

**BAZI TÜRÖ NANE (*MENTHA L.*)
UÇUCU YAĞLARININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ**

Gökhan DUALI

Yüksek Lisans Tezi

**BAZI TÜRK NANE (*MENTHA L.*) UÇUCU
YAĞLARININ BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİ**

Gökhan Dualı

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Mayıs 2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Gökhan Dualı
Doğum tarihi ve yeri : 01.06. 1984, Erzurum
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : M. Akif Ersoy Mah. 33. Sokak Kardeşler
koop 4/7 Palandöken/Erzurum
biostrateji_25@hotmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim : Mimar Sinan İlköğretim Okulu
Lise : Erzurum Atatürk Lisesi (Y.D.A)
Lisans : Uludağ Üni. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Yabancı dil : İngilizce

Yayınlar

- 1- Poster Bildiri : *Pelargonium endlicherianum* FENZL. Kök Ekstrelerinin Antioksidan Özellikleri, 18. Bitkisel İlaç Ham Maddeleri Toplantısı, İstanbul (2008).
- 2- Poster Bildiri : Evaluation of the angiogenic activity of *Salvia triloba* L. Essential oil (8th Annual Oxford International Conference on the Science of Botanicals (ICSB))
- 3- Poster Bildiri : Essential Oil composition of *Anthemis pauciloba* Boiss. var. *microstephana* (Eig.) Grierson and *Anthemis pauciloba* Boiss. var. *pauciloba* Boiss.

Bilimsel Etkinlikler

Burslar : Tübitak Araştırma Projesi Bursu

1- 2008/2009 : Uçucu yağ taşıyan bazı bitkilerin anjiyojenik ve antianjiyojenik aktivitelerinin *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle araştırılması (Proje No: SBAG-3756).

2- 2007/2008 : Türkiye için yeni bir teknik: On-line HPLC-DPPH metoduyla serbest radikal süpürücü etkinin araştırılması (Proje No: 104S603).

Katıldığı Kurslar ve Eğitim Programları

18. Bitkisel ilaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT), 16-18 EKİM 2008-İSTANBUL.

Training Course on Process Technologies, Quality Control and Utilization of Essential Oils. 21-25 July 2008, ESKİŞEHİR – TURKEY.

8th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. (8th SCNC). 15-17 June 2009, ESKİŞEHİR – TURKEY

ÖNSÖZ

Bu tezin gerçekleşmesi için olanak sağlayan, bilgisini ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam, Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden her türlü desteğini esirgemeyerek tecrübe ve bilgisi ile bana her zaman yardımcı olan, değerli hocam Prof. Dr. Neşe Kırimer'e,

Tez konumu belirleyip bana araştırmalarımın her aşamasında yol gösteren, ilk günden itibaren bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Müberra Koşar'a,

Tez ile ilgili araştırmalarımın her aşamasında bana yol gösteren ve gerekli döküasyonların sağlanmasında ve GK analizlerinde bana yardımcı olan hocam Yard. Doç. Dr Mine Kürkçüoğlu'na,

Mentha uçucu yağ analizleri ile ilgili gerekli döküasyonların sağlanmasında yardımcı olan hocalarım Doç. Dr Temel Özek ve Doç. Dr Betül Demici'ye

Laboratuar çalışmaları ve analizler sırasında gerekli olan malzemeleri sağlayan Doç. Dr Fatih Demirci'ye,

Laboratuar çalışmaları ve analizler sırasında yardımlarını gördüğüm Uzm. Bio. Fatih Göger'e, Bio. Gamze Çayirdere'ye , Araş. Gör. Gökalp İşcan'a , Bio. Gökhan Yatağan, Araş. Gör. Hale Gamze Duymuş ve Araş. Gör. H. Tuba Kıyan'a,

Tez bitkileri ile ilgili resimlerin ve gerekli döküasyonların sağlanmasında yardımcı olan Doç. Dr Gül Tarımcılar'a ve Öğr. Gör. İlham Eröz Poyraz'a,

Araştırmamın başlangıcından bitimine kadar her aşamada yardımlarını gördüğüm ve tüm bölüm olanaklarından yararlandığım Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanlığı'na ve üyelerine,

Beni her zaman destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme ve Nermin Aksaray'a,

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri (060321) ve Tübitak'a (TBAG 106T117),

Bu çalışmada emeği geçen adı geçmeyen tüm hocalarım ve arkadaşlarıma, Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BAZI TÜRK NANE (*MENTHA* L.) UÇUCU YAĞLARININ BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

ÖZET

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi ve Karadeniz Bölgesinde doğal olarak yetişen bazı *Mentha* türlerinin (*Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides*, *M. suaveolens* Ehrh, *M. spicata* L. subsp. *spicata*, *M. spicata* L. subsp. *tomentosa*, *M. pulegium* L., *M. x villosa-nervata* Opiz.) uçucu yağlarının kimyasal kompozisyonları, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri ile enzim inhibisyonları incelenmiştir.

Antioksidan aktivite, β -karoten yöntemi, serbest radikal giderim yöntemi (DPPH \bullet), ABTS \bullet^+ radikalini süpürücü etki tayini ve indirgeme gücü gibi 4 farklı test uygulanarak belirlenmiştir. *Mentha* uçucu yağları sadece ABTS \bullet^+ radikal katyonuna karşı aktivite göstermişlerdir.

Antimikrobiyal aktivitesi (antibakteriyel ve antikandidal), gram negatif, gram pozitif mikroorganizmalara ve bazı *Candida* türlerine karşı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Uçucu yağların *Candida* türleri üzerinde bakteri türlerine oranla daha fazla etki gösterdikleri bulunmuştur.

Enzim inhibisyon deneyleri olarak da; Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitör ve Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibitörlerinin etkileri belirlenmiştir. *Mentha* türlerine ait uçucu yağların asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkili bir inhibitör olmadığı ve *M. spicata* L. subsp. *spicata*'nın Galantamine göre daha güçlü BuChE inhibitör etkisi olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, DPPH \bullet , ABTS \bullet^+ , β -karoten/linoleik asit, Antibakteriyel aktivite, Antikandidal aktivite, Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitörü, Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibitörü.

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OILS OF SOME MINT (*MENTHA* L.) SPECIES OF TURKEY

ABSTRACT

Chemical compositions, antimicrobial, antioxidant and enzyme inhibitory activities of the essential oils of the following mint species growing in Marmara and Black Sea regions of Turkey have been investigated: *Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides*, *M. suaveolens* Ehrh, *M. spicata* L. subsp. *spicata*, *M. spicata* L. subsp. *tomentosa*, *M. pulegium* L., *M. x villosa-nervata* Opiz.

Antioxidant activity was tested using four different test systems namely β - carotene, DPPH \bullet , ABTS \bullet^+ and reduction power. Mint oils showed activity only against the ABTS \bullet^+ radical cation.

Antimicrobial activity (antibacterial and anticandidal) was tested against some gram-negative and gram-positive bacteria and some *Candida* species using microdilution method. Mint oils showed better activity against *Candida* species as compared to bacteria.

Enzyme inhibitory activities against acetylcholine esterase (AChE) and butyrylcholine esterase (BuChE) were determined. No activity was observed against AChE, however, the oil of *M. spicata* L. subsp. *spicata* showed stronger activity than the control Galanthamine against BuChE.

Keywords: Antioxidant activity, DPPH \bullet , ABTS \bullet^+ , β -carotene/linoleic acid, anticandidal activity, acetylcholine esterase (AChE) inhibitory activity, butyrylcholine esterase (BuChE) activity

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Lamiaceae (Labiatae) Familyasının Genel Özellikleri	3
<i>Mentha</i> L.	4
<i>Mentha</i> L. Sistematikteki Yeri	4
<i>Mentha</i> L. Genel Özellikleri	4
<i>Mentha</i> L. Morfolojik Yapısı	5
<i>Mentha</i> L. Cinsine Dahil Olan Önemli Türlerin Bazı Özellikleri	5
<i>Mentha pulegium</i> (L.)	5
<i>Mentha arvensis</i> (L.)	5
<i>Mentha aquatica</i> (L.)	5
<i>Mentha suaveolens</i> Erhr.	5
<i>Mentha longifolia</i> (L.)	5
<i>Mentha spicata</i> (L.)	6
Türler Arası Melezler	6
<i>Mentha x villosa-nervata</i> Opiz.	6
<i>Mentha x dumetorum</i> Schuldes.	6
<i>Mentha x piperita</i>	6
Uçucu yağların tanımı ve özellikleri	9
Uçucu yağların bileşimi	10
Uçucu yağların üretimi	11
Distilasyon	12
Su Distilasyonu	12
Buhar Distilasyonu	12
Su- Buhar Distilasyonu	12

<i>Mentha</i> L. Türleri Üzerinde Yapılmış Kimyasal Çalışmalar	13
<i>Mentha</i> L. Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları	15
GEREÇLER ve YÖNTEMLER	17
Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler	17
Bitkisel materyal	17
Kimyasal maddeler	17
Kullanılan aletler	17
Deneysel Çalışma	18
Distilasyon işlemleri	18
Su distilasyonu	18
Analitik çalışmalar	18
Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemi (GK/KS)	18
Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) ve gaz kromatografisi (GK/FID) ile apolar bileşiklerin analizi	19
GK Analiz Kosulları	19
GK/KS Analiz Koşulları	19
Antioksidan Aktivite Çalışmaları	19
1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki tayini	19
β-Karoten/Linoleik Asit Oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini	20
2,2'-azinobis-3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit (ABTS^{•+}) radikalini süpürücü etki tayini	20
İndirgeme gücünün belirlenmesi	21
Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi	21
Mikroorganizmaların Canlandırılması	21
Mikrobroth Dilüsyon Tekniği ile Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi	22
Enzim İnhibisyon Deneyleri	23
Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibisyonu	23
Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitör Etkinin Belirlenmesi	24
Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibitör Etkinin Belirlenmesi	24
BULGULAR ve TARTIŞMA	26
Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonları	26
Uçucu Yağların Antioksidan Aktivite Sonuçları	34
Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	35
Uçucu Yağların Enzim İnhibisyon Sonuçları	38
SONUÇLAR ve ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO VE ADI	SAYFA
Şekil 1 <i>Mentha</i> spp. Türlerinin yapraklarının alt yüzeyindeki stomalar ve yağ hazneleri	4
Şekil 2 <i>Mentha longifolia</i> L. Hudson subsp. <i>typhoides</i>	7
Şekil 3 <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	7
Şekil 4 <i>Mentha spicata</i> L. subsp. <i>spicata</i>	7
Şekil 5 <i>Mentha spicata</i> L. subsp. <i>tomentosa</i>	8
Şekil 6 <i>Mentha pulegium</i> L.	8
Şekil 7 <i>Mentha x villosa-nervata</i> Opiz.	8
Şekil 8 İzopren molekülü	11
Şekil 9 Clevenger Apareyi	18
Şekil 10 DPPH• radikalinin kimyasal yapısı	20
Şekil 11 ABTS•+ radikalinin kimyasal yapısı	21
Şekil 12 Mikrodilüsyon Tekniğinde Kullanılan 96 (well) Kuyucuklu Mikrotitrasyon Petrisi	24
Şekil 13a <i>Mentha</i> L. Uçucu Yağlarında Rastlanan Major Bileşenler	32
Şekil 13b <i>Mentha</i> L. Uçucu Yağlarında Rastlanan Major Bileşenler	33
Şekil 14 2,2'-azinobis-3-etilbenzothiazolin-6-sülfonik asit (ABTS•+) sonuçları	34
Şekil 15 Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile MVN ₂ Kodlu Yağın Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü	35
Şekil 16 Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile MVN ₁ Kodlu Yağın Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü	36
Şekil 17 Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile MLTT ₁ Kodlu Yağın Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 <i>Mentha</i> L. cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması	4
Çizelge 2 <i>Mentha</i> L. taksonlarından elde edilen uçucu yağların karşılaştırmalı antioksidan kapasiteleri	16
Çizelge 3 Tez çalışmalarında kullanılan <i>Mentha</i> L. türlerine ait veriler	17
Çizelge 4 Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Mikroorganizmalar	22
Çizelge 5 <i>M. x villosa-nervata</i> 'nın Uçucu Yağ Bileşimi	26
Çizelge 6 <i>M. longifolia</i> subsp. <i>typhoides</i> var. <i>typhoides</i> 'in Uçucu Yağ Bileşimi	27
Çizelge 7 <i>M. pulegium</i> 'un Uçucu Yağ Bileşimi	28
Çizelge 8 <i>M. spicata</i> subsp. <i>tomentosa</i> 'nın Uçucu Yağ Bileşimi	29
Çizelge 9 <i>M. spicata</i> subsp. <i>spicata</i> 'nın Uçucu Yağ Bileşimi	30
Çizelge 10 <i>M. suaveolens</i> 'in Uçucu Yağ Bileşimi	31
Çizelge 11 Uçucu Yağların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyonları (MİK- $\mu\text{g}/\text{mL}$)	37
Çizelge 12 Enzim İnhibisyon Sonuçları IC_{50} ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	38
Çizelge 13 Standart Maddelerin Enzim İnhibisyon Sonuçları IC_{50} ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	38

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre (10^{-6} litre)
ABTS ^{•+}	: 2,2'-azonobis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonat)
AscAE	: Askorbik asite eşdeğer
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH [•]	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
FeCl ₃	: Demir 3 klorür
GK/KS	: Gaz kromatografisi/ Kütle spektrometresi
IC ₅₀	: Inhibition concentration %50 , Maddenin %50'sini inhibe edebilen minimum konsantrasyon
MHA	: Müller Hinton agar
MHB	: Müller Hinton Broth
MİK	: Minimum inhibe edici konsantrasyon
MLC	: Minimum öldürücü konsantrasyon
ml	: Mililitre (10^{-3} litre)
nm	: Nanometre
SGA	: Sabouraud Glukoz Agar
TCA	: Trikloroasetik asit
Tris-HCl	: Trisma base ve hidroklorik asit ile hazırlanmış tampon çözelti
TTC	: Trifenil tetrazolyum klorür
Tween® 20	: Polioksietilen-20-sorbitan monoelat

GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkilerin hastalık tedavi edici özellikleri binlerce yıl öncesinde insanların ilgisini çekmiştir. Eski Mısır, Mezopotamya ve Çin gibi pek çok uygarlık, hastalıklara karşı bitkilerden hazırladıkları ilaçları kullanmışlardır. 1800'lü yıllarda bitkilerden etkili bileşiğin elde edilmesi, ardından özellikle 20.yy'ın son çeyreğinde analiz yöntemlerinin gelişmesiyle içeriklerinin saptanması ve etkilerinin araştırılması büyük hız kazanmıştır (Tanker ve Tanker, 1998).

Son yıllarda bitkisel kökenli bileşiklere olan ilgi, bu bitkilerin tarımı ve ıslahı üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır. Dünya piyasasında söz sahibi olmak, standartlara uygun yüksek kaliteli ürünlerin geliştirilmesi ile mümkündür. Dünyada ve Türkiye'de bu bitkiler üzerindeki çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır. Son 20 yıldan bu yana, ülkemizde tıbbi ve aromatik bitkilerin karakterizasyonu, kültürü ve verimli türlerin geliştirilmesi ile ilgili önemli çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucu doğal yetişen pek çok bitki türü kültüre alınmış, birçok türün karakterizasyonu sonucu verimli hatlar elde edilmiş ve yetiştirme teknikleri belirlenmiştir. (Ceylan ve ark., 1991; Telci, 2001; Özel ve Özgüven, 1999).

Doğal ilaçların laboratuarda sentezi pahalı bir işlem olduğu için hala bu ürünler bitkisel droglardan elde edilmektedir. Sentetik olarak elde edilen ilaçların istenmeyen yan etkilerinin olması, insanları tekrar doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya yönlendirmiştir. Bitkisel drogların tedavide kullanılmasının başka bir üstünlüğü birkaç etkiye birden sahip olmalarıdır. Oysa sentetik ilaçlar normalde sadece tek etkiye sahiptirler. Bu amaçla yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak üzere bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır (Baytop, 1984).

Anavatanı Orta Avrupa ve Asya olarak bilinen *Mentha*, Labiatae familyasının bir üyesidir. Tarih boyunca yaygın şekilde antiseptik, spazmolitik, korrijen ve karminatif olarak kullanım bulmuş bir takson olan *Mentha*'nın bir türü 1696'da Ray tarafından tedavi amaçlı kullanılabilmesi belirtilerek *Mentha palustris* olarak adlandırılmıştır. Daha sonra 1753'de Linne aynı türü *Mentha piperita* L. şeklinde tanımlamıştır. Özellikleri 1705'de Dale ve 1721'de London Pharmacopoeia'de tanımlanmıştır. Avrupa ve Asya'da yayılış gösteren *Mentha piperita* 20. yy başlarında Alman göçmenler tarafından Amerika kıtasına taşınmış ve burada geniş yayılış alanları bulmuştur (Öztürk ve ark., 2004).

Anadolu'da 7 kadar *Mentha* türü olduğu bilinmekle beraber, çok polimorfik bir yapıya sahip olmasından ve melezleşmeye yatkın olmasından dolayı kimyasal çeşitliliği oldukça fazla olan bir taksondur. Kromozom sayıları epey farklılık gösteren *Mentha*'nın vegetatif üreme yeteneğinin de katkısıyla dünyada 30 kadar subgenusunun bulunduğu bilinmektedir. Subgenuslar arası melezleşme nadir dahi olsa aynı subgenus içinde çok sayıda melezlerin olduğu belirlenmiştir. Ekolojik koşullardan da oldukça etkilendiği bilinen *Mentha* taksonlarının ıslah edilmiş tohumları ile ilgili sitotaksonomik ve kemotaksonomik çalışmalar mevcuttur. *Mentha* cinsinin sistematigi form zenginliğinden dolayı tamamlanamamıştır. Doğal taksonları içermeyen, kültür formları üzerinden, menton içerenler ve karvon içerenler olarak genel tasnifler yapılmıştır. Melezleşme yatkınlığına bir örnek olarak farmakopelerde kayıtlı *Mentha x piperita* L. verilebilir. Bu tür *M.*

longifolia ve *M. rotundifolia*'nın melezi olan *M. spicata* ile *M. aquatica*'nın melezidir (Öztürk ve ark., 2004).

Nane, *Mentha* türlerine verilen genel bir isim olup, çok yıllık sürünücü gövdelere sahip otsu bitkilerdir (Baytop, 1992). *Mentha*, uçucu yağ üretiminde çok önemli bir kaynaktır. *Mentha* cinsinin bazı türleri eşsiz aroması nedeniyle bitki çayı olarak da kullanılmaktadır (Başer ve ark., 1999). Pek çok nane türleri ilaç, çay, gıda ve parfümeri sanayiinde kullanılmaktadır. *M. arvensis* ve *M. piperita* uçucu yağlarındaki mentol oranının yüksek olmasından dolayı Çin, ABD ve Hindistan gibi bazı ülkelerde tarımı yapılmaktadır. Spearmint olarak bilinen, karvonca zengin olan *M. spicata* ve *M. gracilis* türleri baharat kullanımının yanı sıra, uçucu yağları gıda, sakız ve temizlik ürünlerinde de kullanılmaktadır. Dünyada toplam uçucu yağ üretiminde *Mentha* türlerinden elde edilen uçucu yağ miktarları, *Citrus* yağlarından sonra ikinci sırayı almaktadır (Başer, 1997). Değişik nane türleri; antimikrobiyal, antispazmodik, koleretik, karminatif gibi insanlarda çeşitli fizyolojik etkilere sahip olmaları nedeniyle eski çağlardan beri gerek halk ilacı olarak, gerekse ilaç, gıda, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Nane türlerinin çeşitli etken maddeleri arasında, bu türlerin endüstriyel kullanımına neden olan etken madde grubu uçucu yağlarıdır (Ellialtıoğlu ve ark., 2007).

Ülkemizde 1997 yılı verilerine göre toplam 4600 ton baharat amaçlı nane üretimi yapılmıştır. Türkiye, son yıllara kadar nane elde edilen uçucu yağ ihtiyacını ithalatla karşılamaktadır. Oysa Türkiye geniş tarım arazisine, uygun iklim şartlarına ve temelde tarıma dayalı endüstrilere sahiptir. Türkiye'de bu potansiyelin iyi değerlendirilmesi durumunda ithalatı yapılan birçok ürünün ülkemizde üretilmesine, döviz kaybının önlenmesine ve hatta ihracatla döviz kazanmasına neden olacaktır (Telci, 2001).

KAYNAK BİLGİSİ

Lamiaceae (Labiatae) Familyasının Genel Özellikleri

Dünyada tıbbi ve kokulu bitkiler, eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Ülkemiz doğal florasında bulunan 9000 bitki türü içerisinde 500 tanesi tıbbi amaçlarla kullanılmakta olup, bunların büyük çoğunluğu doğal olarak yetişmekte, çok az bir bölümünün kültürü yapılmaktadır. İnsanlık tarihi kadar eski dönemlerden bu yana kullanılan nane; biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), adaçayı (*Salvia officinalis* L.), lavanta (*Lavandula angustifolia* Mill.), kekik (*Thymus vulgaris* L.), mercanköşk/ kekik (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum* Ietswaart), oğulotu (*Melissa officinalis* L.) gibi bazı bilinen diğer kokulu ve aromalı bitkiler ile aynı familya içerisinde yer almaktadır. Bu familya, Lamiaceae (Labiatae) familyasıdır (Elliältioğlu ve ark., 2007).

Lamiaceae (Ballıbabagiller), Angiospermler arasında yer alan bir familyadır. Dünyada 224 cins 5600 tür ile temsil edilen, Türkiye’de ise 45 cins 565 kadar türü bulunan bir familyadır (Cantino ve ark., 1992).

Lamiaceae familyası üyeleri, Güneybatı Asya, Güney ve Kuzey Amerika, Pasik Adaları, Avustralya, Kuzey ve Güney Afrika, Çin ve Hindistan’a kadar çok farklı yüksekliklerde ve değişik habitatlarda yetişebilirler. Çoğunlukla yüksek endemizm oranına sahiptir (Hedge, 1986).

Familyanın polen morfolojisinin ayrıntılı incelenmesi sonucu, iki temel polen tipi bulundurduğu tespit edilmiştir. Polen morfolojilerine göre Lamioideae ve Nepetoideae olmak üzere iki alt familyaya ayrılmış ve bu alt familyalar polen, tohum, embriyo ve uçucu yağları ile karakterize edilmiştir (Abu-Asab ve ark., 1992).

Lamiaceae familyası Kuzey Yarımküre’de ve özellikle Akdeniz Bölgesinde yayılış gösteren bir veya çok yıllık otsu bitkiler veya çalılardır. Baş 8 hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri bu familya için karakteristiktir. Lamiaceae familyasına ait bitkilerde gövde 4 köşelidir. Yapraklar basit veya parçalı, dekusat dizilişlidir. Çiçekler braktelerin koltuğunda, sık kümeler halinde, her nodusta vertisillastrum durumundadır. Çiçekler erdişi, zigomorftur. Brakteler yapraklardan farklı veya bunlara benzemektedir. Kaliks 5 lobludur, çan şeklinde veya tüpsüdür. Korolla tabanda tüpsü, üstte 2 dudaklıdır. Üst dudak 2, alt dudak 3 petalin birleşmesiyle oluşmuştur. Stamen 4 tanedir, bazen ikisi körelmiş, diğer iki tanesi verimli kalmıştır. Bu 4 stamenden 2’sinin flamenti uzun, diğer 2 tanesinin ise kısadır. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli, 4 gözlüdür, her göz bir ovüllüdür. Stilüs ginobazik, stigma 2 parçalıdır. Meyva 4 kuru nuksa ayrılmış bir şizokarptır (Davis, 1982).

Mentha L.

Mentha L. Cinsinin Sistematikteki Yeri

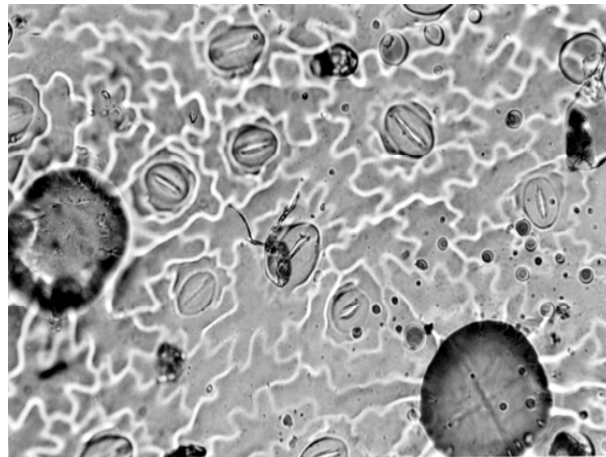
Çizelge 1. *Mentha L.* Cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması

Bölüm	Spermatophyta
Alt Bölüm	Angiospermae
Sınıf	Dicotyledonae
Alt Sınıf	Metachlamydeae
Takım	Tubiflorae
Familya	Labiatae
Alt Familya	Nepetoideae
Cins	<i>Mentha L.</i>

Mentha L. Cinsinin Genel Özellikleri

Nane, *Mentha* türlerine verilen genel bir isim olup, çok yıllık sürünücü gövdelere sahip otsu bitkilerdir (Baytop, 1992). Çoğunlukla nemli ve sulak yerlerde yayılış gösterirler. *Mentha* türleri kendi aralarında kolayca melezlendiği için taksonomik açıdan oldukça karmaşıktır (Kokkini, 1992; Kokkini ve ark., 1995).

Mentha cinsinin tüm türleri ve doğal melezleri uçucu yağ taşımaktadır. *Mentha*, Antartika Kıtası hariç bütün kıtalarda yayılış gösterir. Bu cins aromatik özelliklerinden dolayı 2000 yıldır kullanılmaktadır (Lawrance, 2007).



Şekil 1. *Mentha* spp. türlerinin yapraklarının alt yüzündeki stomalar ve yağ hücreleri

Mentha L. Cinsinin Morfolojik Yapısı

Çok yıllık nemli yerlerde yetişen, sürünücü rizomlu, dik ya da yatık gelişen bitkilerdir. Yapraklar basit, çiçekler hermafrodit (erdişi) veya dişi çiçekler aynı (monoik) veya ayrı (dioik) bitkilerde bulunur. Brakteler yaprak benzeri veya oldukça küçülmüş, kaliks aktinomorf (yıldızsı) veya hafif bilabiata (iki dudaklı), tüpsü veya çan şeklindedir. Korolla bilabiata, 4 loblu, üst lob geniş genelde daha belirgin. Stamenler 4 adet eşit boyda, genelde korolladan dışarı çıkar. Nükleuslar genelde düzdür (Davis, 1982).

Mentha L. Cinsine Dahil Olan Bazı Türlerin Özellikleri

Mentha pulegium L.

Keskin kokulu, çok yıllık otsu, 10-40 cm boyunda yarı yatık veya dik habituslu bitkilerdir. Yapraklar dar, eliptik, yarı dairemsi, ovata, brakteler yaprak benzeri, kaliks tüplü, 2 dudaklı, korolla subaktinomorfik, kaliks boğazı tüylü, stamenler divergenstir. Bitkide %1-2 oranında uçucu yağ bulunur. Uçucu yağında ana bileşen pulegon %80-95'e kadar çıkabilir. Bu bileşen, eczacılıkta önem taşıdığı için bu türün bazı ülkelerde kültürü yapılmaktadır (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Lawrence, 2007; Telci, 2001).

Mentha arvensis L.

Tüylü, çok veya tek yıllık, 60 cm kadar boylan dik gelişen bitkilerdir. Yapraklar eliptik mızrak şeklinde, geniş oval yapıdadır. Brakteler yaprak benzeridir. *M. arvensis L. subsp. haplocalix* Briquet. var. *piperascens* Holmes ıslah edilmiş bir varyete olup, yüksek mentol oranından dolayı, dünyada en fazla kültürü yapılan *Mentha* türüdür (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Telci, 2001).

***Mentha aquatica L.* (Su Nanesi, Dere Nanesi ve Su Yarpuzu)**

Çok yıllık, genelde mor renkli, 100 cm'ye kadar boylan bitkilerdir. Yapraklar saplı ve ovattan lanseolata kadar değişen yapıdadır. Çiçekler kömeç şeklinde, 2-3 vertisillattan oluşur ve 20 mm çapındadır. Uçucu yağ %0.3-0.8 arasında değişir. Mentafuran ve linalol'ce zengindir. Ancak farklı kimyasal bileşen içeren kemotipleri de bulunur (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Telci, 2001).

Mentha suaveolens L.

Tüylü, çok yıllık, otsu, rizomlar genelde toprak altında, 40-100 cm boyunda, dik gelişen habituslu bitkilerdir. Yapraklar sapsız, oblong ovata, kenarlar dişli. Vertisillatlar çok sayıda, sık ve uçta spika şeklindedir. Uçucu yağ oranı %0.7 olup, kimyasal yapısı bakımından çeşitlilik gösterir, karvonca zengin kemotipleri bulunur (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Telci, 2001).

***Mentha longifolia L.* (Yabancı Nane, Uzun Yapraklı Nane)**

Bu tür çok geniş bir coğrafyaya yayılmış olup bu yüzden çok büyük değişiklikler gösterir. Çok yıllık, keskin kokulu, rizomlar genelde toprak altında, 40-120 cm boylan bitkilerdir. Yapraklar sapsız olarak ana gövdeye bağlanır ve yaprak ayası uçta geniş, yüzeyi düz ve kırışıktır. Vertisillatlar çok sayıda ve yoğun bir şekilde bulunur. Uçucu yağ oranları %0.3-1.8 olup, karvonca zengin kemotipleri baharat olarak kullanılmaktadır. Birçok alttür ve varyetesi bulunmaktadır. Bu tez

çalışmasında da *Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* türü kullanılmıştır (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Lawrence, 2007; Telci, 2001).

***Mentha spicata* L. (Bahçe Nanesi, Antep Nanesi)**

Çok değişkenlik gösteren, keskin kokulu, kültür formları tüysüz, 30-110 cm boyunda, dik ve yarı yatık habituslu bitkilerdir. Yapraklar çoğunlukla tabanda daha geniş olup, ovat veya lanseolat, yaprak kenarları dişli, yüzeyi düz veya hafif dalgalıdır. Vertisillatlar spika şeklindedir. Karvonca zengin kemotipleri ekonomik öneme sahip olup, çok yönlü kullanıma sahiptir. Uçucu yağ oranları %0.12-2.1, karvon oranları %49-74 arasında değişmektedir. Bu tez çalışmasında da *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* ve *Mentha spicata* L. subsp. *tomentosa* bitkileri kullanılmıştır (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Lawrence, 2007; Telci, 2001).

Türler Arası Melezler

***Mentha x villosa-nervata* Opiz.**

Mentha longifolia L. Hudson ile *Mentha spicata* L. bitkilerinin melezlenmesi sonucu oluşur. Bitki çok yıllık, 20-70 cm boyunda, gövde küf veya keskin kokulu bir bitkidir. Rizomlar toprağın derinliklerinde yer alır. Yapraklar sapsız, kenarlar dişlidir. Geniş varyasyonlar gösterir. Spika, daha dardır. Uçucu yağ oranları %0.4-0.6 arasında değişir. Karvonca zengin türleri baharat olarak kullanılır (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Telci, 2001).

***Mentha x dumetorum* Schuldes.**

Mentha longifolia L. ile *Mentha aquatica* L.'nin türler arası melezidir. Çok yıllık, 30-80 cm boyunda, rizomlar yüzeye yakın bir bitkidir. *M. aquatica*'ya benzer yapraklar oldukça ovat lanseolattır. Yaprak ucu daha küttür. Uçucu yağ oranları %0.2-1.5 arasında değişir. Uçucu yağ bileşenleri oldukça değişkendir (Davis, 1982; Başer ve ark., 1999; Telci, 2001).

***Mentha x piperita* L.**

Mentha aquatica L. ile *M. spicata* L.'nin türler arası melezidir. Çok yıllık, dik ve yatık habituslu, 40-70 cm boyunda bir bitkidir. *M. dumetorum*'a benzer. Uçucu yağ oranları ve uçucu yağdaki değerli ana bileşenlerden (menton ve mentol) dolayı kültürü yapılmaktadır. Yurt dışında pek çok ıslah edilmiş çeşidi bulunmaktadır. (Başer ve ark., 1999; Davis, 1982; Telci, 2001).



Şekil 2. *Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides*



Şekil 3. *Mentha suaveolens* L.



Şekil 4. *Mentha spicata* L. subsp. *spicata*



Şekil 5. *Mentha spicata* L. subsp. *tomentosa*



Şekil 6. *Mentha pulegium* L.



Şekil 7. *Mentha x villosa-nervata* Opiz.

Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri

Uçucu yağ, bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi canlılarca üretilen uçucu maddelerdir. Genellikle kokulu olan bu maddeler yağ görünümünde olduklarından “esans”, “uçucu yağ” veya “eterik yağ” olarak adlandırılırlar. İngilizce dilinde “Essential oil” adıyla bilinen bu grup maddeler Türkçe’de bazen hatalı olarak “esansiyel yağlar” adıyla anılmaktadır ki bu sabit yağların bir grubunu temsil eden “esansiyel yağ asitleri” ile çağrışım yaptığından doğru değildir (Başer, 2009).

Uçucu yağlar bazen bitkinin tamamında bazen de sadece belirli kısımlarında bulunur. Yaprak, çiçek, meyve, tohum, kök ve rizomlar bitkinin uçucu yağ taşıyan kısımlarındandır. Uçucu yağ bitkinin her kısmında bulunabilir (Yakar ve Bilge, 1987; Sakar ve Tanker, 1991). Örn: çiçek (Lavanta çiçeği- *Lavandulae flos*, Gül-Rosae flos), yaprak (Tıbbi Nane yaprağı - *Menthae piperitae folia*), meyve (Anason meyvası- *Anisi fructus*), toprak üstü kısımları (Kekik-*Thymi herba*), kabuk (Tarçın kabuğu- *Cinnamomi Cortex*), rizom (Zencefil- *Zingiberis rhizoma*), kök (Kediotu kökü- *Valerianae radix*), odun (Guayak odunu- *Guaiacum lignum*). Uçucu yağların drogdaki miktarları çok değişiktir. Tipik uçucu yağ içeren droglar en az % 0.01, genellikle % 1–2, bazı durumlarda ise % 10’u aşan oranlarda uçucu yağ taşırlar. Bugüne kadar araştırılan yaklaşık 300 familyadan % 30’unda uçucu yağa rastlanmıştır. Uçucu yağlara genellikle tohumlu bitkilerde rastlanmaktadır. Önemli uçucu yağ taşıyan familyalar *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Coniferae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae*’ dir (Sakar ve Tanker, 1991; Zeybek, 1985; Ceylan, 1987).

Uçucu yağ içeren bitkiler genellikle tropik ve subtropik iklimlerde bulunur. Soğuk iklimlerde daha az sayıda aromatik bitki türüne rastlanır (Baytop, 1986; Ceylan, 1987). Uçucu yağ taşıyan bitkiler daha çok sıcak iklim kuşaklarında yetişmektedir. Türkiye’yi de içine alan Akdeniz Bölgesi uçucu yağ taşıyan bitkiler açısından en zengin bölgelerden biridir (Tanker ve Tanker, 1985).

Uçucu yağlar bitkilerde en çok epidermanın salgı tüylerinde, iç dokulardaki uçucu yağ hücrelerinde, şizogen, lizigen, veya şizolizik yolla meydana gelen büyük salgı ceplerinde, salgı kanallarında ve nadiren parankima dokusu içinde yayılmış olarak bulunur (Sakar ve Tanker, 1991). Uçucu yağın bitkide doğrudan doğruya protoplazmada olduğu ya da hücre çeperinin reçinemsî tabakasının dekompozisyonu ile olduğu ileri sürülmektedir. Bazen de glikozitlerin hidrolizi ile oluşurlar (Tanker ve Tanker, 1985; Baytop, 1986). Bitkide herhangi bir biyolojik olaya katılmayan bu salgı maddelerinin hangi amaçla olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak, bitkinin artık metabolizma ürünlerinin atılmasında rol oynadıkları yani detoksifikasyon ürünü oldukları ileri sürülmektedir. Bitki için gerekli oksijeni sağlarlar. Uçucu yağların yaydıkları koku ile böcekleri cezbederek tozlaşmaya yardımcı olduğu, böcekleri kaçırıcı etkide olanların ise bitkinin korunmasında etkili olduğu düşünülebilir. Ayrıca uçucu yağ taşıyan bitkilerin genellikle Akdeniz ve step iklimleri gibi sıcak iklimlerde fazla yetişmesi nedeniyle uçucu yağın bitkinin üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlediği düşünülmektedir (Tanker ve Tanker, 1985; Baytop, 1986).

Uçucu yağların iritatan (uyarıcı), rubefiyen (deriyi kızartan), nervinatik (sinir yatıştırıcı), antiromatizmal, ekspektoran (balgam söktürücü), antitussif (öksürüğü kesen), diüretik (idrar söktürücü), emenagog (adet söktürücü), karminatif (gaz giderici), stomaşik (midevi), koleretik (safra sökücü), anti helmentik (solucan düşürücü), antienflamatuar, antiseptik, antibiyotik ve sedatif etkileri tespit edilmiştir (Sakar ve Tanker 1991; Zeybek, 1985; Ceylan, 1987).

Uçucu yağlar genellikle oda sıcaklığında sıvıdır. Fakat sıvı olmayanları da vardır (gül yağı, anason yağı gibi). Kağıt üzerine damlatıldığında bıraktıkları leke, sabit yağlarda olduğu gibi iz bırakmaz, zamanla kaybolur. Uçucu yağlar yeni distile edildiğinde çoğunlukla renksizdir. Bazıları kahverengi, kırmızı, yeşil veya mavi (karanfil esansı kırmızı-kahverengi, papatya esansı mavi) olabilir (Sakar ve Tanker 1991; Zeybek, 1985; Ceylan, 1987).

Uçucu yağlar su ile karışmayan maddeler oldukları halde, kokularının suya geçmesine yetecek oranda suda çözünürler. Petrol eteri, kloroform, benzen, eter, etanol gibi organik çözücülerde çözünürler (Esen, 2005).

Uçucu yağların yoğunlukları 0.84 ile 1.18 g/mL arasında değişir. Uçucu yağların çoğu sudan hafiftir. Bazı uçucu yağlar ise (tarçın yağı, karanfil yağı gibi) sudan ağırdır (Sakar ve Tanker, 1991; Zeybek, 1985; Ceylan, 1987).

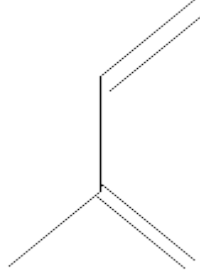
Uçucu yağların kırılma indisleri yüksek olup çoğunluğu optikçe aktiftir. Spesifik çevirmeleri uçucu yağı tanımaya yardımcı olur. Kırılma indisinde ve polarize ışığı çevirme derecesinde oluşan değişimler uçucu yağın saflığının bozulduğunu gösterir. (Tanker ve Tanker, 1985).

Uçucu yağlar genellikle renksizdir, nadiren renkli olabilirler. Uzun süre bekletildiklerinde oksitlenebilir, reçineleşebilir ve renkleri koyulaşabilir. Bu nedenle serin ve kuru bir yerde, iyi kapalı renkli şişelerde saklanmalıdırlar (Tanker ve Tanker, 1985).

Uçucu yağlar parfümeride, aromaterapide, kozmetikte, tütsü olarak, yiyecek ve içeceklerin tatlandırılmasında, tıpta ve ev temizlik ürünlerinde kullanılır. Bu yağlar koku ve tat endüstrileri için değerli bir konuma sahiptir. Eczacılıkta, ilaçların koku ve tatlarını düzeltici olarak kullanılırlar (Tanker ve Tanker, 1985).

Uçucu yağların bileşimi

Uçucu yağların bileşiminde terpenik veya terpenik olmayan uçucu bileşikler bulunur. Hepsi hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevlerinden ibarettirler. Bazıları azot veya kükürt içerebilirler. Alkol, asit, ester, epoksit, aldehit, keton, amin, sülfid, vs. formlarında bulunabilirler. Terpenik olmayan hidrokarbonlar metandan türeyen parafin (alkan ve alkenler) türevleridir. Terpenler ise izopren ünitelerinin birbirine bağlanması sonucu oluşurlar. Monoterpenler, seskiterpenler ve hatta diterpenler çoğu uçucu yağların terkebine girer. Ek olarak fenilpropanoitler, yağ asitleri ve esterleri ile onların bozunma ürünleri de uçucu yağlarda bulunabilirler (Başer, 2009).



Şekil 8. İzopren Molekülü

Aromatik bitkilerde uçucu yağlar muhtelif organlarda yağ hücreleri, salgı kanalları, boşlukları, veya salgı tüylerinde bulunurlar. Nanegiller (Lamiaceae) familyası bitkilerinde uçucu yağlar bitkinin yüzeyindeki salgı tüylerinde bulunurlar. Bu yüzden örneğin nane yaprağının yüzeyini hafifçe ovuşturduğumuzda uçucu yağ açığa çıkar. Defne veya ökaliptus yaprağının kokusunu alabilmek için ise yaprağı ovuşturmak yeterli olmaz, yaprağın parçalanması gerekir. Aynı şekilde rezene, anason gibi maydanozgiller (Apiaceae) meyvelerinin de uçucu yağları ancak parçalandıklarında açığa çıkar. Bazı hallerde uçucu bileşikler şekerlerle bağlanıp glikozit haline geçerler. Böyle durumlarda, uçucu yağ elde etmek için glikozit bağının enzimatik veya kimyasal yolla koparılmasıyla uçucu bileşenin açığa çıkarılması gerekir (Başer, 2009).

Uçucu Yağların Üretimi

Uçucu yağlar bitki dokularından distilasyon (damıtma) yoluyla elde edilir. Narenciye yağları *Citrus* (Narenciye) türlerinin meyve kabuklarından sıkma yoluyla üretilirler. Sıkma işlemi için çeşitli endüstriyel teknolojiler geliştirilmiştir (Başer, 2009).

Uçucu yağların elde edilmesinde kullanılan bir de yöntem soğukta sıkmadır. Bu yöntem grefurt, limon, portakal ve mandalina gibi ısıdan etkilenen narenciye yağlarının elde edilmesi için uygulanır. Narenciye kabuklarından usare ve uçucu yağ üretimi için günümüzde 2 tip ekstraktör kullanılmaktadır. FMC In Line adı verilen ekstraktörde meyvenin alt ve üst kısımları kesilir. Üzerinde delikler olan bir boru meyvenin içine usareyi almak üzere yerleşirken üstten dışa doğru inen bıçaklar kabukları dilimleyerek ayırır. Bu sırada salgı ceplerinin parçalanmasıyla açığa çıkan uçucu yağ etraftan püskürtülen su ile emülsiyon yaparak dış kanaldan sürüklenir. Polisitrus ekstraktörde ise meyveler helezon şeklinde ve rendelerle kaplı ekstraktörün içinde ilerlerken perikarptaki salgı cepleri patlar ve uçucu yağ su ile sürüklenerek toplanır. Her iki yöntemde de elde edilen uçucu yağ-su emülsiyonu santrifüj yardımıyla ayrılır ([http-1](http://1)).

Kuru distilasyon, huş katranı yağı gibi bazı katran yağlarının üretimi için kullanılan bir ısıyla bozunma işlemidir. Bu işlemde kıyılmış odunlar (ardıç, huş, çam veya sedir) dibindeki bir boru vasıtasıyla toplama kabına bağlı, içi oyuk bir kabın içine yerleştirilir. Kabın havayla teması tamamen kesilir ve üzerindeki demir potada kömür yakılır. Meydana gelen aşırı sıcaklık sonucu termal degradasyonla odundan ayrılan viskoz, koyu renkli, dumansı kokulu katranımsı yağ dipteki toplama kabında birikir. Bu materyal genellikle 15-20 gün içinde üç tabakaya ayrılır. Katran dipte kalır ve yağımsı tabaka ortadaki suyun üzerinde

yüzer. Yağ metanol, asetik asit ve ligninin diğer ısıyla bozunma ürünlerini içerir. (Başer, 2009).

Distilasyon

Distilasyon için :

- Su Distilasyonu
- Buhar Distilasyonu
- Su- Buhar Distilasyonu gibi yöntemler kullanılır (Başer, 2009).

Su Distilasyonu

Su distilasyonu bitki materyalinin su ile birlikte kaynatılmasıdır. Buharlaşan su ve yağ'ın bir soğutucuda yoğunlaştırılması ve toplama kabında toplanmasıyla yoğunlukları farklı olan su ve yağ birbirinden ayrılır. Gül yağı bu yöntemle elde edilir (Başer, 2009).

Buhar Distilasyonu

Buhar Distilasyonunda bitki materyali delikli metal sepete veya çelik elekler arasına yerleştirilir ve ayrı bir yerde üretilmiş su buharı kazanın alt tarafında verilir. Buhar bitki materyalindeki uçucu yağları sürükler ve anlatıldığı gibi yağ sudan ayrılarak uçucu yağ elde edilir. Uçucu yağ üretiminde endüstriyel anlamda en yaygın kullanılan distilasyon yöntemidir (Başer, 2009).

Su-Buhar Distilasyonu

Bu yöntem buhar distilasyonuna benzer ancak distilasyon işlemi buhar kazanının altında kaynatılan suyla gerçekleştirilir. Genellikle köylerde uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemde su distilasyonuna nazaran daha kısa sürede, daha az hidroliz olmuş, yüksek verimli uçucu yağ elde edilebilir (Başer, 2009).

Kohobasyon, genellikle su ve su-buhar distilasyonu yöntemlerinde uygulanan bir tekniktir. Bu teknikte distilasyon sonunda yağ alınmış olan yağ altı suyu bir düzenekle üstten sürekli kazana beslenerek tekrar distile edilir. Bu işlem suda çözülmüş oksijenli bileşiklerin ve özellikle fenollerin kaybını en aza indirecek tarzda yapılır (Başer, 2009).

Gül yağı distilasyonunda, yağ alınmış distilat suları ayrı bir kazanda yeniden distile edilerek daha çok yağ elde edilir. Fenil etil alkolce daha zengin bu yağ, çiçekten elde edilen yağ ile birleştirilerek piyasada bulunan gül yağını teşkil eder (Başer, 2009).

Mobil distilasyon, bir aromatik bitkinin (örn., nane, lavanta) büyük çaplı tarımının yapıldığı durumlarda ekonomik bulunan bir buhar distilasyonu tekniğidir. Bu yöntemde, mekanik olarak hasat edilip, tarlada soldurması tamamlanan bitki materyali tekerlekli kazanlara doldurulur. Bu mobil birimler daha sonra merkezi bir yerde kurulan distilasyon tesisine getirilir. Bu tesisler aynı anda çok sayıda mobil kazanı işleyebilecek şekilde tasarlanmıştır. Mobil kazanların her birine alttan su verilir ve üstten çıkan hortum ortak bir boru sistemiyle soğutucu ünitesine yönlendirilir. Yağ, diğer distilasyon sistemlerinde olduğu gibi Florentin kabında ayrılarak elde edilir. Distilasyonu tamamlanan mobil ünite boşaltıldıktan sonra tekrar tarlaya gönderilir (Başer, 2009).

Hidrodifüzyon, buharın alttan değil üstten beslendiği bir buhar distilasyonu sistemidir. Üstte materyal içine verilen buhar kondanse olup yağın difüzyonla dokuların dışına çıkmasını sağlar ve yerçekiminin de etkisiyle dipten sistemi terk eder. Bitki materyelinin ince toz edilmesi yağ verimini artırır ve bu teknik hem yüzeyüstü hem de yüzeyaltı yağlarının üretimi için uygundur. Bu yöntemle genellikle yüksek yağ verimleri elde edilir. Bunun nedeni, uçucu yağlar yanında sabit yağlar, kumarinler, psoralenler, klorofiller gibi az uçucu maddelerin de ekstre olmasıdır. Bu nedenle, hidrodifüzyon tekniğinin ticarete kullanımı yaygınlaşmamıştır (Başer, 2009).

Distilasyonla elde edilen ürünlere “uçucu yağ” denir. Aromatik materyelden ekstraksiyonla elde edilen ürünler başka isimlerle anılırlar (Başer, 2009).

Konkret, taze aromatik bitki materyalinin bir hidrokarbon çözücüyle tüketilmesi sonucu elde edilen bir üründür. Çözücünün alçak basınç altında uzaklaştırılmasıyla elde edilen katı ekstre uçucu yağ ihtiva eder (Başer, 2009).

Absolü, konkretin etanolla ekstraksiyonu sonucu elde edilir. Etanollü ekstrenin örn., -15°C gibi düşük derecede dondurulması ile mumlar katı hale gelir. Soğukta süzülükten sonra alçak basınç altında alkolü uzaklaştırılan ürün uçucu yağca zengin, koyu renkli bir sıvı veya yarı-katıdır (Başer, 2009).

Pomat, anfloraj yöntemiyle elde edilmiş üründür (Başer, 2009).

Ekstre, pomattan elde edilen absolüye verilen isimdir (Başer, 2009).

Rezinoit, ticarete oleorezin olarak da bilinir. Kuru bitki materyali kullanılarak hazırlanan konkrettir (Başer, 2009).

Ekstre, bitki materyalinin etanol gibi polar bir çözücü ile muamelesini takiben çözücünün alçak basınç altında uzaklaştırılması ile elde edilir (Başer, 2009).

Tentür, bitki materyelinin etanollü sıvı ekstresidir (Başer, 2009).

Balzam, bir ağaç veya çalının gövde veya dallarında yapılan yaralama sonucu akan hoş kokulu yarı-katı üründür. Terkinde yüksek oranda bulunan benzoik ve sinamik asitler ve esterleriyle karakterize edilirler (Başer, 2009).

Oleorezin, bir ağaç veya çalının gövde veya dallarında yapılan yaralama sonucu elde edilen ve terkinde reçine yanında yüksek oranda uçucu yağ bulunan doğal üründür (Başer, 2009).

Oleogumrezin, oleorezin gibidir ama zatk ihtiva eder (Başer, 2009).

Ekstraksiyon tekniğinin seçimi materyalin ne olduğuna, uçucu yağ verimi, kalitesine ve ürünün pazarlanabilirliğine bağlıdır. Organik çözücülerle klasik ekstraksiyon işlemleri gibi sıvılaştırılmış gazlarla (örn., süperkritik karbondioksit, fitosol gibi) yapılan ekstraksiyon işlemleri son yıllarda tercih edilmektedir (Başer, 2009).

***Mentha L.* Türleri Üzerinde Yapılmış Kimyasal Çalışmalar**

Türkiye’deki Lamiaceae familyasının 23 cinsine ait toplam 199 taksonun uçucu yağları çalışılmıştır. Bu bitkileri uçucu yağ içeriklerine göre *Coridothymus*, *Dorystoechas*, *Lavandula*, *Origanum* ve *Thymbra* zengin (> 2%), *Acinos*, *Calamintha*, *Mentha*, *Micromeria*, *Ocimum*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Satureja*,

Thymus ve *Ziziphora* orta (%0.5-2), fakat bunlardan *Mentha*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus* ve *Ziziphora*'nın bazı üyeleri uçucu yağ bakımından zengin, *Ajuga*, *Ballota*, *Clinopodium*, *Lamium*, *Marrubium*, *Melissa*, *Nepeta*, *Phlomis*, *Scutellaria*, *Sideritis*, *Stachys* ve *Teucrium* ise fakir (<0.5%) cinsler olmak üzere 3 gruba ayrılabilir (Başer, 1992).

Karadeniz Bölgesinde *M. pulegium* L., *M. aquatica* L., *M. dumetorum* Schultes., *M. suaveolens* Ehrh., *M. longifolia* (L.) Hudson., *M. spicata* ve *M. x villosa-nervata* Opiz. türlerinin yayılış gösterdikleri belirlenmiştir. Türkiye Florasında, *M. x dumetorum* Schuldes (*M. aquatica* x *M. longifolia*) ve *M. x villosa-nervata* (*M. longifolia* x *M. spicata*) türlerinin bulunduğu ilk defa bu çalışmayla belirlenmiştir (Tarımcılar ve Kaynak, 1996).

M. x dumetorum bitkisi üzerinde yapılan çalışmalarda uçucu yağdaki ana bileşenlerin, ebeveyn türlerde ana bileşen olarak bulunan mentofuran, pulegon, karvon, piperitenon bakımından zengin olduğu belirlenmiştir (Telci, 2001).

Sakarya'dan toplanılan *M. suaveolens* bitkisinin hidrodistilasyonla uçucu yağını elde etmişler yağ verimi %0.7 olarak tespit edilmiş. GK/KS analizi sonucunda 28 bileşen bulunmuş, ana bileşen olarak piperitenon oksit (%47) ve trans-piperiton oksit (%26) belirlemiştir (Başer ve ark., 1999).

İran'dan toplanılan *M. pulegium* bitkisinden hidrodistilasyonla uçucu yağ elde edilmiş ve ana bileşen olarak pulegon ve menton (sırasıyla; %37.8 ve 20.3) tespit edilmiştir (Nasrin, 2004).

Uruguay *M. pulegium* bitkisinin hidrodistilasyonla uçucu yağı elde edilmiş ve ana bileşen olarak pulegon (%73.4) tespit edilmiştir (Lorenzo ve ark., 2002).

Hindistan'ın Sanasar ve Patar yörelerinden toplanılan *M. pulegium* bitkisinden hidrodistilasyonla uçucu yağ elde edilmiş ve ana bileşen olarak pulegon belirlenmiştir. Pulegon miktarı Sanasar'da %65.9 Patar'da %83.1 olarak bulunmuştur (Agnihotri ve ark., 2005).

İtalya'da kültürü yapılan *M. spicata*' da uçucu yağ veriminin 2.5kg/da, uçucu yağ içerisindeki karvon oranının %39.1, limonen oranının ise %5.90 olduğu belirlenmiştir (Telci, 2001).

Yunanistan'da doğal yayılış gösteren *M. x villosa-nervata*'da uçucu yağ oranlarının %0.9-1.4 arasında olduğu ve 2 farklı kemotipinin bulunduğu belirlenmiştir. Kemotip 1; piperiton oksit (%68.7) ve piperitenon oksit (%65.9) bakımından zengindir. Piperiton oksit *M. longifolia* ve *M. spicata*'nın ana bileşeni olarak bulunabilir. Piperitenon oksit ise sadece *M. spicata*'da ana bileşen olarak bulunduğu kaydedilmiştir. Kemotip 2'nin karvon (%42.8) ve dihidrokarvon (%15.9) bakımında zengin olduğunu, karvonca zengin bu kemotipin baharat olarak yetiştirildiğini bildirmişlerdir (Kokkini ve Papageorgiou, 1987).

Yunanistan'da doğal yayılış gösteren *M. longifolia*'nın uçucu yağ ve bileşenlerini belirlemek için yapılan çalışmada, türe ait iki alttürün bulunduğu (subsp. *longifolia* ve subsp. *petiolata*) ve uçucu yağ oranları subsp. *longifolia*'da %0.4-0.5 subsp. *petiolata*'da %0.8-1.3 arasında değiştiği belirlenmiştir. Uçucu yağ ve bileşenlerinin incelenmesinde subsp. *longifolia*'da piperiton oksitce (%59.3-66.4) zengin olduğu, subsp. *petiolata*'da piperiton oksit (%50-65) ve karvon (%39.8-

45.9) oranları yüksek iki kemotipinin bulunduğu belirlenmiştir (Kokkini ve Papageorgiou, 1998).

Mentha'da uçucu yağın kompozisyonu kalite ve aromasını belirlemektedir. Bu kompozisyon ekolojik koşullar, çeşit ve biçim zamanlarına göre değişmektedir. Farmakopelere göre *M. piperita* yağında mentol oranı %50-78, menton oranı %10-30, mentofuran oranı %2.5-5 ve mentilasetat oranı %5-10, *M. spicata* yağında ise karvon oranı % 42-67 olmalıdır (Özgüven ve Kırıcı, 1999).

***Mentha* L. Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları**

Flamini ve arkadaşları, (1999)'da yaptıkları araştırmada pulegon'un bakterilere karşı güçlü etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. *M. suaveolens*'in pulegonca zengin olan uçucu yağları bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis*, *Enterobacter avium*, *Citrobacter freundii*) üzerinde *Citrobacter freundii* hariç MİK < 2.77 ppm etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. (Oumzil ve ark., 2002).

Mentha longifolia L. ssp. *longifolia* bitkisinin uçucu yağı ve metanol ekstresinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi üzerinde araştırmalar yapılmış, uçucu yağ, kullanılan mikroorganizmalara karşı güçlü etki gösterirken, metanol ekstresi hemen hemen etkisiz kalmıştır. Bunun aksine antioksidan aktivitede metanol ekstresi uçucu yağa oranla çok daha iyi sonuçlar vermiştir. Serbest radikal süpürücü (DPPH) etki olarak metanol ekstresi (IC₅₀=54.7 µg/mL), uçucu yağ (IC₅₀=107.0 µg/mL) göre daha güçlü etkiye sahiptir. *M. longifolia* L. ssp. *longifolia* bitkisinin uçucu yağı 15 bakteri ve 14 mantar üzerinde test edilmiş ve güçlü etki gösterdiği gözlenmiştir. Bakterilerde inhibisyon alanları 8-22mm, mantarlarda 12-35mm ve MİK değerleri bakterilerde 15.62-125 µl/mL, mantarlarda 31.25-125 µl/mL olarak bulunmuştur. Metanol ekstresinde ise etki gözlenmemiştir. β -Karoten/Linoleik Asit Co-oksidasyonunu inhibe edici etki tayininde uçucu yağ ve metanol ekstresi karşılaştırılmalı olarak incelenmiş ve uçucu yağ %36, metanol ekstresi %24'lük inhibisyon oluşturduğu bulunmuştur (Gulluce ve ark., 2007).

Yunanistanın kuzey doğusundan toplanan *Mentha spicata*'nın antifungal ve antibakteriyel aktivitesi üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Disk difüzyon deneyleri sonucunda *M. spicata*; *M. furfur*'a karşı inhibisyon göstermemiş olup *T. rubrum*'da 40 mm, *T. beigeli*'de 25mm inhibisyon alanı oluşmuştur. Minimum inhibisyon (MİK) ve minimum lethal konsantrasyon (MLC) deneyleri sonucunda *M. furfur*'da inhibisyon gözlenmemiş olup *T. rubrum*'da MİK 0.25 µl/mL, MLC 4 µl/mL, *T. beigeli*'de MİK 0.25 µl/mL, MLC 4 µl/mL olarak bulunmuştur (Adam ve ark., 1998).

In-vitro antioksidan kapasite belirlemeye yönelik çalışmada Türkiye'de doğal yayılış gösteren bazı *Mentha* L. taksonlarından elde edilen uçucu yağların bileşimleri ve antioksidan kapasiteleri ortaya konmuş ve bu uçucu yağlara ait antioksidan kapasite sonuçları incelenmiş ve çizelge 2'de verilmiştir (Öztürk ve ark., 2004).

31 *Mentha* cinsinin uçucu yağlarının asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri kolorimetrik metodla incelenmiş, *M. aquatica*'nın içerdiği seskiterpen alkoller nedeniyle çok güçlü inhibisyona (IC₅₀= 26 µg/mL) sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *M. gentilis* ve *M. arvensis* bitkilerinin uçucu yağları da güçlü AChE

inhibitör etki ($IC_{50}= 28-32 \mu\text{g/mL}$) gösterdiğini bulmuştur. Viridiflorol ve elemol gibi maddeleri taşıyan uçucu yağlarda güçlü inhibisyon göstermiştir (Mitsuo ve ark., 1998).

Çizelge 2. *Mentha* taksonlarından elde edilen uçucu yağların karşılaştırmalı antioksidan kapasiteleri

Uçucu yağ Miktarı (1000 ppm)	Antioksidan kapasite (Ort.±S.H. mM α -tokoferol asetat ekivalanı)
M1	11.270±1,583
M2	10.686±2,507
M3	1.620±0,226
M4	0.60±0,155
M5	14.170±1,340
M6	16.720±1,350
M7	15.981±2,215
S1*	1.180±0.203

*S1 La Florina firmasından temin edilen *Mentha x piperita* uçucu yağ standartı
M. x piperita (M1) 'in % 1.4, *M. x piperita* (M2) 'in % 1.4, *M. pulegium* (M3) 'ün % 1.8, *M. pulegium* (M4) 'ün % 2.2, *M. longifolia* subsp. *longifolia* (M5) 'in % 2.1, *M. longifolia* subsp. *longifolia* (M6) 'nın % 1.8, *M. longifolia* subsp. *typhoides* (M7) 'nin % 2.0.

GEREÇLER ve YÖNTEMLER

Kullanılan Bitkisel Materyal, Kimyasal Maddeler ve Aletler

Bitkisel Materyal

Çizelge 3. Tez çalışmalarında kullanılan *Mentha L.* türlerine ait veriler

BİTKİ ADI	KOD	TOPLANDIĞI YER	VERİM (%)
<i>M. longifolia</i> subsp. <i>typhoides</i> var. <i>typhoides</i>	MLTT ₁	Sinop; Ayancık, Yenikonak, 215m., 26.08.1994	1.1
<i>M. x villosa-</i> <i>nervata</i>	MVN ₁	Kastamonu; Daday-Azdavay 1400m., Abres ormanı yol kenarı, 22.08.1994	0.6
<i>M. pulegium</i>	MP	Edirne, Havsa, Osmanlı köyü göleti çevresi, sazlıklar, 100 m., 23.08.2003	1.8
<i>M. x villosa-</i> <i>nervata</i>	MVN ₂	Çanakkale; Saros körfezi, Kocaçeşme köyü, kuru dere yatağı, 35 m., 25.08.2004	2.2
<i>M. suaveolens</i>	MS	Yalova; Yalova-İzmit arası, Sultaniye, 0 m., kurak alan, 07.09.2006	1.0
<i>M. spicata</i> subsp. <i>spicata</i>	MSS	Yalova; Yalova-İzmit arası, Sultaniye, 0 m., nemli alan, 07.09.2006	2.0
<i>M. spicata</i> subsp. <i>tomentosa</i>	MST	Yalova-Kocaeli arası, Dereköy, 35m., kurak alan, 07.09.2006	1.8
<i>M. longifolia</i> subsp. <i>typhoides</i> var. <i>typhoides</i>	MLTT ₂	Bursa; Gemlik, Narlı, 3 m., nemli alan, çeşme kenarı, 08.09.2006	2.8

Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitede, kullanılan su ultra saf bidistile sudur (18 megaohm).

Kullanılan Aletler

Çalkalayıcı (Eppendorf)

Çalkalamalı su banyosu (GL Science)

Etüv (Binder)

Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (Agilent 5975 GC-MSD ve Agilent 6890N GC/FID)

Rotavapor (Heildolph)

Santrifüj (Eppendorf)

Ultrasonik banyo (Bandalin Sonorex)

Vorteks karıştırıcı (Heildolph)

pH metre (WTW Inolab)

UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu)

Deneysel Çalışma

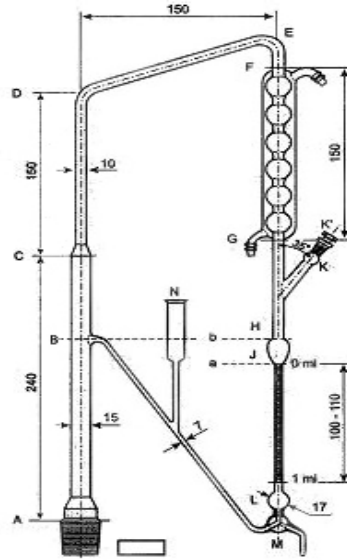
Bu bölümde çizelge 3’de belirtilen *Mentha L.* türlerinin uçucu yağlarının eldesi, analitik çalışmalar ve bu yağlar ile yapılan antioksidan, antibakteriyel, antikandidal, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz aktivite çalışmaları hakkında bilgi verilmektedir.

Distilasyon işlemleri

Bitkisel materyallerden uçucu yağ elde edilmesi için laboratuvarında Clevenger apareyinde su distilasyonu işlemi yapıldı.

Su distilasyonu

Laboratuvarında Clevenger apareyinde yapılan su distilasyonu işleminde Çizelge 3 de belirtilen *Mentha L.* türleri 50-100g kadar 2 litrelik balona doldurulduktan sonra balonun 2/3’ne kadar distile su ilave edilerek 3 saat süreyle distilasyon işlemi yapıldı. Üç saatin sonunda elde edilen uçucu yağ alındı. Deneysel çalışmalarda elde edilen bu yağlar kullanıldı. Su distilasyonu için kullanılan Clevenger apareyi Şekil 9 ’da gösterilmiştir.



Sekil 9. Clevenger apareyi
(Türk Farmakopesi, 2004)

Analitik çalışmalar

- Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi Sistemi, (GK/KS)

Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemi (GK/KS)

Elde edilen uçucu yağların eş zamanlı gaz kromatografisi ve gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi sistemi ile analizleri gerçekleştirildi. GK sisteminde kolonda ayrılan bileşikler FID dedektör ile tespit edilerek bileşiklerin bağıl yüzdeleri belirlendi. GK/KS sistemine ait kolonda ayrılan bileşiklerin kütle

spektrometrisi kısmında tek tek kütle spektrumları alındı. Değerlendirme işlemleri "Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi"nin yanı sıra Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 2.1 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapıldı.

Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) ve gaz kromatografisi (GK/FID) ile apolar bileşiklerin analizi

GK Analiz Koşulları

Sistem : Agilent 6890N GC

Kolon : HP-Innowax (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)

Tasıyıcı Gaz : Azot (0.8 mL/dak)

Sıcaklıklar

Enjeksiyon : 250 °C

Kolon : 60 °C'de 10 dak., 4 °C /dak. Artısla 220 °C'ye, 220 °C'de 10 dak., 1 °C /dak. artısla 240 °C

Detektör : 300 °C, FID (Alev iyonlaşma dedektörü)

GK/KS Analiz Koşulları

Sistem : Agilent 5975 GC-MSD

Kolon : HP-Innowax (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığı)

Tasıyıcı Gaz : Azot (0.8 mL/dak)

Sıcaklıklar

Enjeksiyon : 250 °C

Kolon : 60 °C'de 10 dak., 4 °C/dak. artısla 220 °C'ye, 220 °C'de 10 dak., 1 °C/dak. artısla 240 °C'ye

Split Oranı : 40:1

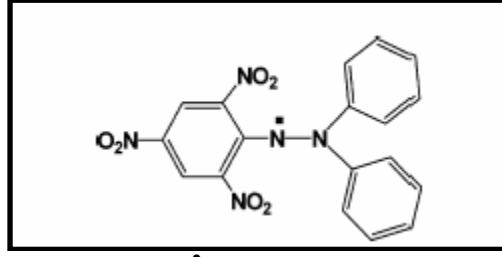
Elektron Enerjisi : 70 eV

Kütle Aralığı : 35-450 m/z

Antioksidan Aktivite Çalışmaları

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini

Bu test yöntemi, kararlı serbest radikal 1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•)'in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından süpürülmesi (temizlenmesi) ile karakteristik, mor rengin açılmasının spektrofotometrik olarak belirlenmesi temeline dayanır (Bucar ve Burits, 2000). Kararlı bir serbest radikal olan DPPH•, antioksidan maddelerden elektron ve hidrojen radikallerini kabul ederek, kararlı moleküllere dönüşmektedirler. Antioksidan maddelerin, DPPH• üzerindeki serbest radikal indirgeme kapasiteleri, ölçülen absorbanstaki düşüşle kendini göstermektedir (Gülçin ve ark., 2004).



Şekil 10. DPPH• radikalinin kimyasal yapısı

Absolü ethanol içerisinde hazırlanmış 50 µL uçucu yağ çözeltisi 450 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 7.4) ve 1 ml 0.1 mM metanolde hazırlanmış DPPH• çözeltisi ile karıştırıldı. Kontrol olarak numune içermeyen reaktif karışımı ve pozitif kontrol (askorbik asit) kullanıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorpsanlar 517 nm’de okundu. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. IC₅₀ değerleri nonlineer regresyon eğrileri kullanılarak (Sigma Plot 2001 version 7.0, SPSS Inc., Chicago, IL) hesaplandı. Değerler dört paralel deneyin ortalaması olarak verildi (Göger, 2006; Gyamfi ve ark., 1999).

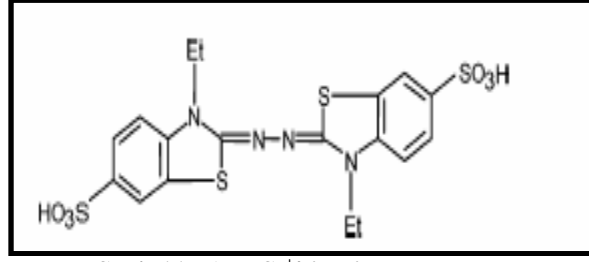
β-Karoten/Linoleik Asit Co-oksidasyonunu İnhibe Edici Etki Tayini

β-Karoten-linoleik asit test sistemi, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Uçucu yağların antioksidan aktivitesi β-karoten soldurma deneyine göre yapıldı. Kısaca, 1 mL β-karoten (0.2 mg/mL kloroform içerisinde) içerisinde linoleik asit (40 mg) ve Tween 20 (400 mg) bulunan kap içerisine ilave edildi. Kloroform azot altında yoğunlaştırıldı. 50 ml distile su ilave edildi ve hızla çalkalandı. Kontrol, örnek ve standart konulmadan aynı yöntem ile hazırlandı. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise β-karotensiz olarak hazırlandı. Tüm numunelerin örnekleri 470 nm’de spektrofotometrede okundu. Sonra örnekler termal otooksidasyon için 50 °C’ de 105 dakika su banyosunda bekletildi. β-Karoten’in solma derecesi 15 dakikalık aralıklarla örnek alınarak izlendi. Antioksidan aktivite sonucu üç deneyin ortalaması olarak aşağıdaki eşitliğe göre verildi (Oomah ve Mazza, 1996; Velioglu ve ark., 1998).

$$AA\% = [1 - (Ab^0_{\text{örnek}} - Abs^{105}_{\text{örnek}}) / (Ab^0_{\text{kontrol}} - Abs^{105}_{\text{kontrol}})] \times 100$$

2,2’-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS^{•+}) radikalini süpürücü etki tayini

Bu metotta ABTS [2,2’-azonobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)] peroksil veya diğer oksidantlara okside olur ve ABTS^{•+} radikal katyonu oluşur. Oluşan ABTS^{•+} radikal katyonu oldukça şiddetli bir renge sahiptir. Antioksidan kapasite, test bileşeninin ABTS^{•+} radikal katyonu ile direkt olarak reaksiyona girmesi ile renk şiddetindeki azalma ölçülerek belirlenir (Prior ve ark., 2005).



Şekil 11. ABTS^{•+} in kimyasal yapısı

Bu metotta ABTS^{•+} radikalini süpürme gücü E vitamininin suda çözünen formu olan Trolox ile karşılaştırılarak hesaplanır. 7 mM ABTS ve 2.5 mM sodyum persülfat (Na₂S₂O₈) (son konsantrasyon) karanlıkta ve oda sıcaklığında 12-16 saat bekletilerek mavi-yeşil ABTS^{•+} oluşması sağlanır. Bu konsantre ABTS^{•+} çözeltisi etanol ile seyreltilerek 0.8-0.7 absorbans (734 nm) değerine ayarlanır. 10 µL örnek/trolox/standart ve 990 µL ABTS^{•+} çözeltisi karıştırılır ve 1 dakika aralıklarla 30 dakika boyunca absorbansı ölçülür. Örneklerin antioksidan kapasitesi Trolox ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisi kullanılarak Trolox eşdeğeri olarak hesaplanır.

İndirgeme gücünün belirlenmesi

İndirgeme potansiyeli metodunda yüksek absorbans, yüksek indirgeme potansiyelini gösterir. Bu metotta antioksidan maddenin indirgeme gücü belirlenir. Potasyum ferrisiyanid [K₃Fe(CN)₆] maddesindeki Fe(III) iyonlarının Fe(II) iyonlarına indirgenmesi 700 nm de ölçülerek belirlenir. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme potansiyelini gösterir. Sonuçlar askorbik asit eşdeğeri olarak verilir (Mathew ve Abraham, 2006).

Ekstrelerin demir(III)' ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu 1986, yöntemin göre yapıldı. 1 mL numune çözeltisi 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 mL %1 lik potasyum hekzasiyanoferrat çözeltisi ile karıştırıldı. 50°C de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10 luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edildi ve karışım 10 dakika santrifüj edildi. Son olarak, 2.5 mL üst kısım 2.5 mL su ve 0.5 mL %0.1 lik FeCl₃ ilave edilip karıştırılarak 700 nm de absorbansları okundu. Ekstrelerin indirgeme güçleri askorbik asite eşdeğeri olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verildi (Dorman ve ark., 2003). Büyük AscAE değeri zengin indirgeme kapasitesini göstermektedir. Tüm analizler dört paralel olarak yapıldı ve ortalama değerler olarak verildi.

ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Mikroorganizmaların Canlandırılması

Liyofilize kültürler halinde bulunan bakteri ve funguslar, buldukları tüplerden steril şartlar altında çıkarılmış ve canlandırılmak üzere Nutrient Broth tüplerine aktarılmıştır. 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, kültürlerin Mueller Hinton Agar (MHA) plakalarına öze yardımıyla tek koloni ekimi yapılarak tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler için ekimi yapılan bu mikroorganizmalar çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Antimikrobiyal Aktivite Tayininde Kullanılan Mikroorganizmalar

No	Adı	Kaynak	Media*	Sıcaklık °C
1	<i>Escherichia coli</i>	NRRL B-3008	SGA, MHA	37°C
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	SGA, MHA	37°C
3	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311	MHA	37°C
4	<i>Staphylococcus aureus(MRSA)</i>	Osmangazi Üniv. Tıp Fak. Klinik İzolat	MHA	37°C
5	<i>Serratia marcescens</i>	NRRL Y-2544	MHA	37°C
6	<i>Candida utilis</i>	NRRL Y-900	SGA, MHA	37°C
7	<i>Candida tropicalis</i>	NRRL Y-12968	SGA, MHA	37°C
8	<i>Candida parapsilosis</i>	NRRL Y-12696	SGA, MHA	37°C
9	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	—	—
10	<i>Candida glabrata</i>	Osmangazi Üniv. Tıp Fak.Klinik İzolat	SGA, MHA	37°C

*SGA: Sabouraud Glucose Agar

MHA: Mueller Hinton Agar

Mikrobroth Dilüsyon Tekniği ile Antimikrobiyal Etkinin Belirlenmesi

Çizelge 4’de listelenen bakteri ve kandida kültürleri canlandırılmak üzere -85°C’ den 1 gün önce çıkarılarak içinde MHA bulunan petrilere öze ile ekilmiş ve 37°C’ de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besi yerinde gelişen koloniler öze yardımı ile alınarak içerisinde 10 mL Mueller Hinton Broth (MHB) bulunan küçük kapaklı tüplere aktarılmış ve tekrar 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda küçük tüpler içerisindeki sıvı besiyerinde gelişen kültürlerden, yeni hazırlanmış MHB tüplerine belirli miktarlarda aktararak bulanıklıkları Mc Farland No: 0.5 (BaCl_2 %1.75, 0.36N H_2SO_4 içinde), tüpüne göre ayarlanmıştır. Bu şekilde yaklaşık 10^8 CFU/ml’lik bakteri konsanrasyonu elde edilmiştir.

Aktivitesi denenecek olan uçucu yağlar, 8 mg olmak üzere steril flakonlara tartılmış ve herbiri üzerine 1’er mL steril dimetilsülfoksit (DMSO), eklenip çözülerek (Uçucu yağların DMSO içerisinde tam olarak çözümleri ve homojen bir karışım haline gelmeleri için vortexlenmiştir) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen stok çözeltilerinden başlayarak uçucu yağların, içinde MHB bulunan mikro-reaksiyon tüplerinde dilüsyonları hazırlanarak, uçucu yağların 4mg/mL’den 31.25µg/mL’ye kadar seri konsantrasyonları elde edilmiştir.

Deney için 96 “U tipi” kuyucuklara sahip mikrotitrasyon petrilere kullanılmıştır (şekil 12). Dilüe edilmiş karışımlardan sırasıyla her bir kuyucuk sütun serisine mikropipetör yardımıyla 100’er µL aktarılmıştır. Test edilecek uçucu yağların yanı sıra çözücü kontrolü için DMSO, ayrıca standart antibiyotik olan kloramfenikol bakteriler için, standart antifungal madde olan ketokanazol de funguslar için pozitif kontrol olarak test edilmiştir. Son sütun mikroorganizma

kontrolü için boş bırakılmış sadece 100 µL MHB konmuştur. Tüm konsantrasyonlar kuyucuklara alındıktan sonra, mikroorganizmaların eklenmesine geçilmiştir. Bunun için bulanıklığı önceden Mc Farland No: 0.5'e göre ayarlanan mikroorganizma kültürleri multikanal otomatik pipetörlere göre imal edilmiş rezervuarlara aktarılmış ve daha sonra bu pipetörler yardımıyla her bir kuyucuk satırına bir mikroorganizma gelecek şekilde 100'er µL eklenmiştir. Son sütun mikroorganizma kontrolüne ayrıldığı gibi son satır da test maddesinin kontrolüne ayrılarak mikroorganizma eklenmemiştir. Bu işlemlerden sonra mirotitrasyon petrilерinin kapakları kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda üremenin varlığının ya da yokluğunun daha iyi gözlemlenebilmesi için her kuyucuğa trifenil tetrazolyum klorit (TTC) çözeltsinden 25'şer µL ilave edilmiştir. Sonra renklenme için 37°C'de 3 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda renklenmeyen alanlar üremenin olmadığı konsantrasyonlar olarak belirlenmiş ve bu sonuca göre minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Deneyler çift paralel olarak yapılmış, MİK değerleri ortalama olarak verilmiştir (İşcan, 2002; Beşe, 1989; Elof, 1998; Hadacek ve Greger, 2000; Koneman ve ark., 1997; Vanden Berge ve Vlietinck, 1991).



Şekil 12. Mikrodilüsyon Tekniğinde Kullanılan 96 (well) Kuyucuklu Mikrotitrasyon Petrisi

ENZİM İNHİBİSYON DENEYLERİ

Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibisyonu

Kolinesteraz enzim ailesi, asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BuChE) olmak üzere çeşitli canlılarda yaygın olarak bulunan ve hem genetik dizilimleri hem de üç boyutlu protein yapıları açısından benzerlik gösteren iki farklı enzimden oluşur. AChE, kolinerjik sinir iletiminin sonlandırılmasında görev alır. BuChE'nin ise gerçek işlevi henüz tanımlanamamıştır. Aynı monomerin oluşturduğu tetramerik yapıdaki serum BuChE'si, ester bağı ve amid bağı içeren bileşikler parçalayabilmesi nedeni ile yabancı bileşiklere karşı korunmada öncülük eden biyolojik çöpçü enzim olarak da adlandırılır. Özellikle günümüzde savaş silahı olarak kullanılan organofosfat veya karbamat yapılı sinir gazları ve insektisit olarak kullanılan benzer yapılı kimyasallar ile zehirlenmelerde, BuChE profilaktik amaçla kullanılmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri, sadece savaşlarda kullanılan kimyasal terör silahı değil, Alzheimer, myastenia gravis veya glokom

gibi hastalıklarda da ilaç olarak işlev görürler. Ancak her iki kolinesteraz enzimine birden inhibisyon etkisi gösteren maddelerin ilaç olarak kullanımı uygun değildir. AChE ve BuChE'nin yapısal benzerliği, özgül inhibitör geliştirme çabalarını zorlaştırmasına rağmen özgül kolinesteraz inhibitörü tasarımı, ilaç geliştirilmesinde büyük önem taşır (Bodur ve Çokuğraş, 2006).

Asetilkolinesteraz (AChE) İnhibitör Etkinin Belirlenmesi

Uçucu yağların asetilkolinesteraz (AChE) aktivitelerinin belirlenmesinde Ellman yöntemi uygulanmıştır. Ellman yönteminin prensibi, substrat olarak kullanılan asetiltiyokolin iyodürün asetilkolinesteraz enzimi tarafından asetil ve tiyokoline hidroliz olması; oluşan tiyokolinin Ellman reaktifiyle [5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)] (DTNB) sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat kompleksi vermesine dayanır. Oluşan sarı rengin şiddeti UV-Spektrofotometre'de 412 nm'de kontrol numuneleriyle absorbansları karşılaştırılarak yorumlanır (Atta-Ur-Rahman ve ark., 2001; Ellman ve ark., 1961).

Deneysel çalışmalarda numunelerin çeşitli konsantrasyonları MeOH'de çözülerek hazırlanmıştır. Kullanılan tampon 0.1 M fosfat (pH= 8) tamponudur. Her iki deney çalışmasında da 1U/mL'lik enzim kullanılmıştır. Reaksiyonlarda kullanılan DTNB solüsyonu 0.01 M'lık hazırlanmıştır. Substrat olarak kullanılan asetiltiyokolin iyodür 75 mM ve bütiriltiyokolin iyodür ise 10 mM olarak hazırlanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler UV-VIS spektrofotometre ile 37°C'de 412 nm'de ölçülmüştür. Her iki deneysel yöntemde de çalışmalar 2 tekrar ile gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması AChE ve BuChE aktivitesi IC₅₀ değeri olarak verilmiştir.

Butirilkolinesteraz (BuChE) İnhibitör Etkinin Belirlenmesi

Butirilkolinesteraz karaciğerde sentezlenir ve kana salınır. Ayrıca yağ dokusu, incebağırsak, akciğer ve beynin ak maddesi gibi çeşitli dokularda bulunur. Bu enzim asetilkolin için düşük afiniteye sahiptir. Butirilkolinesteraz, memelilerde bilinen biyolojik substratı olmayan bir enzimdir. Fakat bütiriltiyokolin, butirilkolin, propiyoniltiyokolin, propiyonilkolin ve farmakolojik açıdan önemli bir ajan olan süksinilkolin gibi çeşitli kolin esterlerini hidroliz eder. Butirilkolinesteraz yaklaşık olarak 342000 Da ağırlığında tetramerik bir glikoproteindir. Stres sonucunda sempatik sinir sisteminin aktivasyonu ile plazma epinefrin, norepinefrin ve kortizol düzeylerinin artması gibi çeşitli biyokimyasal değişiklikler oluşur. Ayrıca serum bütirilkolinesteraz aktivitesinin anksiyete ile arttığını gösteren çalışmalar vardır (Ağırçöl ve ark., 2008).

Butirilkolinesteraz, kardeş enzimi asetilkolinesteraza benzer şekilde yapısında üç farklı enzimatik aktivite barındırır: esteraz, aril açilamidaz ve peptidaz (proteaz) aktiviteleri. Asetilkolinesterazın kolinerjik sinir iletimindeki rolü tamamen anlaşılmış olmasına karşın, butirilkolinesterazın gerçek fizyolojik işlevi bugün halen bilinmemektedir. Her iki enzim farklı doku dağılımları gösteren benzer moleküler formlara sahiptir. Butirilkolinesterazın esteraz aktivitesi, organofosfat ve karbamat yapıları inhibitörlerin asetilkolinesteraza ulaşmadan dolaşımdan temizlenmesinde, asetilkolinesteraz yoksunluğunda kolinerjik sinir iletiminin kontrolünde ve kokain, aspirin, amitriptilin gibi bazı ilaçların inaktivasyonu veya bambuterol, heroin gibi bazı ilaçların ise aktivasyonunda önem kazanmaktadır. Enzimin aril açilamidaz aktivitesinin ise seratonerjik ve kolinerjik sinir iletimi

sistemleri arasında iletiřim sađlama iřlevi olduđu ileri sűrűlmektedir. Ek olarak, enzimin peptidaz veya proteaz aktivitesinin Alzheimer hastalıđının geliřmesi ve ilerlemesinde iřlevi vardır. Butirikolinesteraz bu hastalıkta β -amyloid proteinin űretimine ve proteinin β -amyloid plaklara difűzlenmesine neden olmaktadır (Çokuđrař, 2003).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu bölümde çizelge 3’de belirtilen *Mentha* türlerinin uçucu yağlarının elde edildikten sonra, uçucu yağların; kompozisyonu, antimikrobiyal, antioksidan ve kolinesteraz aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları verilmiştir.

Uçucu Yağların Kimyasal Kompozisyonları

Uçucu yağların kimyasal kompozisyonları, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GK/KS) analizi kullanılarak aydınlatılmıştır. Uçucu yağların kimyasal bileşenleri ve yüzde oranları aşağıda tablolar halinde verilmiştir.

Çizelge 5. *M. x villosa-nervata*’nın Uçucu Yağ Bilesimi

RRI	Bileşik	% MVN ₁	% MVN ₂
1032	α -Pinen	e	0.6
1035	α -Tuyen	e	-
1118	β -Pinen	e	0.8
1132	Sabinen	0.2	0.5
1174	Mirsen	0.1	0.7
1188	α -Terpinen	e	-
1203	Limonen	e	1.3
1213	1,8-Sineol	1.4	1
1246	(Z)- β -Osimen	0.1	0.4
1255	α -Terpinen	e	-
1266	(E)- β -Osimen	-	e
1280	<i>p</i> -Simen	0.3	-
1285	izoamil izovalerat	-	0.1
1345	3-Oktil asetat	1.1	-
1393	3-Oktanöl	0.2	-
1400	Nonanal	0.1	-
1450	<i>trans</i> -Linalöl oksit (Furanoid)	e	-
1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	0.2	-
1478	<i>cis</i> -Linalöl oksit (Furanoid)	0.1	-
1483	Oktil asetat	-	e
1494	(Z)-3-Hekzenil 3-metilbutirat (=Z)-3-hekzenil izovalerat)	e	0.1
1505	Dihidroedulan II	0.2	0.3
1535	β -Burbonen	-	0.1
1553	Linalöl	93.2	0.1
1565	Linalil asetat	0.6	-
1571	<i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-öl	e	-
1600	β -Elemen	-	0.1
1611	Terpinen-4-öl	0.3	-
1612	β -Karyofillen	0.4	5.2
1668	(Z)- β -Farnesen	-	0.6
1687	α -Humulen	-	0.2
1706	α -Terpineöl	0.4	-
1726	Germakrene D	0.5	2.2

1733	<i>cis</i> -Piperiton oksit	-	1.7
1754	<i>trans</i>-Piperiton oksit	-	76
1755	Bisiklogermakren	-	e
1765	Geranil asetat	0.1	-
1773	δ -Kadinen	-	0.1
1831	2-hidroksipiperiton (= Diosfenol)	-	0.1
1857	Geraniol	0.2	-
1865	izopiperitenon	-	0.1
1946	4-Hidroksipiperiton	-	0.1
1983	Piperitenon oksit	-	1.8
2008	Karyofillen oksit	-	0.9
2131	Hekzahidrofarnesil aseton	-	0.1
2144	Spatulenol	-	0.1
2186	Öjenol	-	e
2198	Timol	-	0.7
2209	T-Muurolol	-	e
2239	Karvakrol	-	0.2
2255	α -Kadinol	-	0.1
2324	Karyofilla-2(12),6(13)-dien-5 α -ol (=Karyofilladienol II)	-	0.1
2369	Ödesma-4(15),7-dien-1 β -ol	-	0.1
	Toplam	99.8	96.2

Çizelge 6. *M. longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides*'in Uçucu Yağ Bilesimi

RRI	Bileşik	% MLTT₁	% MLTT₂
1032	α -Pinen	-	0.5
1118	β -Pinen	-	0.7
1132	Sabinen	-	0.4
1174	Mirsen	e	0.4
1203	Limonen	-	0.3
1213	1,8-Sineol	1.3	2.7
1255	γ -Terpinen	-	0.3
1266	(<i>E</i>)- β -Osimen	-	e
1290	Terpinolen	-	e
1299	2-Metilbutil izovalerat	-	e
1345	3-Oktil asetat	0.2	-
1393	3-Oktanol	0.1	e
1400	Nonanal	-	e
1450	<i>trans</i> -Linalool oksit (Furanoid)	0.5	-
1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	-	e
1478	<i>cis</i> -Linalool oksit (Furanoid)	0.6	-
1494	(<i>Z</i>)-3-Hekzenil 3-metilbutirat (= (<i>Z</i>)-3-hekzenil izovalerat)	-	0.1
1497	Mentofuran	-	0.1
1505	Dihidroedulan II	-	0.1
1535	β -Burbonen	-	e

1553	Linalool	90.4	0.3
1556	<i>cis</i> -Sabinen hidrat	-	e
1565	Linalil asetat	6.6	-
1577	Neoizopulegol	-	0.1
1583	İzopulegol	-	e
1584	<i>cis</i> -İzopulegon	-	0.3
1598	<i>trans</i> -İzopulegon	-	0.3
1600	β -Elemen	-	0.3
1606	İzo-izopulegol	-	48.8
1612	β -Karyofillen	0.2	-
1621	<i>p</i> -Ment-3-en-8-ol	-	3.2
1648	Mirtenal	-	0.1
1650	İzo-izopulegil asetat	-	8.2
1662	Pulegon	-	30.4
1668	(<i>Z</i>)- β -Farnesen	-	0.2
1682	δ -Terpineol	-	0.1
1706	α -Terpineol	-	0.5
1726	Germakren D	-	0.1
1865	İzopiperitenon	-	0.1
1949	Piperitenon	-	0.7
2008	Karyofillen oksit	-	0.1
	Toplam	99.9	99.4

Çizelge 7. *M. pulegium* 'un Uçucu Yağ Bilesimi

RRI	Bileşik	% MP
1032	α -Pinen	0.5
1051	2,5-Dimetiltetrahidrofuran	e
1118	β -Pinen	0.3
1132	Sabinen	e
1174	Mirsen	0.2
1203	Limonen	0.9
1213	1,8-Sineol	0.1
1345	3-Oktil asetat	e
1393	3-Oktanöl	1.0
1475	Mentone	0.1
1494	(<i>Z</i>)-3-Hekzenil 3-metilbutirat (= (<i>Z</i>)-3-hekzenil izovalerat)	e
1503	İzomenton	1.0
1505	Dihidroedulan II	e
1535	β -Burbonen	0.2
1639	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	e
1678	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	e
1706	α -Terpineol	0.1
1733	<i>cis</i> -Piperiton oksit	0.3
1748	Piperiton	93.0
	Toplam	97.7

Çizelge 8. *M. spicata* subsp. *tomentosa* 'nın Uçucu Yağ Bilesimi

RRI	Bileşik	% MST
1032	α -Pinen	0.7
1035	α -Tuyen	e
1076	Kamfen	0.1
1118	β -Pinen	1
1132	Sabinen	0.5
1174	Mirsen	0.7
1203	Limonen	0.7
1213	1,8-Sineol	4.1
1246	(Z)- β -Osimen	0.4
1266	(E)- β -Osimen	0.1
1290	Terpinolen	0.1
1393	3-Oktanöl	0.2
1457	Hekzil-3-metil butirat (=Hekzil izovalerat)	e
1494	(Z)-3-Hekzenil 3-metilbutirat (=Z)-3-hekzenil izovalerat)	0.2
1505	Dihidroedulan II	0.1
1535	β -Burbonen	0.1
1537	Dihidroedulan I	0.1
1553	Linalöl	0.2
1586	Pinokarvon	0.2
1590	Bornil asetat	0.1
1600	β -Elemen	0.2
1611	Terpinen-4-öl	0.2
1612	β -Karyofillen	1
1648	Mirtenal	0.2
1670	<i>trans</i> -Pinokarveöl	0.2
1682	δ -Terpineöl	0.1
1683	<i>trans</i> -Verbenöl	0.1
1706	α -Terpineöl	0.1
1719	Borneöl	0.2
1726	Germakren D	0.6
1733	<i>cis</i> -Piperiton oksit	11.4
1754	<i>trans</i>-Piperiton oksit	60.5
1755	Bisiklogermakren	e
1865	İzopiperitenon	0.1
1946	4-Hidroksipiperiton	0.4
1949	Piperitenon	0.3
1969	<i>cis</i> -Jasmon	0.4
1983	Piperitenon oksit	11.7
2008	Karyofillen oksit	0.1
2198	Timöl	0.9
	Toplam	98.3

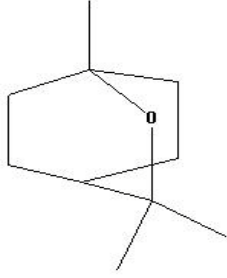
Çizelge 9. *M. spicata* subsp. *spicata* 'nın Uçucu Yağ Bilesimi

RRI	Bileşen	% MSS
1032	α -Pinen	0.6
1076	Kamfen	0.1
1118	β -Pinen	0.8
1132	Sabinen	0.5
1174	Mirsen	1.6
1188	α -Terpinen	e
1203	Limonen	17.8
1213	1,8-Sineol	3
1246	(Z)- β -Osimen	0.1
1255	γ -Terpinen	0.1
1290	Terpinolen	0.1
1393	3-Oktanöl	0.4
1400	Nonanal	e
1457	Hekzil-3-metil butirat (=Hekzil izovalerat)	0.1
1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	0.2
1475	Menton	1.3
1494	(Z)-3-Hekzenil 3-metilbutirat (=Z)-3-hekzenil izovalerat)	0.1
1503	İzomenton	e
1505	Dihidroedulan II	e
1528	α -Burbonen	e
1535	β -Burbonen	0.7
1553	Linalöl	0.1
1583	<i>cis</i> -İzopulegon	0.1
1589	β -Yılangen	0.1
1604	Neomentol	0.1
1611	Terpinen-4-öl	0.2
1612	β -Karyofillen	1.3
1624	<i>trans</i> -Dihidrokarvon	2.1
1639	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dien-1-öl	e
1662	Pulegon	0.1
1678	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-öl	0.5
1706	α -Terpineöl	0.1
1719	Borneöl	0.1
1726	Germakren D	0.1
1748	Piperiton	0.2
1751	Karvon	63.6
1757	Dihidrokarveöl	0.6
1782	<i>cis</i> -Karvilasetat	0.2
1845	<i>trans</i> -Karveöl	0.3
1853	<i>cis</i> -Kalamenen	0.1
1882	<i>cis</i> -Karveöl	0.7
1949	Piperitenon	0.3
1969	<i>cis</i> -Jasmon	0.2
1983	Piperitenon oksit	0.3
	Toplam	98.9

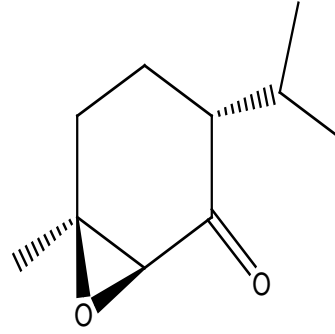
Çizelge 10. *M. Suaveolens* 'in Uçucu Yağ Bilesimi

RRI	Bileşik	% MS
1018	Metil-2-metil butirat	0.1
1032	α -Pinen	1.6
1035	α -Tuyen	e
1063	Etil-2-metilbütirat	e
1076	Kamfen	0.4
1118	β -Pinen	1.7
1132	Sabinen	0.8
1174	Mirsen	1.5
1183	<i>p</i> -Menta-1,7(8)-dien (=Psödolimonen)	0.1
1203	Limonen	5.7
1213	1,8-Sineol	0.3
1246	(<i>Z</i>)- β -Osimen	0.1
1255	γ -Terpinen	e
1266	(<i>E</i>)- β -Osimen	e
1290	Terpinolen	e
1345	3-Oktil asetat	0.1
1386	1-Oktenil asetat	1.2
1452	α , <i>p</i> -Dimetilstiren	0.1
1452	1-Okten-3-ol	1
1474	<i>trans</i> -Sabinen hidrat	0.1
1475	Menton	e
1505	Dihidroedulan II	0.1
1537	Dihidroedulan I	0.2
1544	α -Gurjunen	0.1
1556	1-Nonen-3-ol	0.2
1590	Bornil asetat	0.1
1600	β -Elemen	e
1602	β -Kopaen	0.1
1611	Terpinen-4-ol	0.1
1612	β -Karyofillen	0.6
1617	Lavandulil asetat	e
1686	Lavandulol	0.3
1719	Borneol	1
1726	Germakren D	2.5
1751	Karvon	0.4
1755	Bisiklogermakren	e
1773	δ -Kadinen	0.1
1776	γ -Kadinen	e
1864	<i>p</i> -Simen-8-ol	0.7
1865	İzopiperitenon	0.1
1868	(<i>E</i>)-Geranil aseton	0.1
1949	Piperitenon	0.6
1969	<i>cis</i> -Jasmon	1.2
1983	Piperitenon oksit	73.6
1992	2-Feniletil-2-metil butirat	e

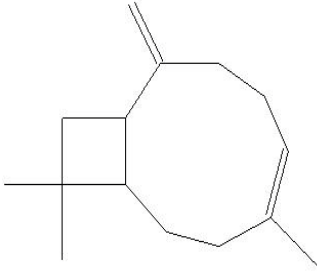
2006	8,9-dehidrotimol	0.7
2131	Hekzahidrofarnesil aseton	0.1
2186	Öjenol	0.1
2209	T-Muurolol	e
2218	4-Vinilgayakol	0.1
	Toplam	98.1



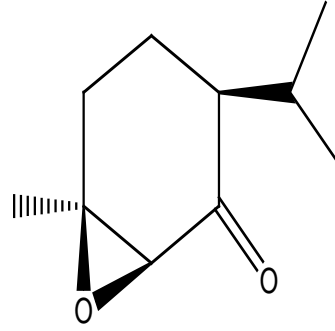
1,8- Sineol



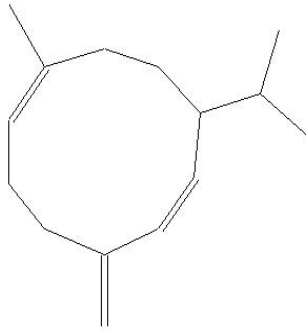
trans- piperiton oksit



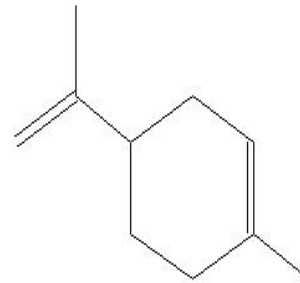
β- Karyofillen



cis- piperiton oksit

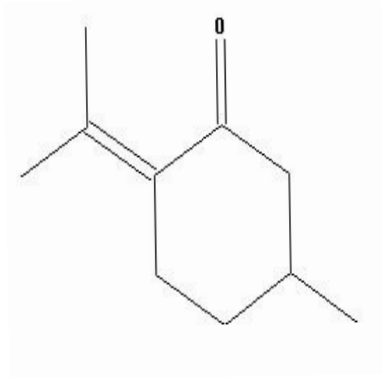


Germakren D

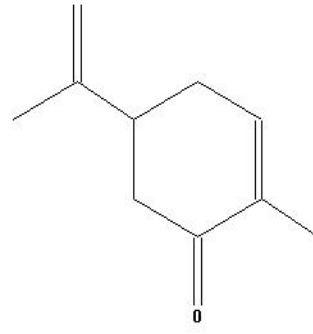


Limonen

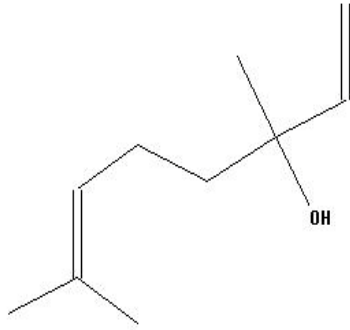
Şekil 13a. *Mentha* Uçucu Yağlarında Rastlanan Baskın Bileşenler



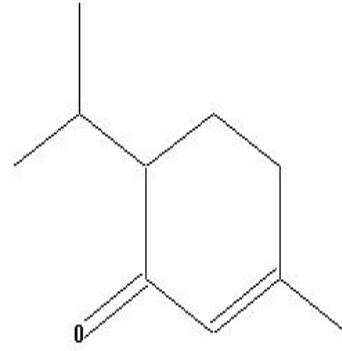
Pulegon



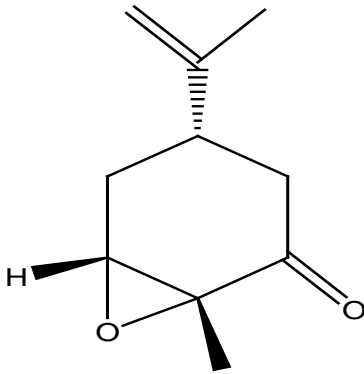
Karvon



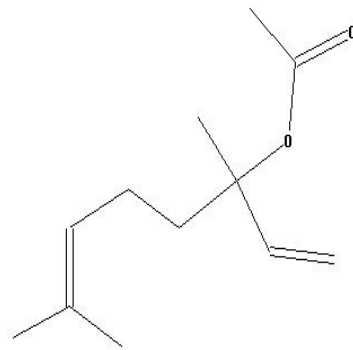
Linalol



Piperiton



Piperitenon oksit



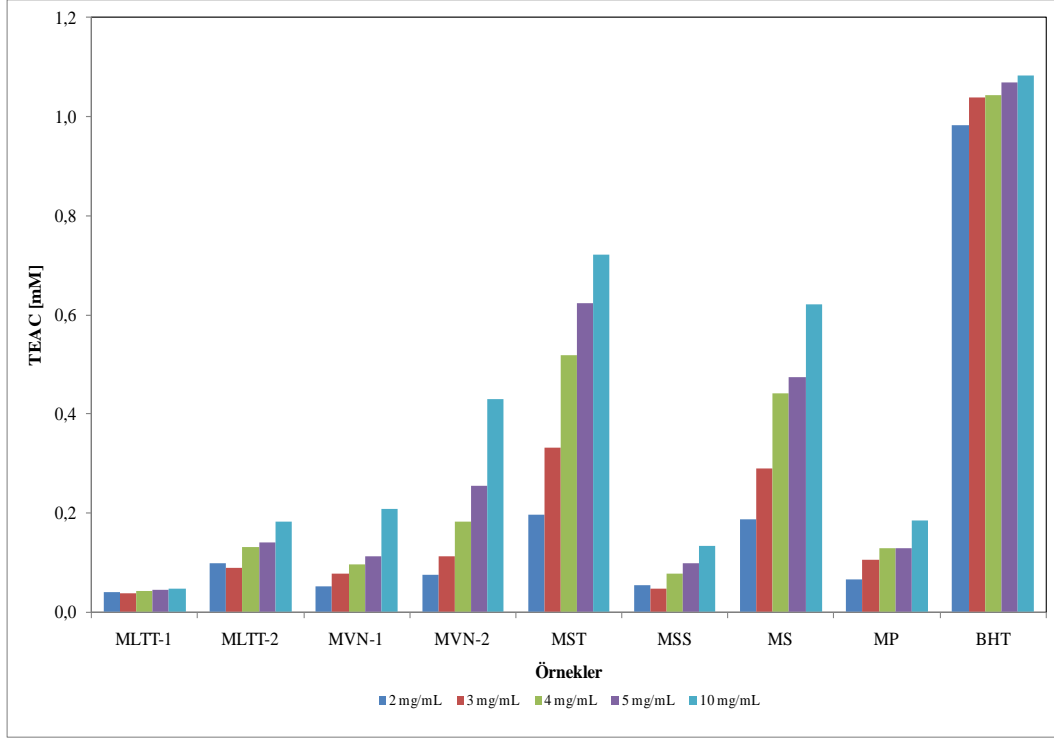
Linalil asetat

Şekil 13 b. (Devamı) *Mentha* Uçucu Yağlarında Rastlanan Baskın Bileşenler

Uçucu Yağların Antioksidan Aktivite Sonuçları

Mentha uçucu yağları 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•]) radikalini süpürücü etki, β -Karoten/Linoleik Asit Co-oksidasyonunu inhibe edici etki ve indirgeme gücünün belirlenmesi deneylerinde herhangi bir etki göstermemişlerdir. Sadece (ABTS^{•+}) radikale karşı etki göstermişlerdir. Uçucu yağların ABTS^{•+} serbest radikalini inhibe etme yüzdeleri şekil 14’de verilmiştir.

Şekil 14. 2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS^{•+}) sonuçları

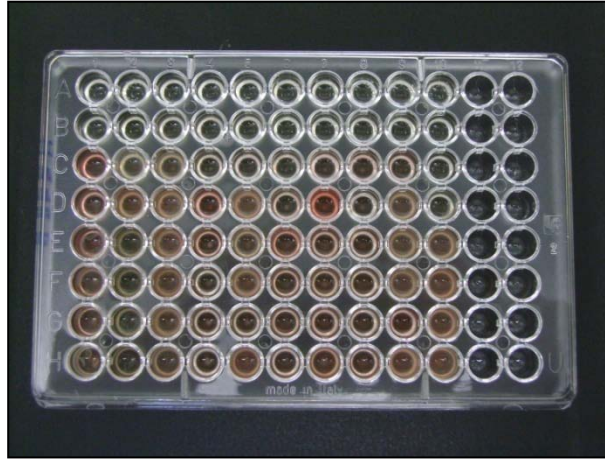


Uçucu Yağların Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Yapılan çalışmalarda Çizelge 3’de verilen *Mentha* bitki örneklerinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin araştırılmasında Mikrobrot Dilyasyon metodu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen değerler Çizelge 11’de verilmiştir.

Çizelge 11’de görüldüğü gibi standart maddeler olan kloramfenikol (antibakteriyel), ketokonazol (antifungal) ile karşılaştırıldıklarında tüm uçucu yağların kullanılan mikroorganizmalara karşı orta derecede etki gösterdikleri görülmüştür. Tüm uçucu yağların 250µg/ mL’den 2000 µg/ mL’ye kadar değişen konsantrasyonlarda etki gösterdiği bulunmuştur.

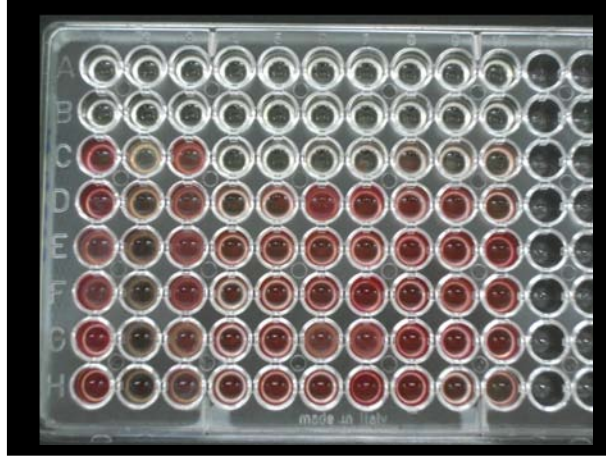
Özellikle MVN₁ kodlu Karadeniz Bölgesine ait *M. x villosa-nervata* bitkisinin uçucu yağı *Candida utilis*, *C. albicans*, türlerine karşı güçlü antikandidal etki gösterirken, MVN₂ kodlu Marmara Bölgesine ait *M. x villosa-nervata* bitkisinin uçucu yağı sadece *C. glabrata*’ya karşı güçlü antikandidal etki göstermiştir. Her iki bölgeye ait yağlar *C. tropicalis*’e karşı aynı oranda inhibisyon (MİK) göstermişlerdir.



Şekil 15. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile MVN₂ Kodlu Yağın Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü

M. x villosa-nervata’nın her iki bölgeye ait uçucu yağları bakteri türleri üzerinde 500 µg/mL-1000µg/ mL arasında etki göstermiştir. Fakat Karadeniz bölgesine ait *Mentha* bitkisinin uçucu yağı *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterileri üzerinde daha fazla etkili olmuştur. Diğer bakteriler üzerinde eşit etki göstermişlerdir.

MLTT₁ kodlu Karadeniz Bölgesine ait *M. longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides* bitkisinin uçucu yağı *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* bakteri türleri üzerinde MLTT₂ kodlu Marmara Bölgesine ait *M. longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides* bitkisinden daha fazla etki göstermiştir. Diğer bakteri türleri ve kandida türleri üzerinde hemen hemen aynı derecede inhibisyon (MİK) göstermişlerdir.

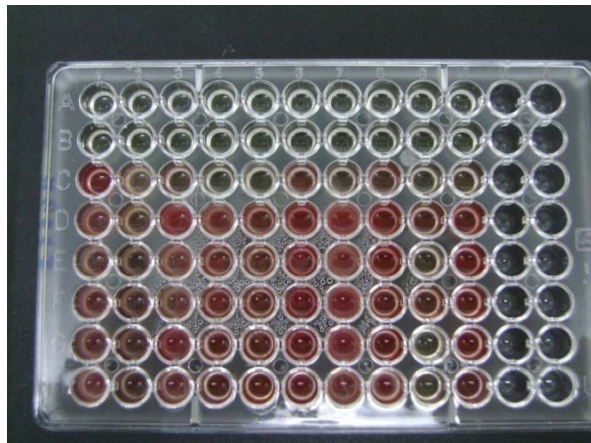


Şekil 16. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile MVN₁ Kodlu Yağın Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü

MSS kodlu *M. spicata* subsp. *spicata* bitkisinin uçucu yağı sadece *Candida albicans* üzerinde 250µg/ mL konsantrasyonda etki göstermiştir. Diğer kandida ve bakteri türleri üzerinde 1000µg/ml MİK değerine sahiptir.

MS kodlu *M. suaveolens*'in uçucu yağı *Candida albicans* ve *Candida utilis* üzerinde 250µg/ mL -500µg/ mL konsantrasyonları arasında etkili olmuştur. Diğer kandida ve bakteri türleri üzerinde 1000µg/ mL- 2000µg/ml ye kadar değişen MİK değerine sahip oldukları belirlenmiştir.

MP kodlu *M. pulegium*'un, *C. glabrata* üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlenirken, diğer türler üzerinde 500µg/mL-1000µg/mL'lik MİK değerine sahip olduğu görülmüştür. MST kodlu *M. spicata* subsp. *tomentosa* 500µg/mL-1000µg/mL arasında MİK değerine sahipken, Kandida türleri üzerinde daha fazla bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 17. Mikrodilüsyon Broth Tekniği ile MLTT₁ Kodlu Yağın Mikrotitrasyon Petrisindeki Görünümü

Çizelge 11. Uçucu Yağların Minimal İnhibe Edici Konsantrasyonları(MİK-µg/mL)

Mikroorganizma / Maddeler	MS	MP	MVN ₁	MLTT ₁	MSS	MLTT ₂	MST	MVN ₂	ST
<i>Escherichia coli</i>	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	1000	62.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	1000	31.25
<i>Salmonella typhimurium</i>	1000	500	1000	500	1000	1000	1000	500	500
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i>	1000	1000	1000	500	1000	500	1000	500	500
<i>Serratia marcescens</i>	2000	1000	500	1000	1000	1000	1000	500	500
<i>Candida utilis</i>	500	1000	250	500	1000	1000	1000	500	*31.25
<i>Candida tropicalis</i>	1000	1000	500	500	1000	500	500	500	*62.5
<i>Candida parapsilosis</i>	1000	1000	250	500	1000	500	1000	500	*125
<i>Candida albicans</i>	250	2000	250	1000	250	500	500	500	*500
<i>Candida glabrata</i>	1000	-	1000	500	1000	500	500	250	*1000

ST: Standart Antimikrobiyal Maddeler (Kloramfenikol, *Ketokonazol)

Uçucu Yağların Asetilkolinesteraz ve Butirikolinesteraz Enzim İnhibisyon Sonuçları

Çizelge 12. Enzim İnhibisyon Sonuçları IC₅₀ (µg.mL⁻¹)

BİTKİ ADI	YAĞ KODU	AChE	BuChE
<i>M. longifolia</i> subsp. <i>typhoides</i> var. <i>typhoides</i>	MLTT ₁	> 80	> 80
<i>M. x villosa-nervata</i>	MVN ₁	> 80	> 80
<i>M. pulegium</i>	MP	> 80	10.91 ± 4.11
<i>M. x villosa-nervata</i>	MVN ₂	> 80	> 80
<i>M. suaveolens</i>	MS	> 80	3.53
<i>M. spicata</i> subsp. <i>spicata</i>	MSS	> 80	> 80
<i>M. spicata</i> subsp. <i>tomentosa</i>	MST	> 80	> 80
<i>M. longifolia</i> subsp. <i>typhoides</i> var. <i>typhoides</i>	MLTT ₂	> 80	> 80

Uçucu yağların asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirikolinesteraz (BuChE) aktivitelerinin belirlenmesinde Ellman yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar standart inhibitör olan Galantamin ve bazı standart maddelerle birlikte Çizelge 12 ve Çizelge13’de IC₅₀ (µg/mL⁻¹) olarak verilmiştir.

Çizelge 13. Standart Maddelerin Enzim İnhibisyon Sonuçları IC₅₀ (µg.mL⁻¹)

Standart	AChE	BuChE
Pulegon	> 80	–
Linalol	> 80	> 80
(-) Limonen	13.83	–
(+) Limonen	> 80	–
Galanthamin	0.255± 0.005	8.1 ± 2.3

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Karadeniz Bölgesi ve özellikle de Marmara Bölgesinde doğal olarak yetişen bazı *Mentha* türlerinden (*Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides*, *M. suaveolens* Ehrh, *M. spicata* L. subsp. *spicata*, *M. spicata* L. subsp. *tomentosa*, *M. pulegium* L., *M. x villosa-nervata* Opiz.) uçucu yağ elde edilmesi için laboratuvarında Clevenger aparatında su distilasyonu işlemi yapıldı. Distilasyon sonucunda elde edilen uçucu yağlar, Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GK/KS) ve gaz kromatografisi (GK/FID) ile bileşiklerin analizi yapıldı. Bu analizler sonucunda; *M. longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides* (MLTT₁) linalol (90,4 %), (MLTT₂) izo-izopulegol (48.8 %) ve pulegon (30.4 %), *M. x villosa-nervata* (MVN₁) linalol (93.2 %), (MVN₂) *trans*-Piperiton oksit (76 %), *M. pulegium* (MP) piperiton (93 %), *M. suaveolens* (MS) piperitenon oksit (73.6 %), *M. spicata* subsp. *spicata* (MSS) karvon (63.6 %) ve *M. spicata* subsp. *tomentosa* (MST) *trans*-piperiton oksit (60.5 %) ana bileşikler olarak bulundu.

Mentha uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin araştırılmasında Mikrobroth Dilüsyon metodu kullanıldı ve yağlar standart maddeler olan kloramfenikol (antibakteriyel), ketokonazol (antifungal) ile karşılaştırıldı. Uçucu yağlar kandida türleri üzerinde bakteri türlerine oranla daha fazla etki gösterdi. Antibakteriyel etkide, *Salmonella typhimurium* türüne karşı MP, MLTT₁ ve MVN₂ kodlu *Mentha* türleri (500 µg.mL⁻¹), *Salmonella typhimurium*(MRSA) türüne karşı MLTT₁, MLTT₂ ve MVN₂ kodlu *Mentha* türleri (500 µg.mL⁻¹) ve *Serratia marcescens* türüne karşı MVN₁ ve MVN₂ kodlu *Mentha* türleri (500 µg.mL⁻¹) ile standart madde olan kloramfenikol (500 µg.mL⁻¹) ile aynı derecede etki gösterdi.

Antikandidal etkide ise, *Candida albicans* türüne karşı MS, MSS ve MVN₁ (250 µg.mL⁻¹) lik etki ile standart madde olan ketokonazol (500 µg.mL⁻¹), *C. glabrata* türüne karşı MVN₂ (250 µg.mL⁻¹), MLTT₁, MLTT₂ ve MST (500 µg.mL⁻¹) lik etki ile ketokonazol'e (1000 µg.mL⁻¹) karşı daha güçlü antikandidal aktivite gösterdiği bulundu.

Mentha uçucu yağlarına enzim inhibisyon deneyleri kapsamında asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BuChE) deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda, AChE(IC₅₀> 80 µg.mL⁻¹), standart madde olarak kullanılan Galantamin (IC₅₀= 0.255± 0.005 µg.mL⁻¹) olarak bulundu. Bu sonuca göre *Mentha* türlerine ait uçucu yağların asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkili bir inhibitör olmadığı bulundu. Bütirikolinesteraz aktivitede ise, MP (IC₅₀= 10.91 ± 4.11 µg.mL⁻¹) etki gösterirken, MS (IC₅₀ = 3.53 µg.mL⁻¹) uçucu yağının standart madde olarak kullanılan Galantamine (IC₅₀ = 8.1 ± 2.3µg.mL⁻¹) göre daha etkili olduğu bulundu.

Antioksidan aktivite, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin ve uçucu organik bileşiklerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β-karoten-linoleik asit sistemiyle belirlendi (Dapkevicus ve ark., 1998). Antioksidan kapasitesini ABTS^{•+} radikalini kullanarak, Troloks standardı eşitliğinde ölçen ABTS^{•+} metodu hidrojen verici ve serbest radikal zincirlerini kırıcı antioksidan maddelerin aktivitelerini belirlemede etkilidir (Mathew ve Abraham, 2006). Antioksidan özellikli maddeler tarafından elektron ve hidrojen atom transferi ile DPPH[•] radikalinin hidrazin türevlerine indirgenmesinde absorban düşmesi temeline dayanan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH[•])

radikalini süpürücü etkisi ile de incelenmiştir. İndirgeme gücünün belirlenmesinde, yağların Fe^{3+} - Fe^{2+} dönüşümü araştırılmıştır. Çünkü bir bileşiğin indirgeme kapasitesi o bileşiğin potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir belirteci olabilmektedir (Meir ve ark., 1995).

Uçucu yağların içerisindeki terpenler, terpenoitler, fenol türevi alifatik ve aromatik bileşikler *in-vitro* testlerde antioksidan etki göstermektedir. Bu bileşiklerin dağılımı uçucu yağ eldesi için kullanılan metodun çeşitliliğine göre farklılık göstermektedir. Hatta aynı metodlar kullanılsa bile, distilasyon parametrelerindeki en küçük bir değişiklik uçucu yağ kompozisyonunu etkileyecektir. Ne var ki bu durum *in-vivo* testlerde benzer sonuçlar vermemiştir. Uçucu yağlar *in-vivo* ortamda konsantrasyona ve doza bağlı olarak oksidasyonu tetikleyici etki ve beraberinde sitotoksik etkiler ortaya koymuştur. Uçucu yağların antioksidan etkileride daha ziyade içlerinde bulunan fenolik bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Kaldı ki bir uçucu yağın içerisinde onlarca bileşik olduğu düşünülürse antioksidan etkinin kesin olarak şu bileşikten dolayı meydana geldiğini söylemek çok doğru olmayacaktır. Burada dikkat edilmesi gereken bir diğer hususta meydana gelen antioksidan etkinin, uçucu yağın bileşiminde bulunan tek bir maddeden mi kaynaklandığı yoksa bulunan maddelerin sinerjik etkisinden mi kaynaklandığının bilinmemesidir. Böyle bir durumda hangi maddenin aktiviteden sorumlu olduğunu anlamak için tüm bileşiklerin ayrı ayrı kombinasyon hesaplarını yapılmasını ve tüm bileşiklerin tek tek denemesini gerekeceği için bu konu üzerinde çalışılması zaman ve emek isteyen bir hal oluşturur (Bakkali ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, antioksidan etkinin belirlenmesinde kesin sonuç veren bir metod yoktur. Aldığınız sonuçlar uyguladığınız metodlara göre farklılık gösterir. Örneğin rosmarinik asit kuvvetli bir antioksidan olarak bilinir, fakat β -Carotene Bleaching testinde rosmarinik asit kullanıldığı zaman zayıf etkili olarak bulunmuştur. Burada önemli olan antioksidan olarak incelenecek madde ile metoda kullanılan antioksidan sistemleri arasında kimyasal ve fizikokimyasal olarak benzerlik bulunan yöntemin seçilmesidir (Koleva ve ark., 2002).

Aynı uçucu yağın farklı modellerde farklı sonuçlar vermesi de olasıdır. Çünkü *in-vitro* ortamlarda yapılan bu tarz deneylerde deneyin gerçekleştiği ortamın koşulları sonuçları etkileyecektir (Huang ve ark., 1996). Bekli de DPPH deneyinde ortamın pH'ını *in-vivo* sistemlere benzetmek için kullanılan Tris-HCl tampon sisteminden dolayı yağlar antioksidan etki gösterememiş olabilir. Fakat ABTS deneyinde pH faktörü kullanılmadığı pozitif sonuç vermiş olabilir.

Son olarak, örneklerin antioksidan aktivitelerinin farklı yöntemlere göre doğrudan karşılaştırılmaması gerekmektedir. Bunun nedeni antioksidan aktivitesini ölçen tüm bu metodların farklı reaksiyonlara ve koşullara bağlı olmaları olarak açıklanabilir.

KAYNAKLAR

- Abu-Asab, S.M., Cantino, D.P., "Pollen morphology in subfamily Lamioidea (Labiatae) and its phylogenetic implications", advances in Labiatae science, In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors) Royal Botanic Gardens Press, Edinburg, Kew p:85-97 (1992).
- Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M., Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential oils against human pathogenic fungi, J. Agric. Food Chem, 46(5), 1739-1745 (1998).
- Agnihotri, V.K., Agarwal, S.G., Dhar, P.L., Thappa, R.K., Kapahi, B.K., Saxena, R.K., Qazi, G.N., Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. Flavour Fragr. J., 20(6), 607-610 (2005).
- Ağırgöl, B.A., Yılmaz, U., İşleten, F., Semerci, E., Kutsal, C., Correlation of serum butyrylcholinesterase activity with preoperative anxiety and lipid levels, Turkish J. Biochem., 33 (1), 9–13 (2008).
- Atta-Ur-Rahman, C.M.I., Thomsen, W.J., Bioassay techniques for drug development, 1.edition , Harpood Academic Publisher, Amsterdam, pp:142-145 (2001).
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils – A review, Food Chem. Toxicology (46), 446–475 (2008).
- Başer, K.H.C., Essential oils of anatolian Labiatae: A Profile, Acta Horticulturae, 333, 217-238 (1992).
- Başer, K.H.C., İlaç ve baharat bitkilerin, ilaç ve alkollü içki sanayilerinde kullanımı. İstanbul Ticaret Odası, Yayın No: 39, İstanbul (1997).
- Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Tarımcılar, G., Kaynak G., Essential oils of *Mentha* species from northern Turkey, J. Essent. oil Res., 11, 579-588 (1999).
- Başer, K.H.C., Uçucu yağlar ve aromaterapi, Fitomed, 7, 8-25 (2009).
- Baytop, T., Türkiye’de bitkiler ile tedavi, İstanbul Üniv. Yayınları, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 240-376 (1984).
- Baytop, T., Farmakognozi I, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 156-157 (1986).
- Baytop, T., Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu, Ankara No:578 (1992).
- Beşe, M., Mikrobiyolojide kullanılan antibiyotik duyarlılık ve deneme yöntemleri, Kardeşler Basımevi, İstanbul, 13-25 (1989).
- Bodur, E., Çokuğraş, A.N., Benzoyilkolin, indol-3-asetik asit ve insan serum butirilkolinesterazı etkileşimleri, Türk Biyokim. Der., 31 (4), 182-186 (2006).
- Burits, M., Bucar, F., Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytother. Res., 14, 323-328 (2000).
- Cantino, P.D., Harley, R.M., Wagstaff, S.J., Genera of Labiatae: Status and classification, Advanced in Labiatae Science (1992).

- Ceylan, A., Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ içerenler), 481, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, Bornova-İzmir, 1-5 (1987).
- Ceylan, A., Bayram, E., Kaya, N., Özay, N., Japon Nanesi (*Mentha arvensis* subsp. *haplocalix* x Briquet ar. *piperrascens* Holmes) üzerine agroteknik araştırma, E. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 28,2, 168-178 (1991).
- Çokuğraş, A.N., Butirilkolinesteraz yapısı ve fizyolojik önemi, T. Biyokimya Der., 28(2): 54-61 (2003).
- Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Island, Edinburg Univ. Press, Edinburg, Vol: 7, 384-394 (1982).
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linssen, P.H., Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania, J. Sci. Food Agric., 77, 140-146 (1998).
- Dorman, H.J.D., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R., Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars, J. Agric. Food. Chem., 51, 4563-4569 (2003).
- Ellialtıoğlu, Ş., Sevenger, S., Sezik, E., Şanlıurfa'da Nane tarımının geliştirilmesi üzerinde çalışmalar, Şanlıurfa GAP GİDEM Bilgilendirme Toplantısı, 8-9 Nisan, 1-16 (2007).
- Ellman, G.L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., Featherstone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95 (1961).
- Elof, J.N., A sensitive quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, Planta Med., 64, 711-713 (1998).
- Esen, G., *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* ıetswaart'un doğal ve kültür formlarından elde edilen uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri ve antimikrobiyal aktivite özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir (2005).
- Göger, F., *Salvia virgata* Jacq. ve *Salvia halophila* Hedge'nin antioksidan etkilerinin ve bileşimlerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2004).
- Gülçin, İ., Şat, İ.G., Beydemir, S., Elmastaş, M., and Küfrevioğlu, Ö.İ., Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) buds and Lavender (*Lavandula stoechas* L.), Food Chem., 87, 393-400 (2004).
- Gulluce, M., Şahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adigüzel, A., Ozkan, H., Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*, Food Chem., 103, 1449-1456 (2007).
- Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y., Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana Thonningia Sanguinea on Experimentally Induced Liver Injuries, G. Pharmacol., 32, 661-667 (1999).

- Hadacek, F., and Greger, H., Testing of antifungal natural products; methodologies, comparability of results assay choice, *Phytochem. Anal.*, 11, 137-147 (2000).
- Hedge, I.C., Labiatae of South-West Asia diversity, distribution and endemism, proceedings of the Royal Society of Edinburgh, *Electronic J. of Biotech.*, 89 B, 23-35 (1986).
- <http://www.eczders.anadolu.edu.tr> (22.06.2010).
- Huang, S.W., Frankel, E.N., Schwarz, K., and German, J.B., Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions *J. Agric. Food Chem.* 44, 2496-2502. (1996).
- İşcan, G., Bazı doğal aromatik maddelerin mikrobiyal transformasyonu ve biyolojik etkileri, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2009).
- İşcan, G., Umbelliferae familyasına ait bazı bitki türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2002).
- Kokkini, S., Papageorgiou, V.P., Constituent of essential oils from *Mentha x villosa-nervata* Opiz. growing wild in Greece, *Flav. and Frag. J.* 2, 119-121 (1987).
- Kokkini, S., Papageorgiou, V.P., Constituent of essential oils from *Mentha longifolia* growing wild in Greece, *Planta Med.*, 54, 59-60 (1998).
- Kokkini, S., Essential oils taxonomic markers in *Mentha*, *Advances in Labiatae Science*, pp. Royal Botanic Gardens Press, Edinburgh, R. 325-331 (1992).
- Kokkini, S., Karousou, R., Lanaras, T., Essential oils of spearmint (Carvone Rich) plants from the island of Crete (Greece), *Biochem.Syst. and Eco.*, Vol:23, No:4, 425-430 (1995).
- Koleva, I.I., Van Beek, A.T., Linssen, J.P.H., Grooti, A.D., Evstatieva, L.N., Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochem. Anal.* 13, 8-17 (2002).
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Winn W.C., *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, Lippincott-Raven Pub, Philadelphia, USA, 785-856 (1997).
- Lawrance, B.M., *Mint 'The Genus Mentha'*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 16-33 (2007).
- Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R., Canigüeral, S., Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4), 519-524 (2002).
- Mathew, S., and Abraham, T.E., Studies on the antioxidant activities of Cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models, *Food Chem.*, 94, 520-528 (2006).

- Meir, S., Kanner, J., Akin, B., Hadas, S. P., Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agr. Food. Chem.*, 43, 1813– 1815 (1995).
- Mitsuo, M., Hitomi, W., Kazuyasu, U., Hiromu, K., Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species, *J. Agric. Food. Chem.*, 46, 3431-3434 (1998).
- Nasrin, A., Yadollah, Y., Abbas H., Seied, M. P., Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil, *Talanta*, 62, 407-411 (2004).
- Oomah, B.D., and Mazza, G., Flavonoids and antioxidative activities in Buckweat, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1746-1750 (1996).
- Oumzil, H., Ghoulemi, S., Rhajaoui, M., Ilidrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faid, M., Benjouad, A., Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*, *Phytother. Res.*, 16, 727-731 (2002).
- Oyaizu, M., Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction, *Japanes J. Nutrition.*, 44, 307-315 (1986).
- Özel, A., Özgüven, M., Harran Ovası koşullarında farklı dikim zamanlarının bazı Nane (*Mentha spp.*) tiplerinin verim ve bazı tarımsal karakterlerine etkisi. *Turkish J. Agric. Forestry.*, 23, 921-928 (1999).
- Özgüven, G., Kırıcı, S., Farklı ekolojilerde Nane (*Mentha*) türlerinin verim ile uçucu yağ oran ve bileşenlerinin araştırılması, *Tr. J. Agric. and Forestry* 23, 465-472 (1999).
- Öztürk, B., Konyalıoğlu, S., Ertaş, H., Gökğünneç, L., Türkiye’de doğal yayılış gösteren bazı *Mentha* L. taxonlarının karşılaştırmalı uçucu yağ bileşenleri ve antioksidan etkileri, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir, 29-31 (2002).
- Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dieatry supplements, *J. Agr. Food. Chem.*, 53(8), 3110-3113 (2005).
- Sakar, M.K., Tanker, M., Fitokimyasal analizler tanım, miktar tayini ve izolasyon, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 67, Ankara, 181-190 (1991).
- Tanker, M., Tanker, N., Uçucu yağlar, *Farmakognozi Cilt 2*, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 269-297 (1985).
- Tanker, M., Tanker, N., *Farmakognozi Ders Kitabı*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 65, Ankara, 269-270 (1998).
- Tarımcılar, G., Kaynak, G., Karadeniz Bölgesi *Mentha* türleri ile ilgili kronolojik bir çalışma. *Botanik Dergisi*, 49-62 (1996).
- Telci, i., Farklı Nane (*Mentha spp.*) klonlarının bazı morfolojik tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma, Doktora Tezi, Gazi Osman Paşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat (2001).
- Türk Farmakopesi I, Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu, Sağlık Bakanlığı, Ankara, p. 118, (2004).

Vanden Berge, D.A., Vlietinck, A. J., Screening methods for antimicrobial and antiviral agents from higher plants, methods in plant biochemistry, Academic Press, London, England, 37-53 (1991).

Veliođlu, Y.S., Mazza, G., Oomah, B.D., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, J. Agric. Food Chem., 46, 4113-4117 (1998).

Yakar, N., ve Bilge, E., Genel Botanik, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, Gençlik Basımevi, İstanbul, 25-27 (1987).

Zeybek, N., Farmasötik Botanik, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:1, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 340-342 (1985).