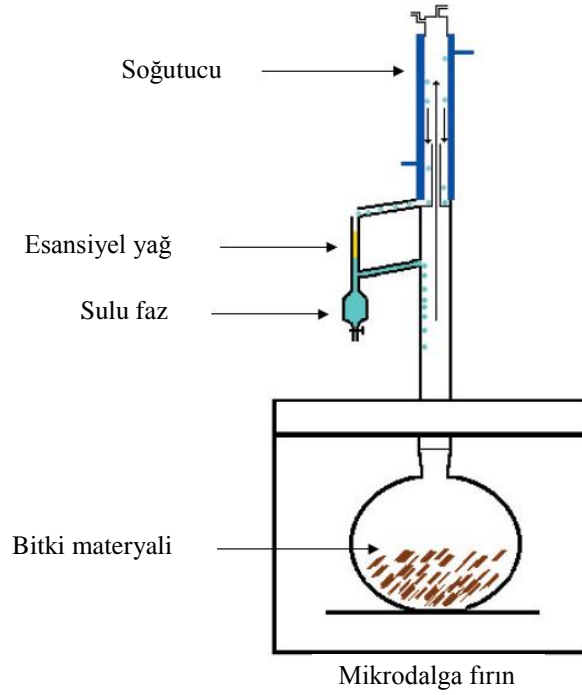
İşlem süresini kısaltmak, daha az çözücü kullanımıyla daha iyi sonuçlar almak için klasik metotlarla mikrodalğanın birleştirildiği bir ekstraksiyon türüdür.

Bu teknikte çok az numune, üzerine eklenen çözücü ile beraber mikrodalga ışınlarına maruz bırakılır. Bu esnada sıcaklık artacağından belirli sürelerde soğutma işlemi yapılır. Mikrodalga enerjisini geçiren çözücüler kullanıldığında gönderilen enerjinin tümü numune tarafından absorblanmakta, hücre içindeki su bu enerjiyi absorbladığında hücre ısınmakta ve hücre duvarının bu ısıyla çatlaması sonucunda hücre materyali çözücüye karışmaktadır. Klasik metotlardaki gibi iletimle sıcaklık aktarımı olmaz. Burada numunenin hepsi aynı anda ısınır (Eskilsson and Bjorklund 2000).

2.7.4.7 Solvent İçermeyen Mikrodalga Ekstraksiyonu

Solvent içermeyen mikrodalga ekstraksiyonu (SFME), herhangi bir çözücü ya da su ilavesi olmadan aromatik bitkilerden uçucu yağ eldesi için kullanılan yeni yöntemlerden biridir. Uçucu bileşiklerin izolasyonu ve konsantrasyonu SFME ile tek aşamada yapılır (Şekil 2.8). Elde edilen uçucu yağların analizi ise GC ya da GC-MS ile yapılır (Bayramoğlu 2007).

SFME kullanılarak 30-60 dakika arasında aromatik bitkilerden uçucu yağlar elde edilebilmektedir. SFME ile geleneksel yöntemlerden elde edilen uçucu yağlardan daha yüksek miktarda uçucu yağ elde edilmektedir. Geleneksel distilasyon yöntemlerine göre SFME’ nin hız, verimlilik, temizlik ve enerji açısından önemli avantajları vardır ve çevre dostu bir yöntemdir (Bayramoğlu 2007).



Şekil 2.8 SFME ve MAHD şematik diagram süreçleri

2.7.4.8 Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu

Modern ekstraksiyon yöntemlerinden biridir. Çözücü tüketimi, tekrarlanabilirlik verim ve ekstraksiyon süresi gibi avantajlara sahiptir. Yöntemi daha etkin kılabilmek için yüksek basınç ve sıcaklıkta organik çözücüler kullanılır. Sıcaklığın artması ile birlikte ekstraksiyonun kinetiği hızlanır, yükseltelen basınç çözücüyü sıvı halde tutarak güvenli ve hızlı bir ekstraksiyon sağlamaktadır. Ayrıca yüksek basınç, çözücünün, deney materyalinin iç kısımlarına kadar nüfuz etmesine imkan sağlamaktadır.

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) bu yöntemin bir şeklidir. Bu yöntem de, çelik bir kap içerisine yerleştirilen katı ya da yarı-katı örneğin çözücü ile bir fırın içerisinde 50-200 °C arasında değişen sıcaklıklarda ısıtılması ile başlar ve ısıtma sırasında fırına 500-3000 psi değerleri arasında basınç uygulanır. Ekstraksiyonun 5-10. dakikalarında ortama yeni çözücü pompalanarak örneğin ve kabın yıkanması sağlanmaktadır. Sistem içerisindeki bütün çözücü genellikle azot gazı kullanılarak bir şişe içerisinde toplanmaktadır (Kaufmann and Christen 2002).

2.7.4.9 Katı-Faz Mikro Ekstraksiyon

1989 yılında Pawliszyn vd. tarafından bulunan katı-faz mikro ekstraksiyon (SPME) yöntemi, örnek hazırlama kademesine oldukça başarılı yeni bir yaklaşım getirmiştir. SPME, örnek hazırlama, ekstraksiyon ve yoğunlaştırma aşamalarını çözücü içermeyen tek bir aşamada birleştirmiştir. Bu yöntemle işlem süresi ve maliyetlerde önemli kazançlar sağlanırken, teşhiste de iyileşmeler görülmüştür.

SPME, GC veya GC-MS ile birlikte özellikle çevre, biyoloji ve gıda örneklerindeki uçucu ve yarı uçucu organik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Ayrıca, yüksek performanslı sıvı kromatografisinde de uygulanmaktadır (Vas and Vekey 2004).

Çok basit bir cihaz olan SPME, modifiye edilmiş bir şırıngaya benzemektedir. İç kısmında bir lif tutucu ve lif grubu bulunmaktadır. Sondaki lif, 1-2 cm uzunluğunda ileri geri hareket edebilen bir SPME lifidir. SPME lifi ince polimer film kaplı eritilmiş silika optik bir liftir. SPME uygulaması gaz ya da çözelti halindeki örneğe uygulanabilmektedir. Her iki durumda da SPME iğnesi kapalı ortama sokulur, lifi koruyan kısım geri çekilir ve lifin ortamla temas etmesi sağlanır. Lif üzerindeki polimer kaplama tıpkı bir sünger gibi absorpsiyon/adsorpsiyon yöntemiyle örneği alır ve daha sonra koruma amaçlı olarak lif, metal iğnenin içerisine geri çekilir. Bir sonraki aşama lif üzerindeki örneğin GC veya GC-MS' e termal desorpsiyon ile aktarılarak analiz edilmesidir (Galipo et al. 1999).

2.7.5 Presleme Yöntemi

Makine ile presleme, el ile preslemede elde edilen ürüne yakın bir verim verebilir. El ile presleme proseslerinden sünger prosesi en önemli olanıdır. Çünkü çok yüksek kalitede yağ verir. Bu süreçte meyve parçalara bölünür, kabuğu soyulup düzgün hale getirilir ve birkaç saat suda bırakılır. Soyulmuş her kısmın karşısına bir sünger konularak, sıkılır ve yağ süngere emdirilir. Bu sünger sonradan zaman zaman sıkılarak yağı alınır ve kuru duruma getirilir. Bu yöntemle, bir kişi günde 680 g limon yağı üretilir. Bu yöntem, özellikle Sicilya' da halen kullanılmaktadır. Portakal, mandalina, limon, bergamot gibi

turunçgil meyvelerinin uçucu yağları preslenerek çıkarılır. Su buharı damıtması güzel kokunun bozulmasına yol açar, bu nedenle uygulanmaz (Özkan 1997).

Uçucu Yağların Kalite Parametreleri

2.8.1 Verim

Uçucu yağ verimi, uçucu yağın yağ miktarının oranı olarak tanımlanabilir. Uçucu yağların büyük bir bölümü yüksek verim verirler ve verim en önemli kalite parametreleri arasındadır. Bu nedenle günümüzde araştırmacılar sanayide işleme teknolojisini geliştirerek kaliteli uçucu yağların eldesi üzerinde çalışmaktadırlar.

2.8.2 Kimyasal Yapısı

Kalite, uçucu yağların bileşiminin belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır. Ancak bazı sektörlerde (gıda, ilaç, kozmetik vb.) ürünün kullanımı ile ilgili kalite kriterleri değişmektedir.

Oksijenli bileşenler bakımından zengin olan uçucu yağlarda genel olarak terpenik maddeler açısından daha zengin olanlar tercih edilmektedir. Ayrıca terpenler hafif ve ısıya duyarlı bileşikler olmasından dolayı kolayca ayrıştırılabilmektedir. Aynı zamanda bu uçucu yağların yüksek antioksidan ve antibakteriyel aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir.

2.8.3 Özgül Ağırlık

Esansiyel yağların kalite ve saflığı için bir diğer önemli kriter özgül ağırlıktır. Özgül ağırlık, 15-25 °C' de belirli bir hacimde ağırlığı verilmiş esansiyel yağın aynı sıcaklıkta ve aynı hacimdeki distile suya oranı olarak tanımlanabilir. Fizikokimyasal özellikler arasında, özgül ağırlık en çok kullanılan özelliktir. Genellikle, en güvenilir sonuçlar elde edildiği için özgül ağırlık ölçümlerinde piknometreler kullanılır (Guenther 1948).

2.8.4 Kırılma İndisi

Kırılma indisi, boşluktan geçen ışık hızının oranının, numune içinden geçen ışığın hızına oranı olarak tanımlanabilir. Kırılma indisi ışığın geçtiği yoldaki ortamın fiziksel yapısıyla da ilgilidir. Bu nedenle bilinmeyen maddelerin tespitinde kırılma indisi önemli bir özellik sağlar. Kırılma indisi ne kadar fazlaysa dağılma miktarı o kadar fazla olur. Maddenin parlaklığını artıran kırılma indisi sabit sıcaklıkta yapılmalıdır.

2.8.5 Alkoldeki Çözünürlüğü

Esansiyel yağların büyük bir bölümü suda çok az, saf alkolde ise tamamen çözüldüğünden belirli bir miktar yağ tamamen çözmek için gereken seyreltik alkol miktarını bulmak mümkündür.

Bir esansiyel yağın kalitesini ölçmenin güvenli yolu, seyreltik alkol içerisindeki esansiyel yağın çözünürlüğüne bakmaktır. Bilindiği gibi oksijence zengin olan yağlar seyreltik alkolde kolayca çözünür. Esansiyel yağların çözünürlüğünü belirlemede tesir derecesi %50-60-70-80-90-95 ve ara sıra %65-75 olan alkoller kullanılmaktadır. Çözünürlük sıcaklıktan etkilendiğinden dolayı, ölçüm yapılırken ortam sıcaklığına dikkat edilmesi gerekmektedir (Guenther 1948).

2.8.6 Optik Çevirme

Esansiyel yağların birçoğu polarize ışığın önüne konulduğu zaman polarize ışığın polarlama düzlemini sağa ya da sola çevirir. Optik özelliğin miktarı polarimetri ve döndürme açısıyla ölçülür. Optik ışığın dönme açısı saflık için önemli bir kriterdir. Optik dönme açısı birçok esansiyel yağ için sıcaklıkla değiştiğinden genellikle oda sıcaklığında ölçümleri yapılır (Guenther 1948).

2.9 Uçucu Yağların Sınıflandırılması

Uçucu yağları değişik özelliklerine göre gruplara ayırmak mümkündür. Bunlar kimyasal

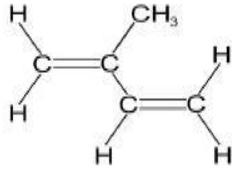
bileşimleri, aromatik özellikleri, farmakolojik ve terapik etkileri göz önünde tutularak, terpenik maddeler, aromatik maddeler, düz zincirli hidrokarbonlar, azot ve kükürt taşıyan bileşikler olmak üzere dört grupta incelenebilir.

Terpenlerin oksitlenmesi ile meydana gelen oksijenli türevler uçucu yağın kendine özgü kokusunu, tadını ve terapik özelliklerini verirler. Uçucu yağlarda asıl önemli olan bileşikler oksitlenmiş türevlerdir (Ceylan 1997).

2.9.1 Kimyasal Bileşimlerine Göre Uçucu Yağlar

2.9.1.1 Terpenik Maddeler

Kimyasal anlamda terpenler, yapısı çeşitli fakat belli sayıda Şekil 2.9' da verildiği gibi izopren birimlerine sahip olan bir moleküler grubu olarak tanımlanır. İzopren birimine göre; monoterpen, seskiterpen, diterpen, ve triterpenler olarak dört grupta toplanırlar. Bu tanım, temel moleküler iskelette izopren sayılarına dayanan terpenlerin rasyonel bir şekilde sınıflandırılmasını sağlar.



Şekil 2.9 İzopren molekülü

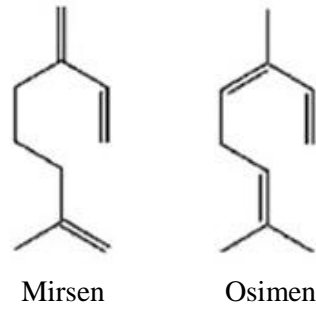
Terpenler yapılarına göre 4 gruba ayrılır (Ceylan 1987). Bunlar:

- 1- monoterpenler
- 2- seskiterpenler
- 3- diterpenler
- 4- triterpenler

a) Monoterpenler (C₁₀)

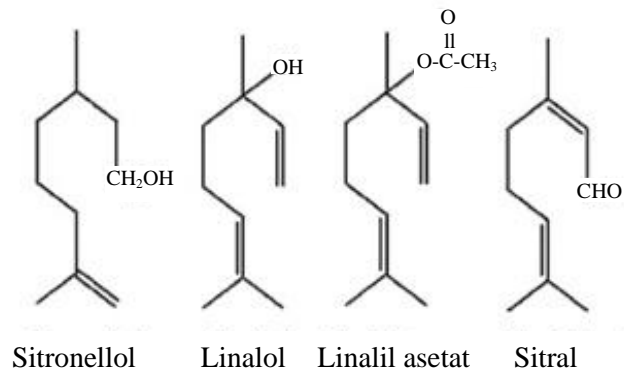
Monoterpenler iki izopren (2-metil-1,3-butadien) molekülünden oluşan 10 karbonlu bileşiklerdir. Bitkilerde, omurgalı hayvanlarda, böceklerde, deniz organizmalarında ve alglerde bulunmaktadır. Geniş kullanım alanına sahip olan monoterpenler, parfüm ve gıda maddelerinde kokulandırıcı olarak kullanılırken bazıları da antifungal, antibakteriyel ve antikanserojen etki gösterebilmektedir. İzopren doğada bulunmaz (Tüzün 1992).

Monoterpenler asiklik, monosiklik ve bisiklik monoterpenler olarak alt gruplara ayrılır. Buna göre asiklik monoterpenler (Şekil 2.10) üç çift bağ içerirler.



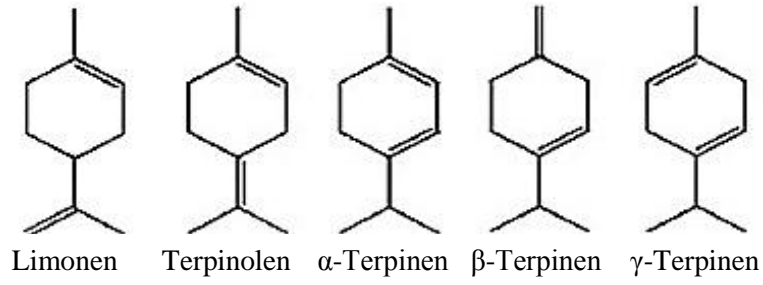
Şekil 2.10 Bazı asiklik monoterpenlerin yapısal gösterimi

Asiklik monoterpenlerin (Şekil 2.11) alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri bulunur.



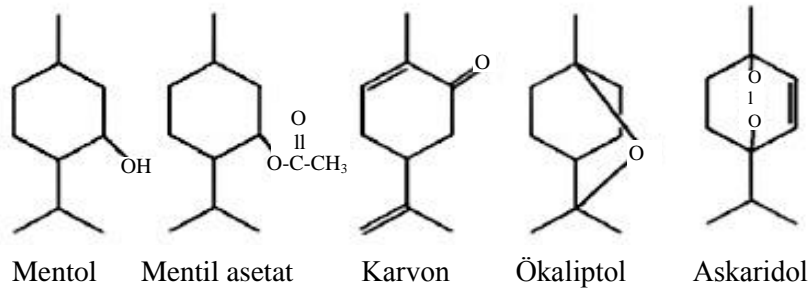
Şekil 2.11 Bazı asiklik monoterpenler

Monosiklik monoterpenlerde (Şekil 2.12) iki çift bağ bulunur.



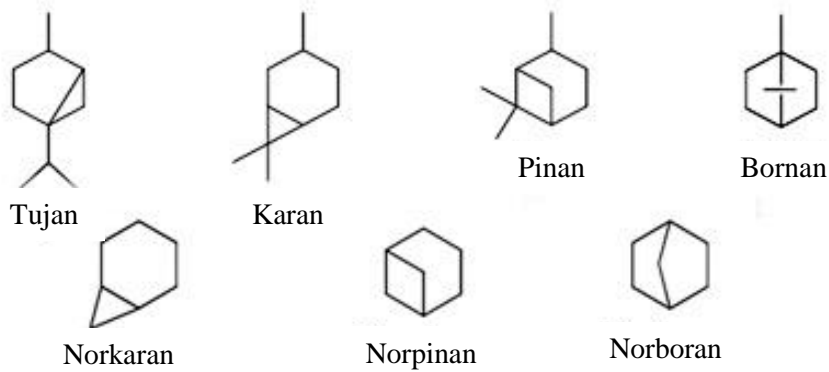
Şekil 2.12 Bazı monosiklik monoterpenler

Monosiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri (Şekil 2.13) alkol, ester, keton, epoksit ve peroksit grubu taşıyabilirler.



Şekil 2.13 Bazı monosiklik monoterpenler

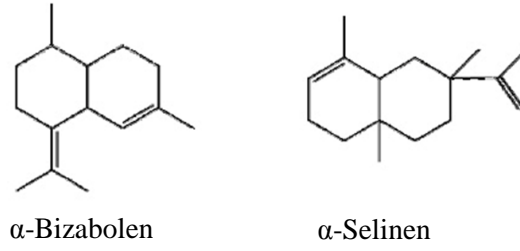
Bisiklik monoterpenler bir çift bağ içerirler (Şekil 2.14). Bisiklik monoterpenlerin alkol, ester veya ketonlu türevleri bulunur.



Şekil 2.14 Bazı bisiklik monoterpenler

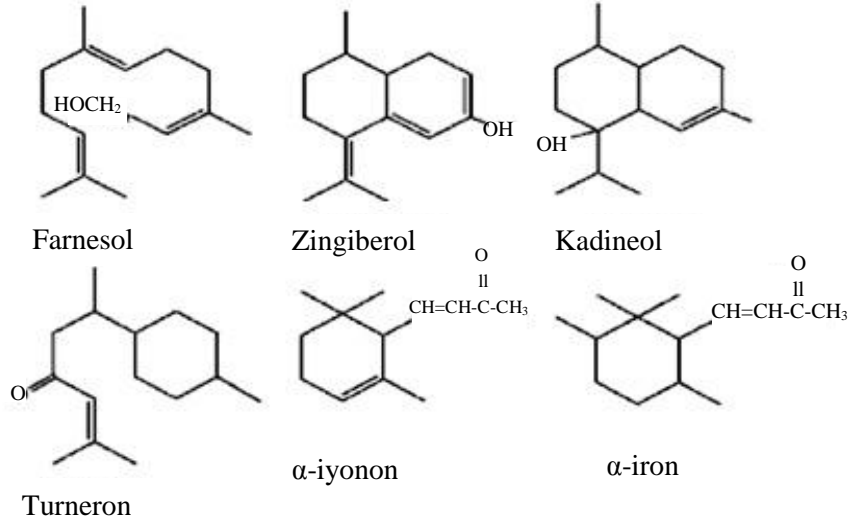
b) Seskiterpenler (C₁₅₋₃)

Seskiterpenler 15 karbonlu bileşiklerdir (Şekil 2.15). Bunların da zincirli, tek halkalı veya çift halkalı olanları ve oksijenli türevleri bulunur (Beyer 1976).



Şekil 2.15 Bazı seskiterpenler

Seskiterpenlerin oksijenli türevleri yaygındır (Şekil 2.16).

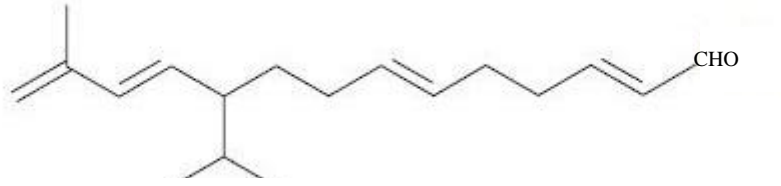


Şekil 2.16 Bazı seskiterpenler

c) Diterpenler (C₂₀)

Diterpenler dört izopren birimden oluşurlar ve C₂₀H₃₂ moleküler formülüne sahiptirler. Diterpen bileşiklerinin büyük bir çoğunluğunun pirofosfat yapısından yola çıkarak oluşan geranilgeraniolün halkalaşmasıyla oluştuğu kabul edilmektedir. Geranilgeraniol halkasal diterpenlerin biyogenetik çıkış maddesidir ve bazı ağaçların hoş kokulu

aromaları içinde bulunur. Buna örnek olarak tütünden elde edilen tetradekatetraenal yapısı (Şekil 2.17) örnek olarak gösterilebilir (Karabacak 2007).



10-izopropil-13-metiltetradeka-2,6,11,13-tetraenal

Şekil 2.17 Tetradekatetraenal yapısı

Diterpenler, steroidlerden ve triterpenlerden daha kolay oksitlenir. Bu nedenle diterpenlerdeki kimyasal reaksiyonlarda farklılıklar gözlenmektedir. Köprülü halka sistemlerinde Wagner-Meerwein düzenlenmesi ile karbokatyon oluşmaktadır (Büyükkaya 2002).

d) Triterpenler (C₃₀)

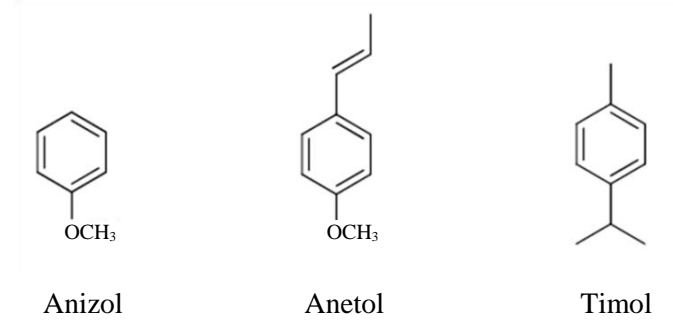
Triterpenler altı izopren biriminden oluşmuş 30 karbonlu iskelete sahip yapılardır. Triterpenler, bitkilerde serbest veya bağlı olarak bulunmaktadır. Serbest triterpenler, asit, alkol, aldehit, keton, epoksit ve lakton fonksiyonel gruplarından birini veya birkaçını bir arada taşıyabilirler veya hiç süstitüent taşımazlar (Ulubelen vd. 1981).

Triterpenik asitlerin metil esterleri, asetatları gibi esterler ve glikozit halindeki triterpenler, bağlı triterpenlerin başlıcalarını oluştururlar. Ayrıca triterpenoid polimerleri veya reçineleri, triterpenik asitlerin şekerlerle yaptığı esterler ve metoksi grubu taşıyan triterpenler de bağlı triterpenler grubuna dahil edilirler (Ulubelen vd. 1981).

2.9.1.2 Aromatik Özelliklerine Göre Uçucu Yağlar

Aromatik maddeler, terpenlerden sonra uçucu yağlarda bulunan önemli bileşik grubudur. Benzen, propilbenzen veya p-simen yapısında olabilirler, asit, alkol, ester, aldehit, keton, fenol, fenol eter, lakton gibi organik fonksiyonel gruplar taşıyabilirler (Şekil 2.18). Uçucu yağların tat ve koku açısından çok önemli, belirgin bazı fizyolojik

etkilere sahip, terpenler gibi doğrudan bitki metabolizmasıyla ilgili biyokimyasal reaksiyonlar sonucu oluşmuş bileşenleridir. Tat ve koku sanayinde önemli birçok bileşiğin sentezinde de kullanılırlar.



Şekil 2.18 Bazı aromatik maddeler

2.9.1.3 Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre Uçucu Yağlar

Farmakolojik ve terapik etkilerine göre de uçucu yağlar gruplandırılabilirler. Bu grupta yer alan uçucu yağlar genellikle tedavi amaçlıdır ve alternatif tıbbın önem kazanmasıyla da önemleri artmıştır (Ceylan 1997). Farmakolojik etkilerine göre uçucu yağlar antiromatizmal, öksürük kesici, idrar söktürücü, iltihap azaltan, dezenfektan vs. gibi gruplandırmaya tabi tutulurlar.

2.10 Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri

Son yıllarda antibiyotiklere karşı dirençli suşların oluşması önemli bir problem haline gelmiştir. Doğal bitki içeriklerinden elde edilen maddeleri kullanarak patojen mikroorganizmalara karşı etkili olan bitki türleri ve bu türlerin içerdikleri etken maddelerin tespit edilmesi, dünyada üzerinde yoğun bir şekilde çalışılan bir alan haline gelmiştir (Benli ve Yiğit 2005, Toroğlu ve Çenet 2006).

Uçucu yağlar, farklı bileşenleri içeren kompleks karışımlar olduklarından biyolojik etkileri yönünden de farklılıklar göstermektedirler. Etki dereceleri içerdikleri etken maddenin özelliğine bağlı olarak pek çok uçucu yağ farklı antimikrobiyal etkiler gösterebilmektedir (Toroğlu ve Çenet 2006).

Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal etkileri üzerinde günümüze kadar birçok araştırma yapılmıştır (Leal and Fonteles 1999).

Nostro ve arkadaşları (2000). yapmış oldukları çalışmada bazı bitki ekstraktlarının test mikroorganizması olarak kullanılan bazı Gram (+) ve Gram (-) bakterilerine karşı inhibitörük etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (Nostro et al. 2000).

Disk difüzyon metodu kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, antimikrobiyal aktivitenin Gram (+) bakteri ve maya suşlarına karşı Gram (-) bakterilerden daha etkili olduğu gözlenmiştir (Dağcı vd. 2002).

Sartoratto ve arkadaşları (2004). 8 farklı aromatik bitkiden elde edilen uçucu yağların 11 farklı mikroorganizma üzerinde farklı derecelerde inhibitörük etki gösterdiklerini bildirmişlerdir (Sartoratta et al. 2004).

2.10.1 Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Aktivitelerinin Tespit Edilmesi

1960' lı yıllara kadar mikroorganizmaların ilaç, özellikle antibiyotik duyarlılık testleri için birçok yöntem veya bu yöntemlerin değişik birçok modifikasyonları belirlenmiştir. Her yöntemin üstünlüğü ve kullanım alanları sınırlıdır. Sonuçları en yüksek düzeyde yorumlamak için yöntemin tüm özellikleri iyi kavranmalıdır. Genelde uçucu yağların antimikrobiyal aktivitelerini test etmek ve değerlendirmek zordur. Çünkü uçucu olmaları yanında sudaki çözünürlüklerinin az olması ve karmaşık yapıda olmaları deneyleri güçleştirmektedir.

Bilindiği gibi uçucu yağların, uçuculuk, hidrofobiklik ve solunum sisteminde etki gösteren özel kokulara sahip olma gibi özellikleri vardır. Bu son özellikleri, biyolojik olarak aktif olabileceklerini ortaya koymaktadır. En çok rapor edilen özellikleri antimikrobiyal olmalarıdır. Bu özelliklerin ortaya çıkardığı testler belli bir standardizasyona sahip değildir ve uygun laboratuvarlarda yapılabilmektedir.

Genel olarak kullanılan teknikler agar difüzyon ve broth-dilüsyon yöntemleridir. Bu

metodlar dışında uçucu yağların inhibisyon zon çaplarını belirlemek üzere son yıllarda kullanılan diğer bir yöntemde disk difüzyon metodudur (NCCLS 1993).

Antimikrobiyal testlerde kullanılan bir diğer metot da agar difüzyon metodudur. Uçucu yağların test edilmesindeki kolaylığından dolayı en çok bu teknik tercih edilmektedir. Agar difüzyon tekniği, 1940' lı yıllardan beri çeşitli maddelerin antimikrobiyal özelliklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kalitatif ve yarı kantitatif bilgiler bu metotla ortaya çıkarılabilmektedir.

Agar difüzyon tekniğinde, içinde test edilecek olan maddenin bulunduğu bir çukur sistemiyle, test organizmasının bulunduğu uygun bir besiyeri kullanılmaktadır. Besiyeri üzerine, belirli ölçülerde açılan kuyulara homojen olarak çözülmüş uçucu yağ koyulur. Bu yöntemde bazen besiyeri üzerinde çukur açmak yerine, uçucu yağ emdirilmiş kağıt disklerde kullanılmaktadır. Kullanılan maddenin yapısal özelliği difüze olma yüzdesini veya süresini etkileyebilmekte bu durum da deney sonuçlarında da etkili olabilmektedir. İnkübasyon süresi sonunda, kullanılan madde etkili ise çukurların etrafında belirgin biçimde üremenin olmadığı inhibisyon zonları oluşmaktadır. Oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülerek kaydedilmekte ve değerlendirilmektedir. Kuyucuklara koyulan maddenin artan ya da azalan konsantrasyonlarıyla, aktivite sonucu oluşan inhibisyon zonu çaplarının da doğru orantılı olarak artması ya da azalması beklenmektedir (NCCLS 1993, Koneman et al. 1997, Dorman and Deans 2000).

2.11 Uçucu Yağların Farmakolojik Etkisi ve Kullanım Alanları

Bugüne kadar uçucu yağlarda 2000' den fazla kimyasal bileşenlerin bulunduğu gösterilmiştir ki, bunların en önemlileri terpenler ve fenilpropanlardır. Ayrıca çok sayıda su buharında uçucu olan azot ve kükürt içeren bileşiklerin varlığı da görülmüştür. Bu maddeler fizyolojik etkileri nedeni ile bazen tek tek veya bazen de karışım şeklinde terapide kullanılmaktadırlar (Çelik ve Çelik 2007).

Uçucu yağlar eski çağlardan günümüze kadar tedavide kullanılan ilaçlar arasında yer almaktadırlar (Çelik ve Çelik 2007). Halk tıbbında kullanılma amaçları esas alınarak bu

ilaçlar üzerinde yapılan farmakolojik araştırmalar sonucunda bazı biyolojik etkileri bilimsel olarak da açıklanmıştır (Kıvanç 1986).

Tıpta, alternatif tedavide, kozmetikte ve yiyeceklerin raf ömürlerini uzatmak için kullanılan uçucu yağların doğal olarak bitkilerden elde edilmesi, organik çözücü maddeler yardımıyla ilgili bitki kısımlarının preslenmesi, su buharı distilasyonu veya ekstraksiyonu ile olmaktadır (Dorman and Deans 2000).

2.11.1 Bitki Uçucu Yağlarının Endüstride Kullanım Alanları

Bitkilerin pek çoğu tarihin çok eski devirlerinden beri tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Kimyasal sanayideki gelişmeler ilaç sanayisini de etkilemiş, sentetik ilaçlar bitkilerin yerini almaya başlamıştır. Buna rağmen bugün bile dünya nüfusunun büyük bir bölümü tıbbi bitkilerle tedavi olmaktadır. Doğaya veya yeşile dönüş olarak adlandırılan doğal beslenme, doğal ürünlerle tedavi gibi hususlar ancak sentetik ürünlerden uzaklaşmak isteyen gelişmiş toplumlar için söylenebilir (Aslan 2005).

Ancak son yıllarda tıbbi bitkilerdeki etkili maddelerin yeni kullanım yerlerinin bulunması, ayrıca sentetik yolla elde edilen ilaçlara nazaran tıbbi bitkilerden elde edilen etkili maddelerin çok yönlü etki göstermesi ve yan etkilerinin olmaması tıbbi bitkilerin önemini daha da artırmıştır. Tıbbi bitkiler ilaç endüstrisinde kullanımlarının yanı sıra gıda, kozmetik, baharat, alkollü içki ve meşrubat endüstrisinde de ekonomik öneme sahiptirler (İnt.Kyn.7).

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)' nun 91 ülkenin tıbbi bitkileri üzerinde yapılmış olan bazı çalışmalara dayanarak yaptığı bir araştırmaya göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarının 20 000 kadar olduğu belirtilmiştir. Doğal olarak yetişen bitkilerin gövde, yaprak, tohum ve köklerinde birçok mikroorganizmanın büyümesini inhibe edebilecek maddeler izole edilmiş, bu maddeler mikroorganizmalar üzerine denenmiş ve aktiviteleri rapor edilmiştir (Ertürk ve Demirbağ 2003).

Geleneksel halk hekimliğinde kullanılan bitkiler bilimsel bir süzgeçten geçirilerek

yeniden değerlendirilmiş ve fitoterapi bir bilim dalı haline gelmiştir. Bu bilim dalı giderek gelişmekte ve daha fazla önem kazanmaktadır (Aslan 2005).

WHO verileri, gelişmekte olan ülkelerde insanların %80' in bu terapi yöntemlerini kullandığını ve 3,3 milyar insanın da tıbbi bitkilerden terapi aracı olarak yararlandığını ortaya koymuştur (Eloff 1998).

Türkiye bitki türü ile dünyanın en zengin florasına sahip ülkelerinden biri olmanın yanı sıra köklü bir kültüre de sahiptir. Bu durum, bitkisel ilaçların daha etkili, daha toksik ve daha pahalı olan sentetik ilaçlar ile bir arada kullanımlarında tamamlayıcı rol oynamalarına olanak sağlamakta, tek başlarına ise alternatif terapi aracı olarak deri ve mukoza lezyonları ile diğer sistemlerin enfeksiyonlarında iyileştirici ve antiseptik amaçlı olarak kullanımlarını gündeme getirmektedir. Bu yönüyle antibakteriyel aktiviteye sahip bitkilerin bakteriyel orjinli insan, hayvan ve bitki hastalıklarının kontrolünde etkili olabileceği bildirilmektedir (Verastegui et al. 1996).

Baharat olarak da pek çok bitki tat verici ve aynı zamanda hastalıklara karşı kullanılmaktadır. Baharatın mikroorganizmalar üzerine etkileri eskiden beri araştırılan bir konu olmuştur. Ancak bu etkinin mikroorganizmanın türüne ve baharattaki uçucu yağ konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmektedir. Esansiyel yağların bileşim ve miktarları baharat cinsine, üretim şekline, iklime ve yetiştirildiği bölgenin coğrafi yapısına bağlı olarak değişmektedir (Üner vd. 2000).

2.12 Uçucu Yağlar İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Ouazzou ve arkadaşları (2012), Fas' ta yetişen *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* elde edilen esansiyel yağın kimyasal bileşimini ve antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. Elde edilen ekstrakt GC-MS ile analiz etmişler ve 84 tane bileşik bulmuşlardır. *M. pulegiumun* esansiyel yağı diğer bölgelerden elde edilenlerle çok benzer sonuçlar vermiştir. Esansiyel yağın yaklaşık %70' inin pulegonedan meydana geldiği tespit edilmiştir. *J. phoenicea* ana bileşelerinin %24,9 α -pinen, %24,4 β -phellandrene, %12,9 α -terpinil asetatından oluştuğu tespit edilmiştir. *C. longus*dan elde

edilen ekstraktın esansiyel yağının seskiterpen hidrokarbonları bakımından oldukça zengin olduğu tespit edilmiştir. *C. longus* esansiyel yağında %46,6 β -himachalene, %16,9 α -humulene ve %10,1 γ -himachalene tespit edilmiştir. Tüm elde edilen esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri gıda hijyeni için çok önemli olan yedi bakteriye karşı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *M. Pulegium* en iyi antimikrobiyal aktivite göstermiş bunu *J. phoenicia* ve *C. longus* izlemiştir.

Ebrahimabadi ve arkadaşları (2010), *Salvia eremophila Boiss* esansiyel yağının içeriğini GC ve GC-MS ile tespit etmişler ve ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Esansiyel yağın %99,24' nün içeriğinden 28 bileşiği tespit ederek antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. *Salvia eremophila Boiss* bitkisinden elde edilen esansiyel yağ zayıf antioksidant aktivite gösterirken metanol ekstraktı ise daha yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir. *Salvia eremophila Boiss*' in esansiyel yağı ve metanol ekstraktı test edilen mikroorganizmalar karşısında oldukça iyi düzeyde antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Teixeira ve arkadaşları (2012), *European pennyroyal (Mentha pulegium)* bitkisinin esansiyel yağının kimyasal kompozisyonunu tespit ederek esansiyel yağın su (soğuk ve sıcak) ile etanolik ekstraktlarının in-vitro antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini tespit etmişlerdir. Bitkinin esansiyel yağındaki ana bileşenlerin %35,9 menthon, %23,2 pulegon ve %9,2 neo-mentol olduğunu tespit etmişlerdir. *M. pulegiumun* sıcak su ekstraktı çok yüksek antioksidan aktivite ve fenol içeriği sergilerken esansiyel yağı güçlü antibakteriyel özellikler göstermiştir. Aynı zamanda bu esansiyel yağın tüm bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *M. pulegium* ekstraktlarının ve esansiyel yağının gıda endüstrisinde kullanılan sentetik koruyuculara iyi bir alternatif olabileceği tespit edilmiştir.

Sarıkürkçü ve arkadaşları (2010), *Thymus longicaulis C. presl subsp. longicaulis* esansiyel yağının içeriğini GC ve GC-MS ile tespit etmişler ve ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini incelemiştir. Esansiyel yağın %99,61' inin içeriğinden 22 bileşik tespit etmişlerdir. Bu tespit edilen bileşiklerden, %27,8 γ -terpinen, %27,65 timol ve %19,38 p-simenin esansiyel yağın içeriğinde bulunduğunu belirlemiştir.

Hossain ve arkadaşları (2011), *Merremia borneensis* yapraklarından ve saplarından elde edilen esansiyel yağı GC-MS ile analiz ederek yapraklarından %96,81 ve saplarından %89,89 verimle 69 bileşiği tespit etmişlerdir. *Merremia borneensis* den elde edilen uçucu yağlarda monoterpenler ve seskiterpenleri belirlemişler ve disk difüzyon testini kullanarak antibakteriyel aktivitesini incelemişlerdir.

Amirah ve arkadaşları (2012), *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga* ve *Zingiber cassumunar* dan su buharı distilasyonu ile elde edilen esansiyel yağların kimyasal bileşimini GC-MS ile antimikrobiyal etkilerini ise disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri ile incelemişlerdir.

Espina ve arkadaşları (2011), ticari *citrus fruit* esansiyel yağının içeriğini GC-MS ile tespit etmişler ve üç ticari *citrus fruit*, (portakal [*Citrus sinensis*], limon [*Citrus lemon*] ve mandarin [*Citrus reticulata*])' un esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Ana bileşen olarak 65 bileşiği tespit etmişlerdir. Bu üç esansiyel yağın en önemli bileşeninin limonen %59-85 olduğunu belirlemişlerdir. Disk agar difüzyon tekniği kullanılarak elde edilen sonuçlara göre en iyi büyüme inhibitörü olarak mandarin (*Citrus reticulata*) gösterilir ve portakal (*Citrus sinensis*) ve limon (*Citrus lemon*) esansiyel yağlarından ayrılır.

Özkan ve arkadaşları (2010), *Salvia pisdica* bitkisinin esansiyel yağını GC-MS ile kimyasal bileşimini incelemişler ve ekstraktlarının biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışma yapmışlardır. GC-MS ile belirlenen esansiyel yağın ana bileşenleri olarak %23,76 kamfor, %19,2 sabinol, %14,2 α -thujone ve %5,8 eucalyptol (1,8 sineol) olarak belirlemişlerdir.

Sarıkürkçü ve arkadaşları (2009), *Vitex agnus castus* L. esansiyel yağını GC ve GC-MS ile bileşimini tespit etmişler ve antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Esansiyel yağın %94,5' nin içeriğinden 27 bileşik tespit etmişlerdir. Esansiyel yağın ana bileşenlerini %24,98 1,8-sineol, %13,45 sabinen, %10,6 α -pinen, %6,66 α -terpinil asetat ve %5,40 (Z)- β -farnesen olarak saptamışlardır. Elde edilen yağın antioksidan aktivitelerini, DPPH, β -karoten/linoleik asit, kuvvetli asit deneyleri olmak üzere üç

farklı yöntemle test etmişlerdir. Su ekstraktının diğer ekstraktlar (hekzan, diklormetan, etil asetat ve metanol) ve yağa göre daha iyi aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Okoh ve arkadaşları (2010), *Rosmarinus officinalis* L. esansiyel yağını hidrodistilasyon ve çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyon metodu ile elde etmişler ve elde edilen esansiyel yağın kimyasal bileşimini GC-MS ile tespit etmişlerdir. Ekstraktların antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. Elde edilen esansiyel yağın GC-MS ile analizi sonucu 24 bileşik saptanmış bunlardan 21 tanesi tanımlanmıştır.

Öztürk (1990), *Dorystoechas hastata* bitkisinin yaprak, çiçekli başaklar ve odunsu gövdelerinden su buharı distilasyonu ile elde ettiği uçucu yağının kimyasal bileşimini GC ve GC-MS ile analiz etmiştir. Elde edilen uçucu yağın verimini araştırmış ve uçucu yağlarda 84 adet madde saptanmış ve bunlardan 46 tanesini tanımlamıştır.

Bayramoğlu' nun (2007), çalışmasında oldukça yüksek antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olmaları nedeniyle, dağ kekiği (*Origanum vulgare* L.), defne (*Laurus nobilis* L.) ve biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyon ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yöntemleri ile elde edilen esansiyel yağlarının kimyasal bileşimlerini incelemiştir.

Candan ve arkadaşları (2003), yaptıkları çalışmada *A. millefolium subsp. Millefolium Afan'* in metanol ekstraktlarının ve uçucu yağlarının in-vitro şartlarda antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Elde edilen uçucu yağın GC-MS analizi sonucunda ana bileşenleri; 1,8-sineol, kamfor, terpineol ve β -pinen olmak üzere, 36 bileşik tanımlamışlardır. Çalışma sonucunda, suda çözünen ekstraktların yani polar fazının antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanında metanolik ekstraktların suda çözünmeyen kısımlarının ya çok düşük ya da hiç aktivite gösterememesine rağmen uçucu yağın altı mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal özellik gösterdiğini belirlemişlerdir. *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Candida albican* sa karşı orta düzeyde aktivite gösterirken *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* ve *Candida krusei*ye karşı düşük aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Karamenderes ve arkadaşları (2003), Türkiye' nin 7 farklı bölgesinden topladıkları *A. setacea* çiçeklerinden hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağların GC ve GC-MS analizleri sonucu ana bileşenlerini saptamışlar ve bu uçucu yağların in-vitro şartlarda antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Edirne, Tekirdağ, Niğde, Kırşehir, Kırklareli ve Burdur' dan toplanmış olan *A.setacea* uçucu yağlarının ana bileşeni 1,8-sineol (sırasıyla, %35,4 – 48,5 – 34,3 – 36,7 -38,2 – 42,3) olarak saptanırken, Sivas' tan toplanmış olan *A. setacea* uçucu yağının kamazulen içerdiği ve ana bileşenin %30,2 ile kamfor olduğu belirlenmiştir.

Bağcı ve arkadaşları (2008), Elazığ' da yetişen iki *Achillea* (*Achillea wilhelmsii* ve *A. schischkinii*) türünden su distilasyonu ile elde ettikleri uçucu yağların GC ve GC-MS ile analizleri sonucunda, sırasıyla otuz iki ve otuz altı bileşen tespit etmişlerdir. Bu bileşenler yaklaşık olarak yağın %99 ve %97,9' unu oluşturacak şekilde tanımlamışlardır. *Achillea wilhelmsii* de ana bileşenlerin, %7,9 kamfen, %6,6 1,8-sineol, %48,2 kamfor, %10,3 borneol ve %14,2 3-sikloheksan-1-ol, *A. schischkinii* de ise, %14,5 1,8-sineol, %8,9 linalol L., %12,9 kamfor, %7,6 isosiklositral, %10,9 borneol ve %6,3 karyofilen oksit olduğu tespit edilmiştir.

Özer ve arkadaşları (2010), *Alkanna tinctoria subsp. tinctoria* nın hidrodistilasyon ile elde ettiği uçucu yağının GC-MS ile kimyasal bileşimini ve in-vitro antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Uçucu yağın GC-MS analizi sonucunda 27 bileşen tanımlanmıştır. Ana bileşenler sırasıyla %22,27 pulegon, %13,03 1,8-sineol, %6,87 α -terpinil asetat, ve %6,83 isofitol. Örneklerin antioksidan aktivitleri β -karoten/linoleik asit, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), indirgenme gücü ve şelatlama etkisi adı verilen dört değişik test ile belirlenmiştir. Tüm sistemlerde uçucu yağlar en zayıf aktiviteyi göstermiştir. Diğer yandan, etil asetat ve su ekstraktları mükemmel antioksidan aktivite göstermiştir. Ekstraktların antioksidan aktivitleri yanı sıra, toplam fenolik ve flavonoid içeriğini de incelemişlerdir. Deneylere paralel olarak, etil asetat ve su ekstraktları fitokimyasallar açısından zengin bulunmuştur.

Yaylı ve arkadaşları (2005), açık havada kurutulan, hidrodistilasyon ile elde edilen *Centaurea sessilis* ve *Centaurea armena* nın uçucu yağlarını GC-MS aracılığıyla analiz

etmişlerdir. *C. sessilis* ve *C. armena* dan elde edilen uçucu yağların içerisinde sırasıyla, 40 ve 20 bileşen tanımlanmıştır ve bu taksonların ana bileşeni %12,4 ve %19,3 oranıyla β -eudesmol' dur. Bitkilerin izole edilen uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi de araştırılmıştır. Gram(+) ve Gram(-) bakterilere karşı ılımlı antibakteriyel aktivite göstermişler, fakat iki maya benzeri fungiye karşı hiç antifungal aktivite gözlenmemiştir.

Radulovic ve arkadaşları (2007), Balkan yarımadası endemikleri olan *Stachys germanica ssp. heldreichii* (Boiss) Hayek, *Stachys iva* Griseb., *Stachys plumosa* Griseb. ve *Stachys scardica* Griseb. türlerinin uçucu yağlarını clevenger aparatı kullanarak hidrodistilasyon ile 2,5 saat kaynatarak ekstrakte etmiş ve bileşenleri GC-MS ile belirlemişlerdir. Analiz sonucunda 83 bileşen tanımlanmıştır. *S. iva* (sect. *Candida*) türünün uçucu yağının ana bileşenleri %14 (Z)-Nusiferil izobütirat, %10 cis-kalemenen, %8,7 valeranon, %8,4 α -kopaen ve %8,1 spathulenol olarak belirlenmiştir. *S. Plumosa* türünün uçucu yağının ana bileşeni bağıl olarak büyük miktarda bulunan (%45,5) bir diterpen olan ar-abietatrienedir. Diğer anabileşenler ise %9,0 pinokarven, %8,2 cis-verbenol ve %6,5 karyofilen oksit olarak bulunmuştur. *S. germanica ssp. Heldreichii* uçucu yağında ki ana bileşenler %13,5 (E)-Nerolidol, %13,4 karyofilen oksit ve %8,1 germasiren D. olarak belirlenmiştir. Yağın büyük bir bölümü, seskiterpen hidrokarbonlarından (%48) ve oksijenli seskiterpenlerden (%31,9) oluşmaktadır.

Ebrahimabadi ve arkadaşları (2009), İran' da yetişen *Stachys inflata* uçucu yağını clevenger tipi bir aparatla metanol kullanarak ekstrakte etmişler ve kimyasal bileşimi ile antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Uçucu yağın GC ve GC-MS analizinde 45 bileşene rastlamışlardır. Ana bileşenler olarak %28,55 linalol, %9,45 α -terpineol, %8,37 spathulenol ve %4,62 (2E)-hekzenal olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda uçucu yağ ve ekstratların anti oksidan aktivitelerini 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve β -karoten/linolik asit kullanarak test etmişlerdir. Polar ve polar olmayan alt fraksiyon ekstraktlarının toplam fenolik içeriğini sırasıyla %5,4 ve %2,8 (w/w) olarak bulmuşlardır. Bitki, test edilen 3 çeşit mikroorganizmaya karşı zayıf antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ana bileşenleri olan linalol ve α -terpineolü de test etmişler ve antioksidan etki göstermediğini ancak antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler

3.1.1. Bitkisel Materyal

Çalışmada kullanılan haşhaş çiçekleri, 07-15 Haziran 2012 tarihleri arasında Afyon Bolvadin yöresindeki Afyon Alkaloidleri Fabrikası İşletme Müdürlüğü' ne ait ekim alanlarından temin edilmiştir.



Şekil 3.1 Afyon Alkaloidleri Fabrikası ekim alanları

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, tüm cam malzemelerin temizliğinde distile su kullanılmıştır.

- CH_2Cl_2
- Na_2SO_4 (kuru)
- CH_3OH (merk)
- %20 BF_3 metanol kompleksi
- NaCl
- n-Hekzan

3.1.3. Aletler

- Abbe Refraktometre (Zeiss QCL-RF-01)
- Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometresi Sistemi (GC-MS), (Shimadzu QP 5050A)
- Gaz Kromatografisi (GC), (HP Agilent 7890 A)
- Döner Buharlaştırıcı (Heidolph-2)

3.2. Deneysel Çalışma

Toplanan haşhaş çiçekleri temiz, kuru ve güneş ışığı almayan ortamda bir hafta süreyle kurutulmuştur. Kurutulan haşhaş çiçekleri porselen havanda ufalanarak Şekil 3.1’ de görüldüğü gibi deneye hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.2 Kurutulmuş haşhaş çiçekleri

3.2.1 Clevenger Düzeneği ile Sudan Hafif Yağın Distilasyonu

Çalışmamız kapsamında toplanan ve kurutulan haşhaş çiçeklerinin clevenger düzeneği kullanılarak uçucu yağ distilasyonu yapılmıştır. Bu işlemde 250 g materyal 2000 mL’ lik balona konulmuş ve üzerine 1000 mL saf su ilave edilerek 3,5 saat distilasyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla kullanılan düzenek Şekil 3.2’ de gösterilmektedir.



Şekil 3.3 Clevenger düzeneği

Bu sürenin sonunda yağ fazı su fazından ayrılmıştır. Su fazında bulunan yağların geri kazanılabilmesi için 3 defada toplam 30 mL CH_2Cl_2 (diklormetan) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Organik faz altta bulunan sulu fazdan ayrılmış ve organik faz susuz Na_2SO_4 (sodyum sülfat) kullanılarak kurutulmuştur. CH_2Cl_2 çözücüsü döner buharlaştırıcı yardımıyla vakum kullanılmadan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3). Elde edilen yağ fazları birleştirilerek amber şişelere konulmuş ve üzerinden azot gazı geçirilerek kapakları kapatılmıştır. Yağ örnekleri inkübatörde 4 ± 1 °C bekletilmiştir.



Şekil 3.4 Döner buharlaştırıcı ve elde edilen uçucu yağ

3.2.2 Analitik Çalışmalar

Haşhaş yağı üzerinde yapılan çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

- 1- Yoğunluk tayini (g/cm^3)
- 2- Kırılma indisi ($[n]_D^{20}$) tayini
- 3- Gaz kromatografisi – kütle spektrofotometresi (GC-MS) analizi
- 4- Gaz kromatografisi (GC) analizi

3.2.2.1 Yoğunluk Tayini

1 μL ' lik kılcal boru kullanılarak yoğunluk tayini yapılmıştır. Kılcal boru önce boş iken daha sonra su ile doldurularak tartılmıştır. Son olarak yağ örneği ile tartıldıktan sonra aşağıda belirtilen formüle göre yoğunluk hesaplanmıştır (Williams 1984).

$$d = \frac{c - a}{b - a} \quad (3.1)$$

a= Kılcal borunun boş iken tartımı (g)

b= Su ile dolu kılcal borunun tartımı (g)

c= Yağ ile dolu kılcal borunun tartımı (g)

3.2.2.2. Kırılma İndisi

Distile edilen uçucu yağların kırılma indisleri Abbe Refraktometresi ile belirlenmiştir (Firestone 1984).

3.2.2.3 Gaz Kromatografisi – Kütle Spektrofotometresi (GC-MS)

Haşhaş çiçeği yağının ana bileşenlerinin tanımlanması ve relatif yüzdelerinin belirlenmesi, Anadolu Üniversitesi Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (AÜBİBAM)' da GC-MS yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Gaz kromatografisi kütle spektrometresinin çalışma koşulları:

Sistem	: Shimadzu QP 5050A GC-MS
Dedektör	: FID
Kolon	: Agilent Innowax (60 m, uzunluk, 0,25 mm iç çap, 0,25 µm film kalınlığı)
Enjeksiyon Sıcaklığı	: 250 °C
Arayüz Sıcaklığı	: 250 °C
İyonlaştırma Modu	: EI
Elektron Enerjisi	: 70 eV
Kütle Aralığı	: 45-475 m/z
Sıcaklık Programı	: 60 °C 10 dak. // 4 °C/dak. 220 °C // 1 °C/dak. 240 °C // 30 dak.
Taşıyıcı Gaz	: Helyum
Gaz Akış Hızı	: 1 mL/dak.
Değerlendirmeler	: Wiley GC-MS Kütüphanesi

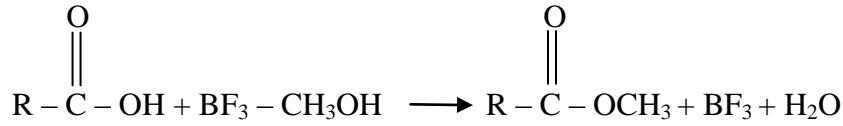


Şekil 3.5 Gaz kromatografisi – kütle spektrofotometresi (GC-MS) (İnt.Kyn.8)

3.2.3 BF₃ Metanol Yöntemi İle Metil Esterlerin Hazırlanması

Haşhaş çiçeğinden elde edilen uçucu yağdan 25 mg alınarak üzerine 1,5 mL 0,5 M'lık metanollü NaOH (sodyum hidroksit) çözeltisi eklendi. Çözelti üzerine azot gazı gönderilerek kabın ağzı kapatılıp karıştırıldı. 95 °C' de sıcak su banyosunda ısıtıldı. Daha sonra üzerine 2 mL %20' lik BF₃ – metanol kompleksi eklenerek azot gazından geçirilip tüpün ağzı kapatıldı. 30 dakika 95 °C' deki su banyosunda bekletildi. Çözeltiyeye 1 mL hekzan ilave edilerek 1 dakika süresince ısıtıldı. Daha sonra deney tüpü oda sıcaklığına kadar soğutulup organik fazın ve sulu fazın ayrılması için sulu faz NaCl (sodyum klorür) ile doyuruldu.

Üstteki n-hekzan fazından 1 mL alınarak gaz kromatografisi cihazında analiz edilmiştir.



3.2.3.1 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağlarının Yağ Asitlerinin Belirlenmesi

Clevenger düzeneği ile elde edilen haşhaş çiçeği uçucu yağının bileşiminde bulunan yağ asitlerinin tespit edilebilmesi için ilk olarak elde edilen uçucu yağ örneği Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) 2.301 metoduna göre yağ asiti metil esterlerine dönüştürülmüştür. Yağ asitlerini metil esterlerine dönüştürme işlemi GC analizi sırasında dedektör duyarlılığını artırmanın yanı sıra bileşenlerin uçuculuğunu artırmakta, ayırmayı kolaylaştırmakta ve piklerdeki kuyruklanmayı azaltmaktadır.

3.2.3.2 Gaz Kromatografisi (GC)

Haşhaş çiçeği uçucu yağının metil esterlerinin hazırlanmasından sonra Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' ne ait laboratuvarlarda GC ile aşağıda belirtilen çalışma koşullarında yağ asitleri içeriği tespit edilmiştir.

Gaz kromatografisinin çalışma koşulları:

Sistem	: HP Agilent 7890 A GC SYSTEM
Dedektör	: FID
Kolon	: HP5 – MS (uçucu yağ kolonu)
Sıcaklık Programı	: 60 °C, 3 °C / dak., 240 °C
Taşıyıcı Gaz	: Hidrojen 40 mL / dak Hava gazı 400 mL / dak. Azot gazı 50 mL / dak.
Sıcaklıklar	: Enjektör 250 °C Dedektör 250 °C



Şekil 3.6 Gaz kromatografisi (HP Agilent 7890 A GC System)

3.2.4 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Haşhaş çiçeği uçucu yağının antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan standart bakteri suşları *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (NRRL-B 767), *Salmonella typhimurium* (NRRLB-4420), *Bacillus subtilis* (NRS-744), *Proteus vulgaris* (ATCC-13315), *Micrococcus luteus* (ATCC-9341), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* (ATCC 11778) Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir.

Klebsiella pneumoniae ve *Pseudomonas aeruginosa* ise Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalında API ile identifikasyonu yapılan suşlardır.

Fungus izolasyonu hava, karabiber ve kekikten yapılmıştır. Türlerin teşhis işleminde ve izolasyonda malt agar kullanılmıştır. Tüplerdeki stok kültürlerde içerisinde türler için uygun agar bulunan petrilere iğne öze kullanılarak nokta ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan bu kültürler, 14 gün süre ile inkübe edildikten sonra oluşan koloniler makroskopik ve mikroskopik olarak incelenerek cins düzeyinde teşhisleri yapılmıştır.

3.2.4.1. Antimikrobiyal Aktivite Tespitinde Kullanılan Besiyerler

Nutrient Agar (NA)

Beef (Acumedia 7228A)	3,0 g
Pepton (Merck 07214)	5,0 g
Agar (Fluka 05039)	15,0 g
Distile su	1000 mL

Tartılan malzemeler erlenmayer içerisinde distile su ile karıştırılıp besiyerinin erimesi sağlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildikten sonra mikroorganizma suşlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için steril petri kaplarına konulmuştur.

Nutrient Broth (NB)

Pepton (Merck 07214)	5,0 g
Beef ekstrakt (Acumedia 7228A)	3,0 g
distile su	1000 mL

Potato Dextrose Agar (PDA)

Patates infüzyonu	4,0 g
D (+) glikoz	20,0 g
Agar (Fluka 05039)	15,0 g
Distile su	1000 mL

Tartılan malzemeler erlenmayer içerisinde distile su ile karıştırılıp besiyerinin erimesi sağlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi.

Malt Agar

Malt ekstraktı	30,0 g/L
Peptone from soymeal	3,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L
Distile su	1000 mL

Tartılan malzemeler erlen içerisinde distile su ile karıştırılıp besiyerinin erimesi sağlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika sterilize edildi.

3.2.5 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Antibakteriyel Aktivitelerin Araştırılması

Bu çalışmamızda haşhaş çiçeği yağının bakteriler üzerine etkileri Disk Difüzyon Testi ve Dilüsyon Testi metotları ile incelenmiştir. Testler en az üç kere tekrar edilmiş ve ölçülen değerlerin ortalamaları alınmıştır. Negatif kontrol olarak DMSO, Meropenem

(MEM), Amoxicillin/clevulinic acid (AMC), Ceftriaxone (CRO); Gram (-) Vancomycin (VA), Penicillin (P) ve Ceftriaxone (CRO); Gram (+) bakteriler için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.5.1 Disk Difüzyon Testi

Haşhaş çiçeği yağı mikropipet yardımıyla 6 mm çapında boş steril disklerle emdirilmiştir. Bakteri kültürleri 0,5 Mc Farland (McF)' a gelinceye kadar 37 °C' de NB' da inkübasyona bırakılmıştır. 0,5 McF standardına göre ayarlanan bakteri süspansiyonları agar besiyeri bulunan petrilere steril pamuklu silgiçler ile ekilmiştir. Bakteri ekimi yapıldıktan sonra hazırlanan diskler besiyerinin yüzeyine yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında yarım saat bekledikten sonra 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Oluşan zonların çapları mm olarak ölçülmüştür.

3.2.5.2 Buyyonda Mikrodilüsyon Testi

Bu test belirlenmiş koşullar altında standardize edilmiş inoküle edilecek bakterilerin üremesini inhibe etmek için gerekli olan bir uçucu yağın konsantrasyonunu belirler. Bu yarı otomatik mikrotiter metod küçük hacimli broth içinde çözülen ve miktarı belirlenmiş uçucu yağ kullanılarak ölçülür. Minimal inhibitör konsantrasyonu (MIK) denilen nokta mikrobiyal üremenin olmadığı, açık gözükten en son broth kuyucuğudur. MIK, bize in-vivo olarak bakterileri inhibe etmek için gerekli olan uçucu yağın miktarını verir. MIK dilüsyon testleriyle, içlerinde denenecek uçucu yağın, ekstraktın veya kemoterapötüğün geometrik olarak faktör 2 ile dilüsyonu yapılan besiyerlerine denenecek suştan ekim yapıldıktan sonra inkübasyonu izleyerek üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon (mg/L) saptanır.

Çalışmamızda buyyonda mikrodilüsyon testi kullanılarak MIK saptanmıştır. Mikropleytlere farklı konsantrasyonlarda haşhaş çiçeği yağı içeren 75 µL buyyon çukurcuklara eklendikten sonra üzerine 0,5 McF standardına göre ayarlanan bakteri süspansiyonundan ekim yapılmıştır. 37 °C' de 24 saat inkübe edildikten sonra üremenin olup olmadığı bulanıklığına göre saptanmıştır.

3.2.6 Fungus Aktivitesinin Araştırılması

Antifungal aktivite Agar Difüzyon Plak Metodu ile belirlenmiştir. 20 mL PDA 9 cm çapındaki petrilere dökülüp, petrinin tam ortasında 9 cm çapında agar uzaklaştırıldıktan sonra 100 µL ekstrakt bu çukur içerisine eklenmiştir. 1 haftalık fungal kültürlerin her birinden 5 mm çapında örnek alınarak, sporları besiyerine gelecek şekilde agar üzerine yerleştirilmiştir. Petriler 20 °C 10 gün inkübe edilmiştir. Kontrol grubu olarak distile su bulunan plaklarla misalyal büyümenin plakların ortasındaki etken maddeye olan uzaklıkları belli aralıklarla milimetrik olarak ölçülerek karşılaştırılmış ve % inhibisyon hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Clevenger düzeneği ile haşhaş çiçeği uçucu yağının eldesine yönelik yürütülen deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen uçucu yağ verimi %0,2 dir.

4.1 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağının Fiziksel Özellikleri

Haşhaş çiçeği uçucu yağı örnekleri ağır olmayan karakteristik bir kokuya sahip açık sarı renkte erime noktası 24-26 °C aralığında olan viskoz sıvı şeklindedir.

Haşhaş çiçeği uçucu yağının yoğunluk, kırılma indisi ve erime noktası değerleri aşağıda Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Haşhaş çiçeği uçucu yağının yoğunluk, kırılma indisi ve erime noktası değerleri

	yoğunluk (g/cm ³)	kırılma indisi ($[n]_D^{20}$)	erime noktası (°C)
Haşhaş çiçeği uçucu yağı	0,71	1,47	24,7

4.2 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağının Bileşenlerinin Tespiti

Haşhaş çiçeği uçucu yağının bileşenleri GC-MS ile analiz edildi. Çizelge 4.2' de elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.2 Haşhaş çiçeği uçucu yağının bileşenleri ve bileşenlerinin relatif yüzdeleri

Pik No	Alikonma Zamanı (dak.)	Bileşen	Relatif Yüzde
1	23,22	C ₉ n-Nonaldehit / Pelargonaldehit	3,47
2	32,84	C ₁₇ n-Heptadekan	3,26
3	38,12	C ₁₉ n-Nonadekan	8,96
4	43,20	C ₂₁ Heneikosan	10,83
5	46,84	C ₁₉ 1-Nonadekanol	16,31
6	47,83	C ₂₃ n-Trikosan	1,39
7	51,36	C ₂₂ n-Dokosan	1,69
8	52,12	**	1,97

Çizelge 4.2 (Devam) Haşhaş çiçeği uçucu yağının bileşenleri ve bileşenlerinin relatif yüzdeleri

Pik No	Alıkonma Zamanı (dak.)	Bileşen	Relatif Yüzde
9	52,49	C ₂₅ n-Pentakosan	7,91
10	58,73	C ₂₇ n-Heptakosan	5,19
11	59,18	C ₂₇ 1-Heptakosanol	4,09
12	66,00	C ₁₆ Palmitik Asit	7,26
13	67,85	C ₂₉ Nonakosanol	1,42
14	72,24	**	7,62
15	95,73	**	1,48
16	97,15	**	1,11

** Tespit edilememiştir.

GC-MS analizi sonucunda haşhaş çiçeği uçucu yağında çok uçucu bileşenler olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Ana bileşenlerinin n-nonadekan (%8,96), heneikosan (%10,83), n-pentakosan (%7,91), n-heptakosan (%5,19), 1-heptakosanol (%4,09), palmitik asit (%7,26) ve 1-nonadekanol (%16,31) olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi uzun düz zincirli hidrokarbonlu fraksiyonlar ve yüksek molekül ağırlıklı doymuş hidrokarbonların yanı sıra yüksek molekül ağırlıklı aldehit ve alkollerde yapıda bulunmaktadır.

Haşhaş çiçeği yağının bileşimine bakıldığında tek karbon sayılı bileşiklerin (C₉-C₂₉) sayısının çift karbon sayılı (C₁₆, C₂₂) olanlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Haşhaş çiçeği yağının uçucu yağdan ziyade stearopten (uçucu yağın katı kısmı) türünde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar Aycı vd.' nin 2005' de yaptığı gül koncreti ve absolüsünün katı atık kısmının GC ve GC-MS ile yapılan analiz sonuçlarında bulunan bileşenlerle benzerlik göstermektedir. Farklı olarak haşhaş çiçeği yağındaki bileşenler arasında daha düşük sayılı hidrokarbonlar, aldehit ve alkoller bulunmaktadır. Haşhaş çiçeği yağının karakteristik kokusunu veren bileşenlerde bu aldehit ve alkollerdir. Mladenova et al.' in Bulgar gül koncretinin katı atık kısmı üzerinde yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur.

4.3 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağının Doymuş ve Doymamış Yağ Asitleri

Clevenger düzeneği ile elde edilen haşhaş çiçeği uçucu yağı yağ asitleri içerdiği için yağ asitleri GC ile saptanmıştır. Haşhaş çiçeği uçucu yağı öncelikle BF₃ metanol yöntemi ile metil esterlerine dönüştürülmüştür. Yağ asitlerini belirlemede yağ asiti metil esterleri standardı (Çizelge 4.3) (37 Component FAME mix) kullanılmıştır.

Haşhaş çiçeği yağına ait pikler ile yağ asiti standardına ait pikler karşılaştırılarak örneğimizdeki yağ asitleri tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3 Yağ Asiti Metil Esteri Standartları

Pik No	Yağ asiti metil esterleri	Tutunma süresi (dakika)
1	C _{6:0} (kaproik asit)	3,55
2	C _{8:0} (kaprilik asit)	3,73
3	C _{10:0} (kaprik asit)	4,17
4	C _{11:0} (andekanoik asit)	4,54
5	C _{12:0} (laurik asit)	5,05
6	C _{13:0} (tridekanoik asit)	5,80
7	C _{14:0} (miristik asit)	6,39
8	C _{14:1} (miristeloik asit)	6,88
9	C _{15:0} (pentadekanoik asit)	7,66
10	C _{15:1} (cis-10-pentadekanoik asit)	8,45
11	C _{16:0} (palmitik asit)	9,38
12	C _{16:1} (palmitoleik asit)	10,07
13	C _{17:0} (heptadekanoik asit)	11,25
14	C _{17:1} (cis-10-heptadekanoik asit)	14,13
15	C _{18:0} (stearik asit)	15,08
16	C _{18:1ω9t} (elaidik asit)	19,00
17	C _{18:1ω9c} (oleik asit)	19,63
18	C _{18:2ω6t} (linoleadik asit)	20,67
19	C _{18:2ω6c} (linoleik asit)	21,82
20	C _{20:0} (araşidik asit)	22,85
21	C _{18:3ω6} (γ-linolenil asit)	28,65
22	C _{20:1ω9} (cis-11-eikosenoik asit)	32,54
23	C _{18:3ω3} (α-linolenik asit)	34,02
24	C _{21:0} (heneikosaenoik asit)	34,94

Çizelge 4.3 (Devam) Yağ Asiti Metil Esteri Standartları

Pik No	Yağ asiti metil esterleri	Tutunma süresi (dakika)
25	C _{20:2} (cis-11,14-eikosadienoik asit)	35,80
26	C _{20:3ω6} (cis-8,14,14-eikosatrienoik asit)	36,80
27	C _{22:0} (behenik asit)	38,04
28	C _{20:4ω6} (araşidonik asit)	41,17
29	C _{22:1ω9} (erusak asit)	42,50
30	C _{23:0} (trikosanoik asit)	47,02
31	C _{20:3ω3} (cis-11,14,17-eikosatrienoik asit)	49,13
32	C _{22:2} (cis-13,16-dokosadienoik asit)	52,29
33	C _{24:0} (lignoserik asit)	53,12
34	C _{20:5ω3} (cis-5,8,11,14,17-eikosapentaenoik asit)	55,82
35	C _{24:1ω9} (nervonik asit)	56,12
36	C _{22:6ω3} (cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksaenoik asit)	58,10

Haşhaş çiçeği yağının yağ asitleri bileşimi Çizelge 4.4' de verilmiştir. Çizelge 4.4' de görüldüğü gibi haşhaş çiçeği yağı doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. Çift karbon sayılı yağ asitlerinin tek karbon sayılı olanlardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4 Haşhaş çiçeği uçucu yağında bulunan doymuş ve doymamış yağ asitleri

Sıra No	Yağ Asitleri
1	C _{13:0} tridekanoik asit
2	C _{14:0} miristik asit
3	C _{16:0} palmitik asit
4	C _{18:0} stearik asit
5	C _{18:1n9c} oleik asit
6	C _{18:2n6c} linoleik asit
7	C _{18:3n3} linolenik asit
8	C _{20:2n6} eikasadienoik asit
9	C _{20:3n3} eiksatrienoik asit

Haşhaş çiçeği yağının yağ asiti bileşenleri, Doğu Anadolu Haşhaşı' nın (*Papaver bractearum*) tohum bileşenleri ile karşılaştırılmıştır. Haşhaş çiçeği yağ asitleri

bileşenleri ile Doğu Anadolu Haşhaşı tohumları arasında yağ asitleri bileşenleri arasında benzerlikler kaydedilmiştir. Doğu Anadolu Haşhaşı' nın başlıca yağ asitleri palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asittir. Söz konusu yağ asitleri haşhaş çiçeği yağında da tespit edilmiştir (Şen vd. 2008).

4.4 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Disk Difüzyon Tekniği İle Antibakteriyal Etkinin Saptanması

Haşhaş çiçeği yağında disk difüzyon tekniği ile antibakteriyal etki saptanmıştır. Çizelge 4.5' de sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.5 Disk difüzyon tekniği ile antibakteriyal etkinin saptanması

Test Organizması	MEM	AMC	CRO	VA	P	DMSO	Papaver somniferum
Gram (-)							
<i>Salmonella typhimurium</i> (NRRLB-4420)	3,7	1,2	1,5			-	0,6
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC-13315)	3,5	2,5	3,5			-	1,0
<i>Klepsiella pneumoniae</i>	2,7	1,3	2,1			-	0,8
<i>Escherichia coli</i> (ATCC-25922)	3,0	2,0	1,6			-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-7664)	2,0		-			-	-
Gram (+)							
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC-11778)			0,8	1,9	1,2	-	0,7
<i>Bacillus subtilis</i> (NRS-744)			0,8	1,9	1,0	-	0,6
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC-9341)			4,0	3,6	4,2	-	1,2
<i>Listeria monoactopenus</i> (ATCC-7644)			0,9	2,1	1,0	-	0,7
<i>Stapylococcus aureus</i> (MRRL-B 767)			3,0	2,0	3,4	-	-
Dimetil sülfoksit (DMSO), Meropenem (MEM), Amoxicillin/clavulinic acid (AMC), Ceftriaxone (CRO), Vancomycin (VA), Penicillin (P)							

Haşhaş ekstresinin hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. En fazla antimikrobiyal etki 1,2 mm ile *Micrococcus luteus* da görülmüştür. Bunu *Proteus vulgaris* (1mm) ve *Klepsiella pneumoniae* (0,8mm) takip etmiştir (Çizelge 4.5).

4.5 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Buyyonda Mikrodilüsyon Testi

Haşhaş çiçeği uçucu yağında Buyyonda Mikrodilüsyon testi kullanılarak MIK belirlenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Buyyonda testi ile MIK belirlenmesi

Test organizması	Dilüsyon oranı					
	Doygun çözelti	1/3D	1/9D	1/12D	1/15D	1/18D
<i>Escherichia coli</i> (ATCC-25922)	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRRL-B 767)	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> (NRRLB-4420)	-	+	+	+	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC-13315)	-	-	-	-	+	+
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC-11778)	+	+	+	+	+	+
<i>Klepsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+	+	+

(+) üreme var, (-)Üreme yok, (D) Dilüsyon

Klepsiella pneumoniae, *Salmonella typhimurium* (NRRLB-4420) da minimum inhibisyon haşhaş doymun çözeltisinde, *Proteus vulgaris* (ATCC-13315) ise 1/12' lik dilüsyonda olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6) .

4.6 Haşhaş Çiçeği Uçucu Yağında Antifungal Etkilerin Belirlenmesi

Haşhaş çiçeği uçucu yağının antifungal etkileri belirlenmiş olup sonuçlar Çizelge 4.7' de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Haşhaş çiçeği uçucu yağının antifungal etkileri

Test organizması	% inhibisyon			
	2.Gün	4.Gün	7.Gün	10.Gün
<i>Aspergillus sp.</i> (kekik)	13,06	30,90	17,18	3,19
<i>Penicillium sp.</i> (karabiber)	12,41	40,74	8,03	16,10
<i>Alternaria sp.</i>	3,82	12,55	24,95	0,00
<i>Mucor sp.</i>	7,69	5,66	5,63	24,50
<i>Clodosporium sp.</i>	6,02	3,94	0,85	12,8

Aspergillus sp. ve *Penicillium sp.* de misalyal gelişimde maksimum inhibisyonun 4. günde, *Alternaria sp.* de 7. günde, *Mucor sp* ve *Clodosporium sp.* de ise 10. günde olduğu belirlenmiştir. Genel olarak haşhaş ekstraktının denenen fungusların misalyal gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır (Çizelge 4.7).

Bazı bitki ekstraktlarının ve uçucu yağlarının mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Uçucu yağlar, bitkilerden ya da bitkisel droglardan, çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı olan bazen donabilen, kristalleşebilen, keskin kokulu ve su buharı ile sürüklenebilen yağimsı karışımlardır. 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 belirtilmektedir (Toroğlu ve Çenet 2006).

Organik asit moleküllerinin bir kısmı sindirim kanalında çözünmezler. Çözünmeyen formdaki organik asitler, özellikle gram negatif bakterilerin mikrobiyal hücre duvarına kolayca penetre olabilirler. pH' ın hedeflenen değerlerinin altına düşmesi ise hücre içindeki asit moleküllerinin çözünmesine neden olur.

Hücre duvarı, asitlerce serbest bırakılan protonları ortadan kaldırmaya çalışır. Bu durum, enerji tüketen bir işlemdir ve bakteriyel metabolizmanın bütün gücünü tüketir ki sonuç olarak bakteri hücresinin ölmesine neden olur. Buna ek olarak; kalan anyonlar sitoplazmada ya da hücre çekirdeğinde belirli kritik prosesleri engeller.

Organik asitler, *E.coli* gibi potansiyel patojen mikroorganizmaların kontrolünde rol oynayabilirler ve böylece antibiyotiklere karşı doğal bir alternatif sunmaktadırlar. Farklı organik asitleri kombine eden kompleks ürünlerin yüksek dilüsyon düzeylerinin ve formik, laktik, sorbik asitler ile tuzları gibi tek asidin yüksek dozlarının pozitif etkilerinin olduğu, çoğu çalışmayla kanıtlanmıştır (Yıldırım 2006).

Manju ve ark. (2011). *Papaver somniferum* etanol ekstratlarının antimikrobiyal etkisini disk difüzyon tekniği ile araştırmış ve çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu

hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğini, antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve anti helmitik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Çağlayan ve ark (2009). *Papaver* (*Papaveraceae*) türlerinin eter ve dietileter ekstratlarının *Staphylococcus aureus* a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirlemişlerdir. (MIC: 9,76 and 19,52 µg/mL)

Papaver macrostomum ekstratlarının *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, maya ve *A. niger* a karşı antimikrobiyal etki gösterdiği ve çiçek ekstraktlarının yatak yarası lezyonlarında kullanılabileceğini bildirilmiştir (Khanafari et al. 2013).

Benzer olarak çalışmamızda, haşhaş çiçek ekstresinin hem Gram (+) hemde Gram (-) bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. En fazla antimikrobiyal etki 1,2 mm ile *Micrococcus luteus* da görülmüştür. Bunu *Proteus vulgaris* (1 mm) ve *Klepsiella pneumoniae* (0,8 mm) takip etmiştir (Çizelge 4.5). Aynı zamanda uçucu yağın denenen tüm fungal türler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır. *Aspergillus sp.* ve *Penicillum sp.* de misalyal gelişimde maksimum inhibisyonun 4. günde, *Alternaria sp.* de 7. günde, *Mucor sp* ve *Clodosporium sp.* de ise 10. günde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada haşhaş çiçeğinden (*Papaver somniferum* L.) hidrodistilasyon metodu ile elde edilen uçucu yağların bileşenleri GC ve GC-MS metodu ile araştırılmıştır. Uçucu yağın BF₃ metanol yöntemi ile metil esterleri hazırlanmış ve haşhaş çiçeğinin yağ asitleri belirlenmiştir. Esansiyel yağı karakterize etmek için yoğunluk tayini ve kırılma indisine de bakılmıştır. Ayrıca çiçekten elde edilen esansiyel yağın biyolojik aktivitesini incelemek amacıyla antibakteriyel özellikleri Disk Difüzyon Testi ve Buyyonda Mikrodilüsyon Testi ile, antifungal özellikleri ise Agar Difüzyon Plak Metodu ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre haşhaş çiçeği uçucu yağının antimikrobiyal özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, clevenger düzeneği kullanılarak kurutulmuş haşhaş çiçeklerinden uçucu yağ elde edilmiş ve elde edilen uçucu yağın yoğunluğu 0,71 g/cm³, kırılma indisi 1,47 ($[n]_D^{20}$) ve erime noktası 24,7 °C olarak bulunmuştur.

Haşhaş çiçeği uçucu yağının bileşimi GC-MS ile yağ asitleri ise GC ile tespit edilmiştir. GC-MS yöntemine göre haşhaş çiçeği uçucu yağının analizinde 16 tane bileşen bulunmuş ve bunlardan 12 tanesi tanımlanmış, 4 tanesi ise tespit edilememiştir. Tespit edilen bileşenlere bakıldığında tek karbon sayılı bileşiklerin (C₉-C₂₉) sayısının, çift karbon sayılı bileşiklerin (C₁₆, C₂₂) sayısından fazla olduğu tespit edilmiştir. Ana bileşenlerinin n-nonadekan (%8,96), heneikosan (%10,83), n-pentakosan (%7,91), n-heptakosan (%5,19), 1-heptakosanol (%4,09), palmitik asit (%7,26) ve 1-nonadekanol (%16,31) olduğu tespit edilmiştir. Haşhaş çiçeği uçucu yağının, uçucu yağdan ziyade stearopten türünde olduğu belirlenmiştir.

BF₃ metanol yöntemiyle metil esterlerine dönüştürülen haşhaş çiçeği uçucu yağının GC yöntemine göre analiz sonucunda 9 tane bileşen belirlenmiş ve haşhaş çiçeği uçucu yağının doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca çift karbon sayılı yağ asitlerinin tek karbon sayılı olanlardan daha fazla olduğu görülmüştür.

Haşhaş çiçeği yağının antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi amacı ile disk difüzyon

testi, buyyonda mikrodilüsyon testi ve antifungal etkilerinin belirlenmesinde ise agar difüzyon plak metodu kullanılmıştır.

Disk difüzyon testine göre, haşhaş çiçeği uçucu yağının hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmüştür. En fazla antimikrobiyal etki 1,2 mm ile *Micrococcus luteus* da görülmüştür. Bunu *Proteus vulgaris* (1 mm) ve *Klepsiella pneumoniae* (0,8 mm) takip etmiştir.

Buyyonda mikrodilüsyon testine göre, *Klepsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*da minimum inhibisyon haşhaş doygun çözeltisinde, *Proteus vulgaris* ise 1/12' lik dilüsyonda olduğu saptanmıştır.

Haşhaş çiçeği uçucu yağının antifungal etkisine bakıldığında bu uçucu yağın denenen tüm fungal türler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır. *Aspergillus sp.* ve *Penicillum sp.* de misalyal gelişimde maksimum inhibisyonun 4. günde, *Alternaria sp.* de 7. günde, *Mucor sp* ve *Clodosporium sp.* de ise 10. günde olduğu belirlenmiştir. Genel olarak haşhaş ekstraktının denenen fungusların misalyal gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Amirah, T.S., Kamazeri, T.G., Samah, A.O., Taher, M., Susanti, D. and Qaralleh, H. (2012). Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 202-209.
- Aslan, N. (2005). Kekik Tarımı ve Kullanım Alanları, Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Lisans Bitirme Tezi.
- Aycı, F., Aydınli M., Bozdemir Ö.A. and Tutaş M. (2005). Gas chromatographic investigation of rose concrete, absolute, and solid residue, *Flavour and Fragrance Journal*, **20**: 481-486
- Aymonier, C., Erriguible, A., Marre, S., Serani, A. and Cansel, F. (2007). Processes using supercritical fluids: A sustainable approach for the design of functional nanomaterials, *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, **5**: A77.
- Bağcı, E., Koçak, A. ve Yüce, E. (2008). *Achillea wilhelmsii* C. Koch ve *Achillea schischkinii* Sosn. türlerinin uçucu yağ kompozisyonu. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, **20**: 251-255.
- Baydar, H. (2005). Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, SDÜ basımevi, **51**: 77.
- Bayramoğlu, B. (2007). Çözücüsüz mikrodalga ekstraksiyonu ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yöntemleri ile bitkilerden esansiyel yağların elde edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Tek. Üniv. Fen Bilimleri Enst. Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara.
- Baytop, A. (1972). Bitkisel drogların anatomik yapısı. İst. Üniv. Ecz. Fak. Yay. No. 829, İstanbul.
- Baytop, A. and Saraçoğlu, M. (1982). Türkiye' nin *Papaver* türleri üzerinde araştırmalar, İst. Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları No.34, s.28-32. İstanbul.
- Baytop, T. (1986). Farmakognozi Ders Kitabı, Cilt I, İst. Üniv. Yay. İstanbul 1970; 4. baskı: İst. Üniv. Yay. No.3399, Ecz. Fak. Yay. No.51, Taş Matbaası, İstanbul.
- Benli, M. ve Yigit, N. (2005). Ülkemizde yaygın kullanımı olan Kekik (*Thymus vulgaris*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt:3, Sayfa:1-8.

- Berk, A. (1953). Esanslar (Eterik yağlar), İstanbul Hüsnü Tabiat Matbaası
- Beyer, H. (1976). Organic chemistry textbook. 18th edition has been revised by Walter Wolfgang. Stuttgart.
- Büyükkaya, F. (2002). *Sideritis trojana* (tüylü çay, sarıkız çayı, adaçayı, dağ çayı) bitkisinin kimyasal analizi ve bileşenlerinin yapılarının aydınlatılması, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2-35.
- Candan, F., Ünlü, M., Tepe, B., Deferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A. and Akpulat, H.A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium subsp. millefolium* Afan. (Asteraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, **87**: 215.
- Çelik, E. ve Çelik, G.Y. (2007). Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri, *Orlab-Online mikrobiyoloji dergisi*, **5**: 2-6.
- Ceylan, A. (1983). Tıbbi Bitkiler. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bornova İzmir, **2**: 481.
- Ceylan, A. (1987). Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ İçerenler), Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, İzmir, **2**: 481-188.
- Ceylan, A. (1997). Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını, İzmir, **2**: 481.
- Çağlayan, Ü., Özbek, B.S. and Günay, M.A. (2009). Antimicrobial activity of four annual *Papaver* species growing in Turkey Pharmaceutical Biology, *International Journal of Pharmacognosy*, **47**: 4-6.
- Çolak, N. ve Tülek, Y. (2003). Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
- Dağcı, E., İzmirli, K. ve Dığrak, M. (2002). Kahramanmaraş ilinde yetişen bazı ağaç türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, Cilt:5, Sayı:1.
- Delamare, A.P.L., Pistorello I.T.M., Articoa, L., Serafinia, A.L. and Echeverrigaraya, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *salvia Officinalis* L. and *salvia Triloba* L. cultivated in South Brazil, *Food Chemistry*, **100**: 603-608.
- Diñçer, S., Acaralı, N.B., Uzun, I.N. and Deniz, S. (2007). A second option in special seperation operations: A supercritical fluid process. *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, Cilt:25, Sayı:2.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants.

- Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**: 308-316.
- Ebrahimabadi, A.H., Ebrahimabadi, E.H., Bidgoli, Z.D, Kashi, F.J., Mazoochi, A. and Batooli, H. (2009). Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran, **112**: 388-393.
- Ebrahimabadi, A.H., Mazoochi, A, Kashi, F.J., Bidgoli, Z.B. and Batooli, H. (2010). Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran, *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 1371-1376.
- Eloff, J.N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants, *J. Ethnopharmac*, **60**: 1-8.
- Erdoğan, A.E. ve Everest, A. (2013). Antimikrobiyal ajan olarak bitki bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **6**: 27-32.
- Erdurmuş, A. ve Öneş, Y. (1990). Haşhaş TMO-alkasan Yayınları, Ankara, 1-24.
- Ertürk, Ö. and Demirbağ, Z. (2003). *Scorzonare Mollis* Bieb. (*Compositae*) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi, *ÇEV-KOR*, **12**: 27-31.
- Eskilsson, CS. and Bjorklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.*, **902**: 227–250.
- Espina, L., Somolinos, M., Loran S., Conchello, P., Garcia, D. and Pagan, R. (2011). Chemical composition of commercial *citrus fruit* essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, **22**: 896-902.
- Evans, W.C. (1989). Trease and Evans 'Pharmacognosy, 13'th Ed., Bailliere Tindall, London, p. 424.
- Firestone, D. (1984). Oils and Fats. In official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 14th edit., S. Williams (Ed.). Richmond, Virginia, The William Byrd Press, Inc., pp. 503-532.
- Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Pierce, M.M., Niemann, L. and Niekman, D.K. (1990). Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Science*, **55**: 95-98.
- Galipo, R.C., Canhoto, A.J., Walla, M.D. and Morgan, S.L. (1999). Analysis of volatile fragrance and flavor compounds by headspace solid phase microextraction

- combined with gas chromatography-mass spectrometry. An instrumental analysis experiment. *University of South Carolina*, **76**: 245-248.
- Guenther, E. (1948). The essential oils, Robert, E. Krieger Publishing Co., Inc., Malabar, Florida. **1**: 6.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology*, **86**: 985-990.
- Hısıl, Y. ve Ünlü, Z.N. (1996). Süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon teknolojisi ve gıda sanayindeki uygulamaları, *Gıda Teknolojisi*, **1**: 46-54.
- Hossain, M.A., Shah, M.D., Sang, S.V. and Sakari, M. (2011). Chemical composition and antibacterial properties of the essential oils and crude extracts of *Merremia borneensis*. *Journal of King Saud University – Science*, **24**: 243-249.
- Hugh, M.A. and Krukonis, V.J. (1986). Supercritical fluid extraction principles and practice, Butterwords, Boston.
- IUPAC 2.301. Preparation of the Fatty Acid Methyl Esters Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, Blackwell Scientific Publications, Oxford England, 151.
- İncekara, F. (1964). Endüstri Bitkileri ve Islahı. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, İzmir.
- Karabacak, Ç. (2007). Bazı *Scutellaria orientalis* türlerinin içerisindeki ekstraktif bileşiklerin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Karamenderes, C., Karabay, N.Ü. ve Zeybek, U. (2003). Türkiye’ de farklı lokalitelerden toplanan *Achillea setacea waldst kit.* uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal aktivitesi. *Ankara Ecz. Fak. Dergisi*, **32**: 113-120.
- Kaufmann, B. and Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, **13**: 105-113.
- Khanafari, A., Yaghoub, G., Zangeneh, N. and Sharifnia, F. (2013). Combined application of *Microbial cellulose* and *Papaver macrostomum* extract on bedsore Microorganisms Jundishapur. *Journal of Microbiology*, **6**: 220.
- Kırbağ, S. and Bağcı, E. (2000). *Picea abies* (L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) Link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma. *Journal of Qafqaz University*, **3**: 183-190.

- Kıvanç, M. ve Akgül, A. (1986). Antibacterial activities of essential oils from Turkish *Spices and Citrus*, *Flavour and Fragrance Journal*, **1**: 175-179.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Lippincott-Raven Pub, Philadelphia, USA, 785-856.
- Leal-Cardoso, J.H. and Fonteles, M.C. (1999). Pharmacological effect of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **71**: 207-213.
- Manju, V., Revathi, R. and Murugesan, M. (2011). Antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, anthelmintic activity and phytochemical analysis of Indian medicinal spices. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, **4**: 4.
- Mladenova, K., Yochkova, YA. and Stoinova, B.I. (1983). Wax composition of the Kazanlik and Damask roses, *Phytochemistry*. **22**: 943-945
- Moyler, D.A. (1993). Extraction of essential oils with carbon dioxide. *Flavour and Fragrance, J. Vol.*, **8**: 235-247.
- Mouhssen, L. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.*, **18**: 435-448.
- Mukhopadhyay, M. (2000). *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*, CRC Press LLC, Florida, 131-141.
- NCCLS, (1993). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard NCCLS Publication M2-A5, Villanova PA, USA.
- Nostro, A., Germano, M.P., Angelo, V.D., Marino, A. and Cannatelli, M.A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, **30**: 379-384.
- Okoh, O.O., Sadimenko, AP. and Afolayan, A.J. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, **120**: 308–312.
- Ouazzou, A.A., Loran, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagan, R. and Conchello, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, **45**: 313–319.
- Özatlı, N.S. (1999). Bitlis yöresinde yetişen endemik *Thymus fedtschenkoi* Ronniger

- var. handeli (Ronniger) Jalas*, üzerinde morfolojik, anatomik ve korolojik çalışmalar. Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Özer, M.S., Sarıkürkçü, C., Tepe, B. and Can, S. (2010). Essential oil composition and antioxidant activities of alkanet (*Alkanna tinctoria subsp. tinctoria*). *Food Science and Biotechnology*, **19**: 1177-1183.
- Özkan, A. (1997). Organik kimyada seçme konular. Ders notları, Antakya.
- Özkan, G., Sağdıç, O., Göktürk, R.S., Ünal, O. and Albayrak, S. (2010). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extract from *Salvia pisdica*. *LWT - Food Science and Technology*, **43**: 186-190.
- Öztürk, K.N. (1990). *Dorystoechas hastata* uçucu yağının bileşimi. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Polat, Ö. and Ötleş, S. (1997). Esansiyel yağların ekstraksiyon yöntemleri. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, Gıda Mühendisliği, **15**: 155-161.
- Radulovic, N., Lazarevic, J., Ristic, N. and Palic, R. (2007). Chemotaxonomic significance of the volatiles in the *Genus stachys (Lamiaceae)*: Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, **35**: 196-208.
- Sarıkürkçü, C., Arısoy, K., Tepe, B., Çakır, A., Abalı, G. and Mete, E. (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus L. Fruits*. From Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, **47**: 2479-2483.
- Sarıkürkçü, C., Özer, M.S., Eskici, M., Tepe, B., Can, S. and Mete, E. (2010). Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis C. Presl subsp. longicaulis var. Longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 1801-1805.
- Sarker, S.D., Latif, Z. and Gray, A.I. (2006). Natural Products Isolation, Humana Press Inc., New Jersey, **2**: 27-46, 47-76.
- Sartoratta, A., Machado, A.L., Delarmelina, C., Figueria, G.M., Duarte, M.C.T. and Rehder, V.L.G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants from in Brazil, **35**: 275-280.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. and Leblebici, E. (1995). Tohumlu Bitkiler Sistematigi (Ders Kitabı). Ege Üniv. Fen Fak. Ders Kitapları Serisi, İzmir. **4**: 116.
- Şen, H., Helvacı, A., Kumlay, M.A., Şen, A. and Bulduk, İ. (2008). Alternatif bir yağ

bitkisi olarak Doğu Anadolu Haşhaşı (*Papaver bracteatum*)' nın tohum bileşenleri ve yağ ssitleri kompozisyonunun belirlenmesi. 10. Ulusal Gıda Kongresi. 21 Mayıs-23 Mayıs. Erzurum/Türkiye.

- Tanker, M. ve Tanker, N. (1976). Farmakognozi, Reman Maatbası, İstanbul, **2**: 13-35.
- Teixeira, B., Marquesa, A., Ramosa, C., Batista, I., Serranoc, C., Matosd, O., Nenge, N.R., Nogueirae, J.M.F., Saraivab, J.A. and Nunesa, M.L. (2012). *European pennyroyal (Mentha pulegium)* from Portugal. Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, **36**: 81–87.
- Tepe, B., Dönmez, E., Ünlü, M., Candan, F., Dafererad, D., Vardar, U.G., Polissioud, M. and Sökmen, A. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha (Montbret et aucher ex benth.)* and *Salvia multicaulis (Vahl)*. *Food Chemistry*, **84**: 519-525.
- Trease, G.E. and Evans, W.C. (1972). Textbook of Pharmacognosy, The University Press, Aberdeen, 612-614.
- TMO (2005). Toprak Mahsulleri Ofisi 2004 Haşhaş Raporu.
- TMO (2010). Toprak Mahsulleri Ofisi 2009 Haşhaş Raporu.
- TMO (2012). Toprak Mahsulleri Ofisi 2011 Haşhaş Raporu.
- Toroğlu, S. ve Çenet M. (2006). Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **9**: 12-20.
- Tüzün, C. (1992). Biyokimya. Ankara Üniversitesi Palme Yayınları, 2. baskı. Ankara.
- Tyler, V.E., Brady, L.R. and Robbers, J.E. (1988). Pharmacognosy Lea Febiger Philadelphia, PA. USA **9**: 75-76.
- Ulubelen, A., Miski, M. and Marby, T.J. (1981). A new diterpenoids from *Salvia tomentosa*. *Journal Natural Product*, **44**: 119-124.
- Üner, Y., Aksu, H. and Ergün, Ö. (2000). Baharatın çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkileri, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, VETFAK dergisi, 1.
- Vas, G. and Vekey, K. (2004). Solid-Phase Microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**: 233-254.
- Verastegui, M.A., Sanchez, C.A., Heredia, N.L. and Garcia, A.J.S. (1996).

Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan Desert, *J. Ethnopharmacol*, **52**: 175-177.

Williams, S. (1984). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 14th ED., Association of official Analytical Chemists, Inc., Virginia.

Yaylı, N., Yaşar, A., Güleç, C., Usta, A., Kolaylı, S., Coşkun, Ç.K. and Karaoğlu, Ş. (2005). Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry*, **66**: 1741-1745.

Yıldırım, A. ve Duru, A. (2006). SDÜ Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Organik Asitler ve Tuzları, **15**: 99-105.

Zhukovsky, P.M. and Bazilevskaya, N.A. (1976). Haşhaş Kitabı Fasil, **15**: 556-590.

İnternet Kaynakları

- 1- <http://www.afyonkarahisar.gov.tr/afyonkarahisar-markalari.aspx> 25.06.2013
- 2- <http://www.varbak.com/resmi/haşhaş-çizimi> 21.03.2013
- 3- <http://www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=1003> 21.03.2013
- 4- http://galeri.netfotograf.com/fotograf.asp?foto_id=412546 14.04.2013
- 5- <http://botanikciler.blogspot.com/2012/08/hashas.html> 27.03.2013
- 6- <http://www.ildam.com/index.php?option=wrapper&Itemid=69> 24.05.2013
- 7- <http://www.ihsaniyemo.kou.edu.tr> 12.05.2013
- 8- http://biotech.rpi.edu/index.php/proteomics-equipment/139-shimadzu_qp5050-quadrupole-gas-chromatograph-mass-spectrometer 27.05.2013

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Alparslan GÜLTEPE
Doğum Yeri ve Tarihi : Sivas 30.07.1977
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0530 4022115 / alparslan.gultepe@tmo.gov.tr

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Sivas Kongre Lisesi 1991-1994
Önlisans : Sivas Cumhuriyet Üniversitesi M.Y.O. 1996-1999
Lisans : Sivas Cumhuriyet Üniversitesi 2000-2005
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı 2011-2013

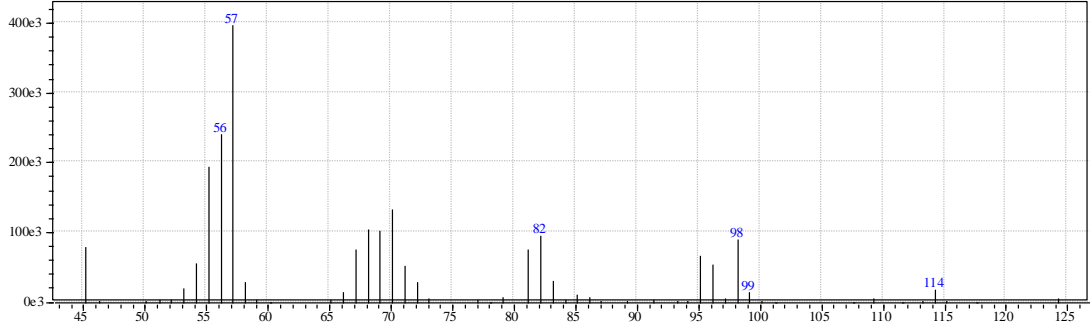
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Sivas Belediyesi 1998-2008
TMO Afyon Alkaloidleri Fabrikası 2008 -

Yayımları (SCI ve diğer) :

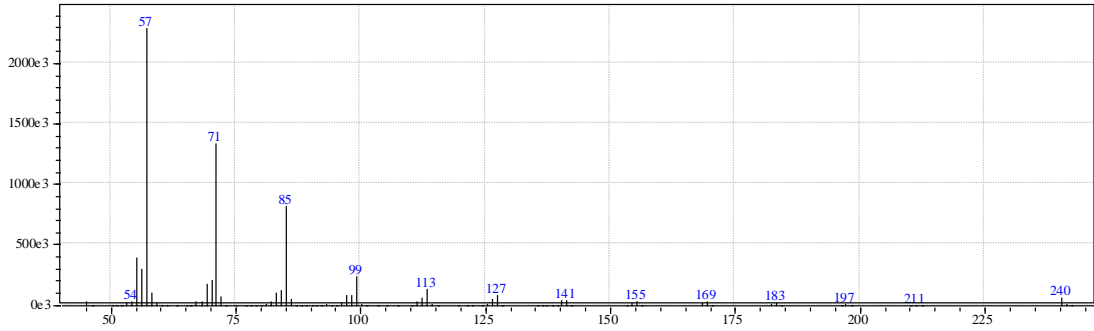
Diğer konular

EKLER

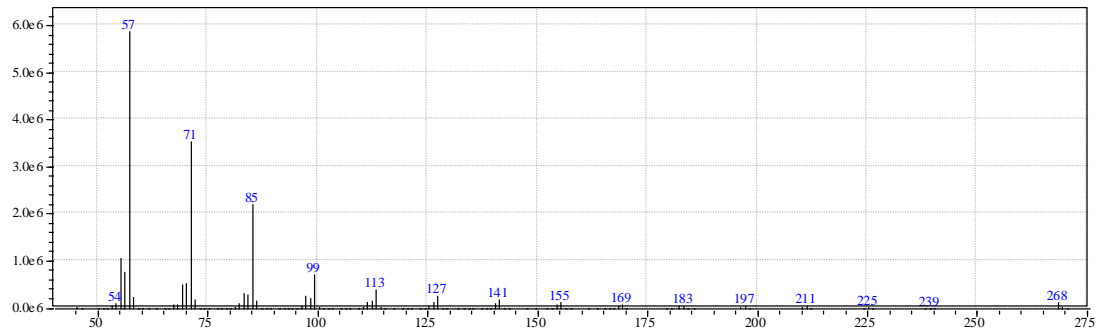
EK-1 Çizelge 4.2' de 1 nolu pike ait MS spektrumu



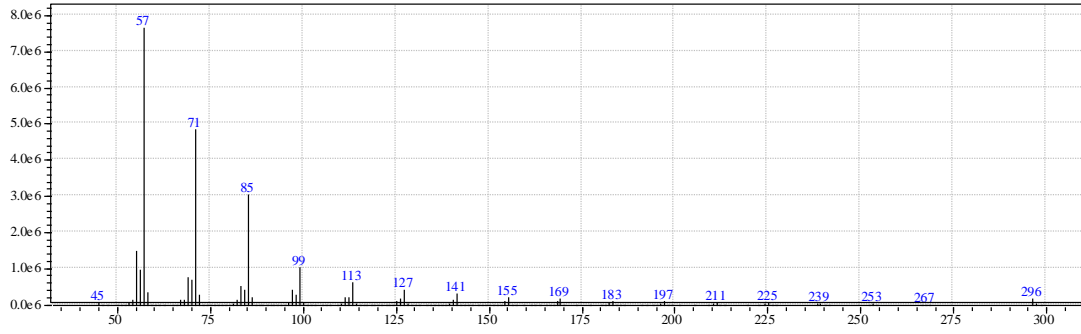
EK-2 Çizelge 4.2' de 2 nolu pike ait MS spektrumu



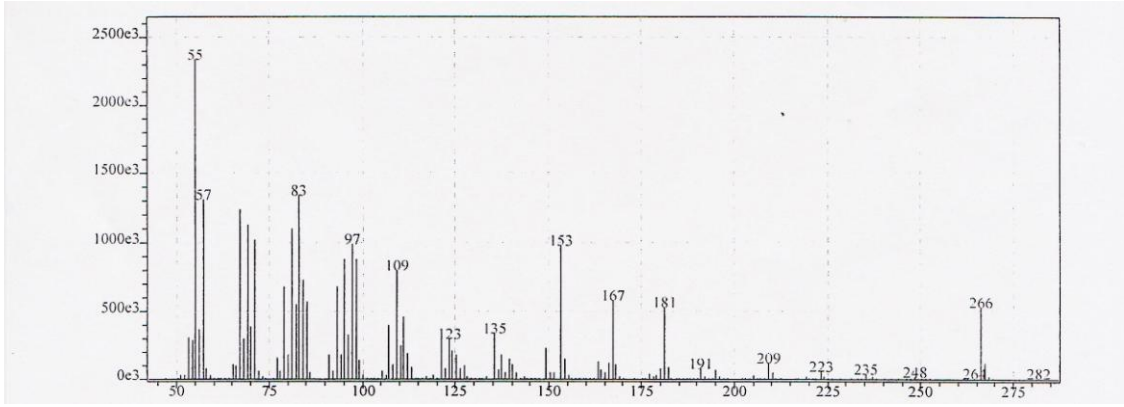
EK-3 Çizelge 4.2' de 3 nolu pike ait MS spektrumu



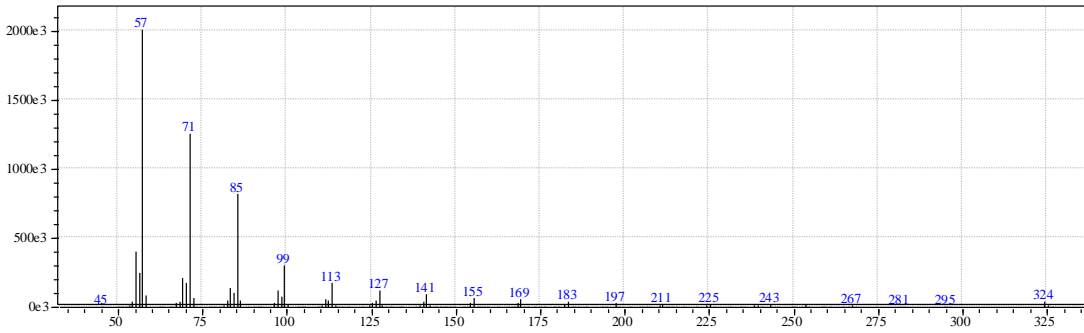
EK-4 Çizelge 4.2' de 4 nolu pike ait MS spektrumu



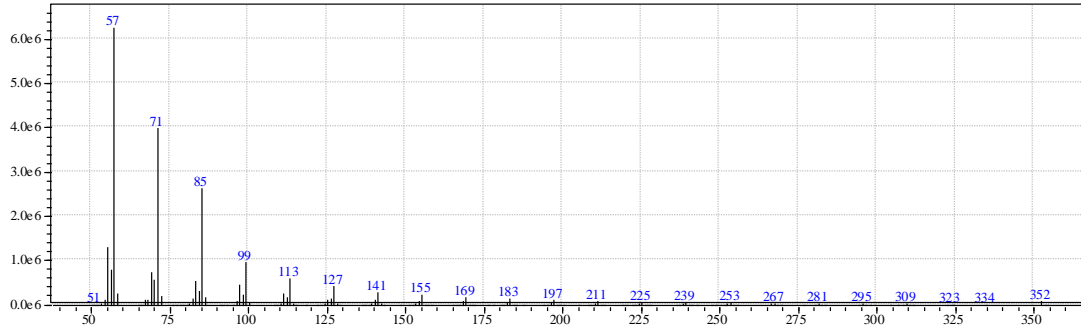
EK-5 Çizelge 4.2' de 5 nolu pike ait MS spektrumu



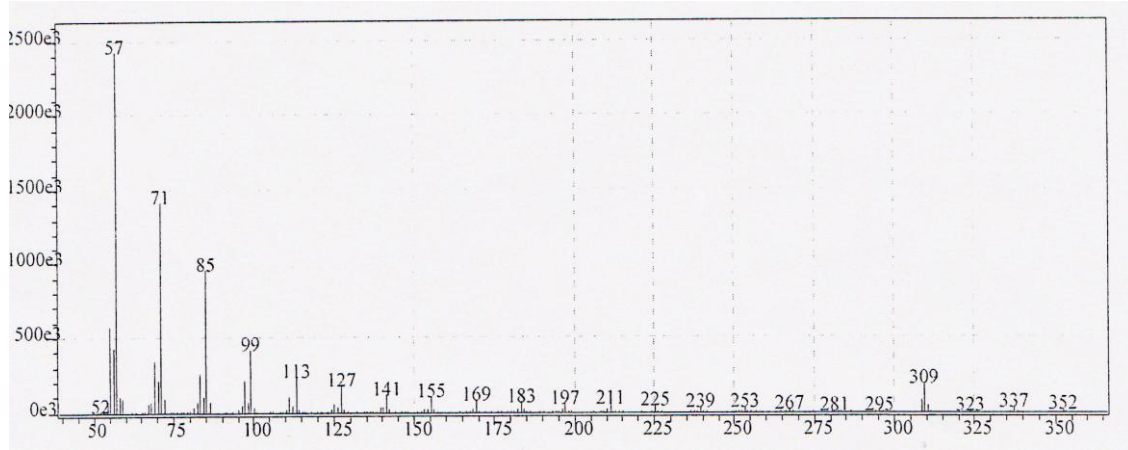
EK-6 Çizelge 4.2' de 6 nolu pike ait MS spektrumu



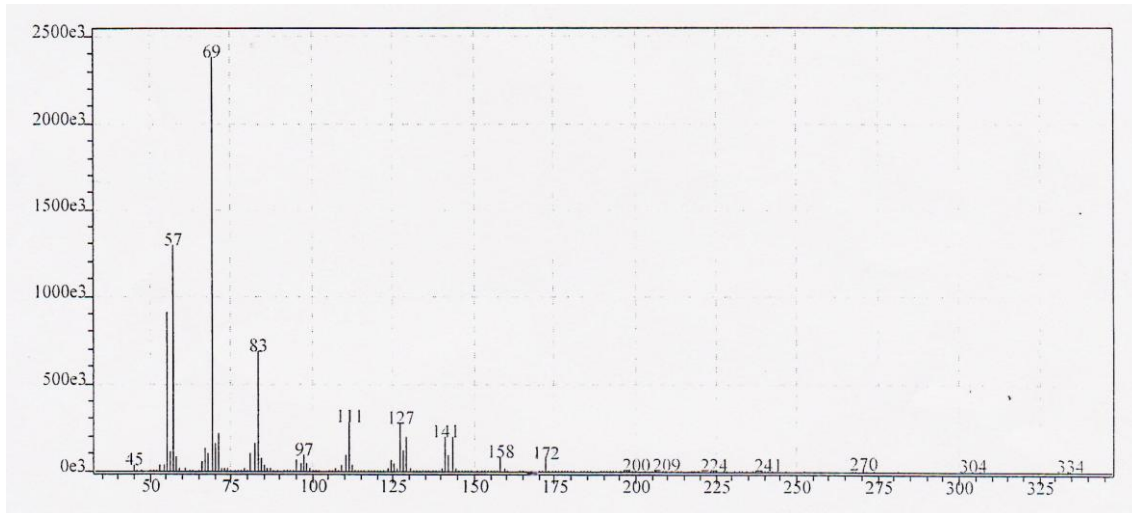
EK-7 Çizelge 4.2' de 7 nolu pike ait MS spektrumu



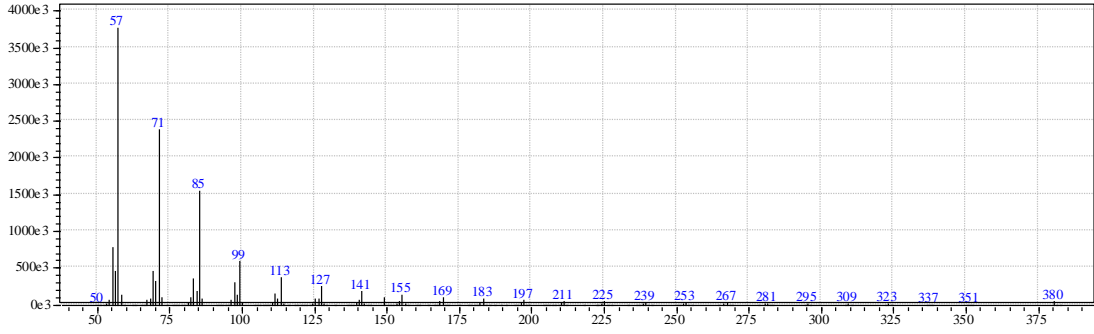
EK-8 Çizelge 4.2' de 8 nolu pike ait MS spektrumu



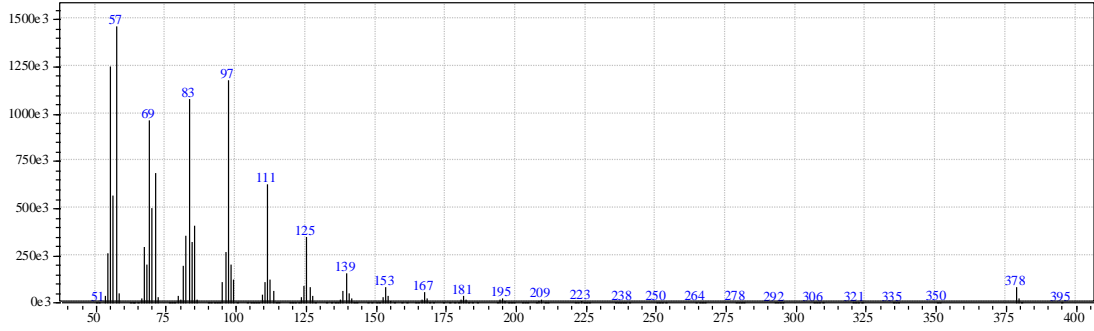
EK-9 Çizelge 4.2' de 9 nolu pike ait MS spektrumu



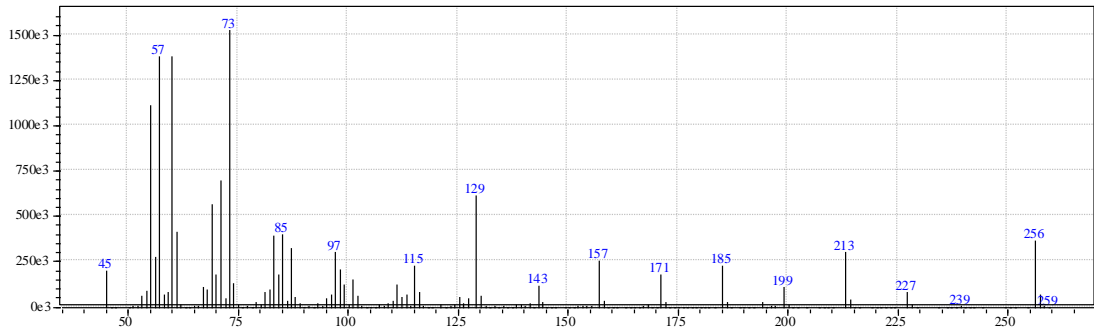
EK-10 Çizelge 4.2' de 10 nolu pike ait MS spektrumu



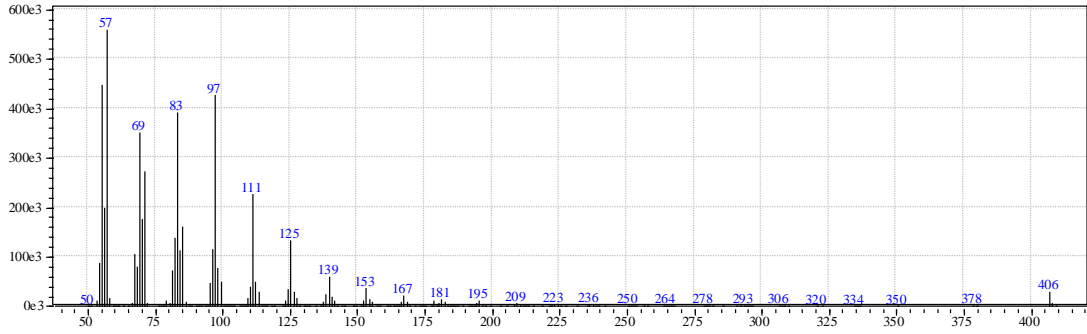
EK-11 Çizelge 4.2' de 11 nolu pike ait MS spektrumu



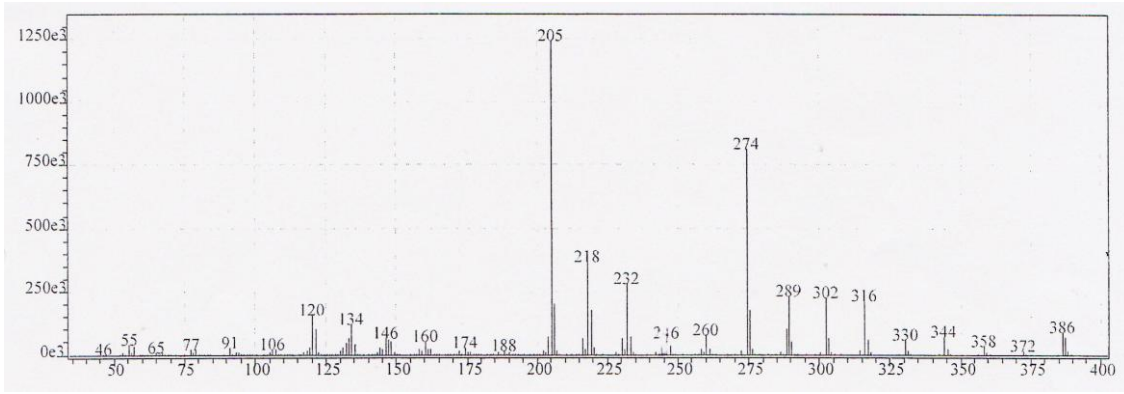
EK-12 Çizelge 4.2' de 12 nolu pike ait MS spektrumu



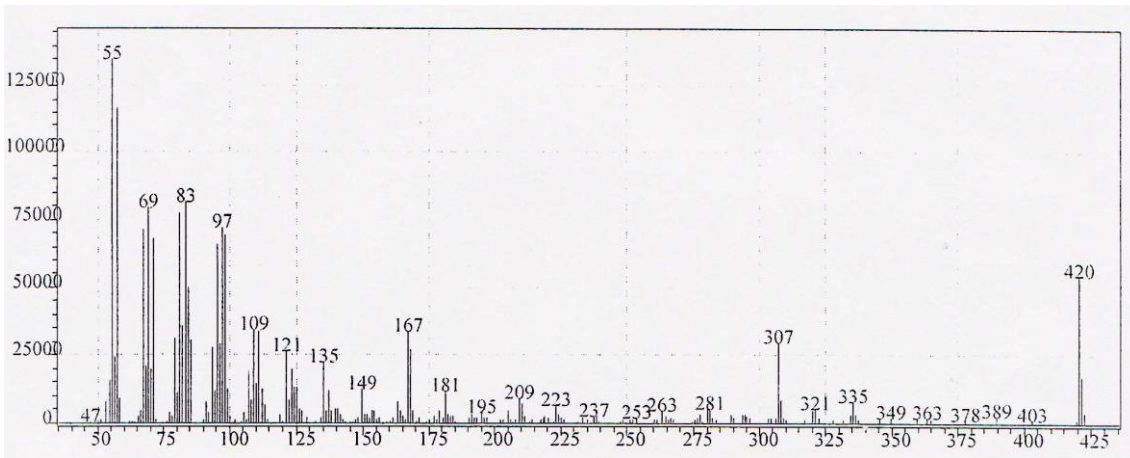
EK-13 Çizelge 4.2' de 13 nolu pike ait MS spektrumu



EK-14 Çizelge 4.2' de 14 nolu pike ait MS spektrumu



EK-15 Çizelge 4.2' de 15 nolu pike ait MS spektrumu



EK-16 Çizelge 4.2' de 16 nolu pike ait MS spektrumu

