

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

MENTHA LONGIFOLIA SUBSP. *NOEANA* BİTKİSİNDEN
ELDE EDİLEN BİLEŞİKLERİN YAPI TAYİNLERİ,
ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

ABDULSELAM ERTAŞ

DANIŞMAN
PROF.DR.UFUK KOLAK

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

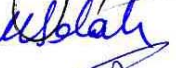
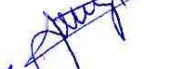
İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Abdulselam Ertaş tarafından hazırlanan *Mentha longifolia* subsp. *noeana* Bitkisinden Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri, Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

07 / 07 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Gülaçtı Topçu	İ.T.Ü.. Fen-Ed. Fak Organik Kimya A.D	
2.Prof. Dr. Ufuk Kolak (Tez Danışmanı)	İ. Ü. Ecz..Fak. Analitik Kimya A.D.	
3.Prof.Dr.Serap Sağlık Aslan (Tez İzleme Kom.)	İ. Ü. Ecz. Fak. Analitik Kimya A.D.	
4.Doç.Dr. Sevgi Tatar Ulu (Tez İzleme Kom.)	İ. Ü. Ecz. Fak. Analitik Kimya A.D	
5.Yard. Doç. Dr. Nurten Özsoy	İ. Ü. Ecz. Fak. Biyokimya A.D	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



ABDULSELAM ERTAŞ

İTHAF

Sevgili eşim Nurhan ve kızım Ela'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana engin hoşgörüsüyle rehber olan, beni akademik anlamda teşvik eden ve yönlendiren ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam Prof. Dr. Ufuk Kolak'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında her konuda fikir ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Araş. Gör. Mehmet Boğa'ya çok teşekkür ederim.

Tez bitkimi teşhis eden Araş. Gör. YeterYeşil'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3603

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyası	2
2.1.2. <i>Mentha</i> L. Cinsi.....	2
2.2. <i>Mentha</i> Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı	4
2.3. <i>Mentha</i> Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları.....	5
2.4. Terpenler	15
2.4.1. Dağılımları	15
2.4.2. Oluşumları.....	15
2.4.3. Terpenlerin Sınıflandırılmaları	16
2.4.3.1. Monoterpenler	18
2.4.3.2. Triterpenler.....	22
2.5. Flavonoidler	23
2.6. Fenolik Bileşikler	26
2.7. Steroitler.....	27
2.8. Yağ Asitleri	28
2.9. Antioksidanlar	29
2.9.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	32
2.9.1.1. Birincil Antioksidanlar	32
2.9.1.2. İkincil Antioksidanlar.....	35

2.9.2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	37
2.9.2.1. Folin Ciocalteu Fenol Reaktifıyla Toplam Fenolik Miktar Tayini Yöntemi	37
2.9.2.2. β -Karoten Renk Açılım Yöntemi	37
2.9.2.3. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi	37
2.9.2.4. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi	38
2.9.2.5. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) ..	38
2.9.2.6. FRAP Yöntemi (Demir (III) İyonu İndirgeme Gücü)	38
2.9.2.7. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi	38
2.9.2.8. Ferrisiyanür İndirgeme Gücü Yöntemi	39
2.9.2.9. TRAP Yöntemi (Toplam Radikal Tutma Parametresi)	39
2.9.2.10. Luminol Yöntemi (Kemilüminesans)	39
2.9.2.11. Diklorofloresin-Diasetat Yöntemi	40
2.9.2.12. ORAC Yöntemi (Oksijen Radikalini Absorplama Kapasitesi)	40
2.9.2.13. Siklik Voltametri Yöntemi	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Bitkisel Materyal	43
3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	43
3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	43
3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması	44
3.2.2.1. Toplam Fenolik Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	44
3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	44
3.2.2.3. β -Karoten Renk Açılım Yönteminde Kullanılan Çözelti	44
3.2.2.4. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan Çözelti	44
3.2.2.5. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	45
3.2.2.2. Antikolinesteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	45
3.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler	46
3.4. Ekstrelerin Hazırlanışı	47
3.6. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi	48
3.6.1. Toplam Fenolik İçeriklerinin Belirlenmesi	48
3.6.2. Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi	49
3.7. Antioksidan Tayin Yöntemleri	50
3.7.1. β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini)	50

3.7.2. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi	50
3.9. İstatistik Hesaplamalar	51
3.10. Kromatografik Yöntemler	52
3.10.1. Sütun Kromatografisi	52
3.10.2. İnce Tabaka Kromatografisi	52
3.10.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Çalışma Şartları	53
3.11. Spektroskopik Yöntemler	54
3.11.1. UV/Vis Spektroskopisi	54
3.11.2. Kayma Belirteçleri ile Flavonoitin UV Spektrumlarının Alınması	54
3.11.2.1. Sodyum Metoksit (NaOCH ₃) Belirteci ile UV Spektrumunun Alınması	54
3.11.2.2. Alüminyum Klorür/Hidrojen Klorür (AlCl ₃ /HCl) Belirteci ile UV Spektrumunun Alınması	55
3.11.2.3. Sodyum Asetat/Borik Asit (NaOAc/H ₃ BO ₃) Belirteci ile UV Spektrumunun Alınması	55
3.11.3. Infra-Red Spektroskopisi (IR)	55
3.11.4. Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)	55
3.11.5. Kütle Spektroskopisi	55
4. BULGULAR	56
4.1. Uçucu Yağ Analizi Sonuçları	56
4.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri Sonuçları	58
4.3. Ekstrelerin ve Uçucu Yağın Antioksidan Aktivite Sonuçları	58
4.3.1. β -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları	58
4.3.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları	59
4.4. Ekstrelerin ve Uçucu Yağın Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları	60
4.5. <i>M. longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin Kimyasal İçerikleri	61
4.5.1. <i>M. longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> Bitkisinin Petrol Eteri Ekstresinin (MLP) Fraksiyonlandırılması	61
4.5.1.2. MLP'den Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri	63
4.5.1.2.1. MLP-1: Uvaol	63
4.5.1.2.2. MLP-2: Stigmast-5-en-3 β -il format	68
4.5.1.2.3. MLP-3: Stigmast-5-en-3-on	73
4.5.1.2.4. MLP-4: β -Sitosterol	78

4.5.1.2.5. MLP-5: Nervonik Asit	81
4.5.2. <i>M. longifolia</i> subps. <i>noeana</i> 'nın Aseton Ekstresinin (MLA) Fraksiyonlandırılması.....	85
4.5.2.1. MLA'dan Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri	85
4.5.2.1.1. MLA-1: Ursolik Asit.....	85
4.5.2.1.2. MLA-2: Bis(2-Etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat	90
4.5.3. <i>M. longifolia</i> subps. <i>noeana</i> Bitkisinin Metanol Ekstresinin (MLM) Fraksiyonlandırılması.....	98
4.5.3.1. MLM'den Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri.....	98
4.5.3.1.1. MLM-1: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon	98
4.5.3.1.2. MLM-2: Palmitik Asit.....	103
4.5.3.1.3. MLM-3: <i>cis</i> -8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri.....	107
4.5. Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Tayin Sonuçları	111
5. TARTIŞMA	112
KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	131

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>Mentha</i> Cinsinin Taksonomik Olarak Sınıflandırılması	3
Tablo 2-2: <i>Mentha</i> Türleri ile Yapılan Uçucu Yağ ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları	5
Tablo 2-3: <i>Menhta</i> Türlerinden İzole Edilen Flavon Aglikonları.....	12
Tablo 2-4: Terpenlerin Sınıflandırılması	18
Tablo 2-5: Bitkisel Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	26
Tablo 2-6: Doğal Olarak Oluşan Δ^9 -Alkenoik Asitler.....	28
Tablo 2-7: Doğal Olarak Oluşan Δ^9 Haricindeki Diğer Doymamış Alkenoik Asitler ...	28
Tablo 2-8: Reaktif Oksijen ve Azot Türleri.....	29
Tablo 3-1: <i>M. longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> 'dan Elde Edilen Ekstreler ve % Verimleri.....	47
Tablo 4-1: Uçucu Yağ Analizi Sonuçları	57
Tablo 4-2: Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarları ^a	58
Tablo 4-3: Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları ^a	61
Tablo 4-4: Yağ Asidi Analizi Sonucu.....	62
Tablo 4-5: MLA-2' nin ¹³ C-NMR, HMQC ve HMBC Değerleri	91

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>Mentha longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> Bitkisinin Yetiştği Yerler	4
Şekil 2-2: İkincil Metabolitlerin Oluşumu.....	16
Şekil 2-3: Terpenlerin Oluşumu	17
Şekil 2-4: Doğada Çok Bulunan Monoterpen İskeletleri.....	19
Şekil 2-5: Asiklik Monoterpenler	20
Şekil 2-6: Monosiklik Monoterpenler.....	20
Şekil 2-7: Bisiklik Monoterpenler	21
Şekil 2-8: Trisiklik Monoterpenler	21
Şekil 2-9: Monoterpen Glikozitler.....	21
Şekil 2-10: Triterpen İskeletleri.....	22
Şekil 2-11: 2-Fenil Benzopiran.....	23
Şekil 2-12: Flavonoit İskeletleri	23
Şekil 2-13: Bant I ve Bant II'yi Veren Gruplar	24
Şekil 2-14: Steroitlerin İskelet Yapısı.....	27
Şekil 2-15: Birincil Antioksidanlar.....	35
Şekil 2-16: İkincil Antioksidanlar.....	36
Şekil 3-1: Pirokatekolün ölçü eğrisi.....	48
Şekil 3-2: Kersetinin ölçü eğrisi	49
Şekil 4-1: <i>M. longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin β -Karoten .	59
Şekil 4-2: <i>M. longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin DPPH	60
Şekil 4-3: Uvaol'un UV Spektrumu	64
Şekil 4-4: Uvaol'un IR Spektrumu.....	65
Şekil 4-5: Uvaol'un ^1H -NMR Spektrumu	66
Şekil 4-6: Uvaol'un ^{13}C -NMR (APT) Spektrumu	67
Şekil 4-7: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın UV Spektrumu.....	69
Şekil 4-8: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın IR Spektrumu.....	70
Şekil 4-9: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın ^1H -NMR Spektrumu	71
Şekil 4-10: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın ^{13}C -NMR Spektrumu	72
Şekil 4-11: Stigmast-5-en-3-on'un UV Spektrumu.....	74
Şekil 4-12: Stigmast-5-en-3-on'ın IR Spektrumu	75

Şekil 4-13: Stigmast-5-en-3-on'un ^1H -NMR Spektrumu	76
Şekil 4-14: Stigmast-5-en-3-on'un ^{13}C -NMR (APT) Spektrumu	77
Şekil 4-15: β -Sitosterol'un UV Spektrumu	79
Şekil 4-16: β -Sitosterol'un ^1H -NMR Spektrumu	80
Şekil 4-17: Nervonik Asit'in UV Spektrumu	82
Şekil 4-18: Nervonik Asit'in IR Spektrumu	83
Şekil 4-19: Nervonik Asit'in ^1H -NMR Spektrumu	84
Şekil 4-20: Ursolik Asit'in UV Spektrumu	86
Şekil 4-21: Ursolik Asit'in IR Spektrumu	87
Şekil 4-22: Ursolik Asit'in ^1H -NMR Spektrumu	88
Şekil 4-23: Ursolik Asit'in ^{13}C -NMR (APT) Spektrumu	89
Şekil 4-24: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın UV Spektrumu	92
Şekil 4-25: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın IR Spektrumu	93
Şekil 4-26: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın ^1H -NMR Spektrumu	94
Şekil 4-27: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın ^{13}C -NMR (APT) Spektrumu	95
Şekil 4-28: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın HMQC Spektrumu	96
Şekil 4-29: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın HMBC Spektrumu	97
Şekil 4-30: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon'un UV Spektrumu	99
Şekil 4-31: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon'un Kayma Belirteçleri ile Alınan UV Spektrumları	100
Şekil 4-32: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon'un IR Spektrumu	101
Şekil 4-33: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon'un ^1H -NMR Spektrumu	102
Şekil 4-34: Palmitik Asit'in UV Spektrumu	104
Şekil 4-35: Palmitik Asit'in IR Spektrumu	105
Şekil 4-36: Palmitik Asit'in ^1H -NMR Spektrumu	106
Şekil 4-37: <i>cis</i> -8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri'nin UV Spektrumu	108
Şekil 4-38: <i>cis</i> -8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri'nin IR Spektrumu	109
Şekil 4-39: <i>cis</i> -8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri'nin ^1H -NMR Spektrumu	110

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A [•]	: Antioksidan radikaller
ABTS	: 2,2'-Azinobis (3-etilbenzotrazolin-6-sülfonat)
AH	: Birincil antioksidanlar
APT	: Attached proton test
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DCFA-DA	: Diklorofloresin-diasetat
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
Ferrozin	: 3-(2-Piridil)-5,6-bis-(4-fenilsülfonik asit)-1,2,4-triazin monosodyum tuzu
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum coherence
IR	: Infrared spektroskopisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
MLP	: <i>Mentha longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> petrol eteri ekstresi
MLA	: <i>Mentha longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> aseton ekstresi
MLM	: <i>Mentha longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> metanol ekstresi
MLU	: <i>Mentha longifolia</i> subsp. <i>noeana</i> uçucu yağı
NADH	: Nikotinamitadenin dinükleotit

NBT	: Nitroblutetrazolyum
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
$O_2^{\bullet}$	: Süperoksit radikali
$OH^{\bullet}$	: Hidroksil radikali
ORAC	: Oksijen radikalini absorplama kapasitesi
PE	: Fikoeritrin
PEs	: Pirokatekole eşdeğer
PMS	: Fenazinmetasülfat
Q	: Kersetin
QEs	: Kersetine eşdeğer
$R^{\bullet}$	: Alkil radikalleri
$RO^{\bullet}$	: Alkoksi radikalleri
$ROO^{\bullet}$	: Peroksit radikalleri
ROOH	: Hidroperoksitler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
$RS^{\bullet}$	: Tiyl radikalleri
$RSO^{\bullet}$	: Sülfenil radikalleri
$RSO_2^{\bullet}$	: Tiyl peroksit radikalleri
s	: Saat
TMS	: Tetrametilsilan
TOC	: α -Tokoferol
TOSC	: Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi
TRAP	: Toplam radikal tutma parametresi
Tween-40	: Polioksietilensorbitan monopalmitat
UV	: Ultraviyole spektroskopisi

ÖZET

Ertaş, A. (2011). *Mentha longifolia* subsp. *noeana* Bitkisinden Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayinleri, Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu doktora tez çalışmasında, *Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildi. Bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan uçucu yağın GC/MS analizi sonucunda yirmi üç bileşeni belirlendi. Petrol eteri ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen yağ asidi karışımının GC/MS analizi sonucunda on dört bileşen içerdiği tespit edildi. Kromatografik yöntemler kullanılarak petrol eteri ekstresinden bir triterpen uvaol, üç steroid stigmast-5-en-3 β -il format, stigmast-5-en-3-on, β -sitosterol ve bir yağ asidi nervonik asit, aseton ekstresinden bir triterpen ursolik asit ve bir fenolik bileşik bis(2-etilhekzil) benzen-1,2-dikarboksilat, metanol ekstresinden bir flavon 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksi flavon, bir yağ asidi palmitik asit ve bir yağ asidi esteri *cis*-8,11,14-eikosatrienoik asit metil esteri elde edildi ve spektroskopik yöntemlerle yapıları aydınlatıldı. Ekstrelerin, uçucu yağın ve saf maddelerin antioksidan aktiviteleri β -karoten renk açılım ve DPPH serbest radikali giderim yöntemleri, antikolinesteraz aktiviteleri Ellman deneyi ile belirlendi.

Bu tez çalışması sonucunda, *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisinin uçucu yağ ve yağ asidi analizleri, petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının kimyasal içerikleri, antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri ilk kez bu tez çalışması ile incelendi. Ayrıca uvaol, stigmast-5-en-3 β -il format, stigmast-5-en-3-on, bis(2-etilhekzil) benzen-1,2-dikarboksilat ve *cis*-8,11,14-eikosatrienoik asit metil esteri *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi. Uvaol, stigmast-5-en-3 β -il format, stigmast-5-en-3-on, bis(2-etilhekzil) benzen-1,2-dikarboksilat ve 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksi flavon'un antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri, nervonik asit ve *cis*-8,11,14-eikosatrienoik asit metil esteri'nin antikolinesteraz aktiviteleri ilk kez incelendi. β -karoten renk açılım yönteminde 100 μ g/mL konsantrasyonda üç ekstre de yüksek antioksidan etki gösterdi. Uçucu yağın kuvvetli butirilkinesteraz inhibitörü olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Mentha longifolia* subsp. *noeana*, Lamiaceae, Biyoaktivite, Uçucu yağ, Sekonder Metabolitler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3603

ABSTRACT

Ertaş, A. (2011). Structure Elucidation and Determination of Antioxidant and Anticholinesterase Activities of the Isolated Compounds from *Mentha longifolia* subsp. *noeana*. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Ph.D. Thesis. İstanbul.

In this thesis, total phenolic and total flavonoid contents of the extracts from the aerial parts of *Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq. were determined as pyrocatechol and quercetin equivalents, respectively. The essential oil (twenty three components) and fatty acid (fourteen components) compositions were determined by GC/MS analyses. A triterpene uvaol, three steroids stigmast-5-en-3 β -il formate, stigmast-5-en-3-one, β -sitosterol and a fatty acid nervonic acid from the petroleum ether extract, a triterpene ursolic acid and a phenolic compound bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate from the acetone extract, a flavone (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxy flavone), a fatty acid palmitic acid and a fatty acid ester *cis*-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester from the methanol extract of the plant were isolated using chromatographic methods. Structure elucidation was determined using spectroscopic methods. The antioxidant activity was carried out by using the β -carotene bleaching and DPPH free radical scavenging activity methods, and the anticholinesterase activity by the Ellman assay.

In this thesis, the analysis of the essential oil and fatty acid, phytochemical investigation of the extracts with their antioxidant and anticholinesterase activities of the plant were determined for the first time. Uvaol, stigmast-5-en-3 β -il formate, stigmast-5-en-3-one, bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate and *cis*-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester were isolated for the first time from *Mentha* species. The antioxidant and anticholinesterase activities of uvaol, stigmast-5-en-3 β -il formate, stigmast-5-en-3-one, bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate and 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxy flavone, and the anticholinesterase effects of nervonic acid and *cis*-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester were determined for the first time. The extracts were exhibited moderate antioxidant activity at 100 μ g/mL in β -carotene bleaching method. The essential oil showed strong butyrylcholinesterase inhibitory activity.

Key Words: *Mentha longifolia* subsp. *noeana*, Lamiaceae, Bioactivity, Essential Oil, Secondary Metabolites

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No:3603

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada ve ülkemizde eski çağlardan beri halk arasında bitkilerle tedavi yapılmaktadır. Bitkilerin tedavi edici etkilerinin hangi maddelerden ileri geldiğini belirlemek amacıyla yapılan araştırmalar dikkat çekici bir hızla devam etmektedir. Tedavi amacıyla kullanılan birçok bitkinin içerdiği sekonder metabolitlerin saflaştırılarak yapılarının aydınlatılması, bunların farmakolojik ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi sonucunda çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan doğal kaynaklı ilaç etken maddeleri bulunmuştur. Sentetik ilaç etken maddelerine göre daha az yan etkiye sahip olan doğal kaynaklı maddeler daha çok tercih edilmektedir.

İnsan ömrünün uzamasıyla birlikte kronik hastalıkların artması (kanser, kalp-damar hastalıkları, Alzheimer, vb.) günümüzde antioksidanlara olan ilgiyi arttırmıştır. Bunun nedeni, antioksidan bakımından zengin gıdaların tüketilmesinin ve/veya doğal antioksidanların beslenme takviyesinde kullanılmalarının hücrel yaşlanmayı ve birçok kronik hastalığın oluşumunu geciktirdiğinin veya önlediğinin bilimsel olarak kanıtlanmış olmasıdır.

Ülkemizde yedi türle temsil edilen *Mentha* türleri, dünyada ve ülkemizde hem tedavi amacıyla hem de baharat olarak kullanılmaktadır. Özellikle uçucu yağ üzerinde çok sayıda çalışma yapılmış olan bu cins ile ilgili fitokimyasal araştırma sayısı oldukça sınırlıdır.

Bu doktora tez çalışmasında, daha önce çalışılmamış *Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarlarının tespit edilmesi, yine toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın GC/MS ile bileşiminin belirlenmesi, hem ekstraktların hem de uçucu yağın β -karoten renk açılım ve DPPH serbest radikali giderim yöntemleri kullanılarak antioksidan aktivitelerinin ve Ellman yöntemi ile antikolinesteraz aktivitelerinin tayin edilmesi, ekstraktlardan kromatografik yöntemler kullanılarak sekonder metabolitlerin saflaştırılması, saf maddelerin spektroskopik yöntemlerle yapılarının aydınlatılması ve aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Botanik Bilgiler

2.1.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyası

Bu familya bir ya da çok yıllık, genellikle salgı tüylü ve kokulu, otsu veya çalimsı bitkileri içermektedir. Gövde genellikle dört köşeli, yapraklar stipulasız, basit veya parçalı, karşılıklı çaprazdır. Çiçekler braktelerin koltuğunda yalancı vertisiller halinde, brakteler yapraklara benzer veya onlardan farklıdır. Korolla çoğunlukla iki dudaklıdır. Stamenler 4 veya 2 tanedir. Meyva 4 nukta yarılan bir şizokarptır (Davis 1982 pp.36). Bu familyada 200 cins ve 3500 tür bulunmaktadır (Baytop 1996 pp. 139). Türkiye'de doğal olarak yetişen 43 cins vardır. Lamiaceae bitkileri özellikle terpenoit bileşikler yönünden zengindir, ayrıca flavonoidler, uçucu yağlar, az da olsa kinoit yapıda maddelerle bazen basit alkaloidleri de taşırlar. Uçucu yağ, yaprak epiderması üzerindeki salgı tüylerinde bulunur. Başlı sekiz hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri bu familya için karakteristiktir Labiatae familyasındaki birçok türün hem süs bitkisi olarak hem de tıbbi özelliklerinden dolayı kültürü yapılır (Davis 1982 pp.36).

2.1.2. *Mentha* L. Cinsi

Nemli yerlerde yetişen çok yıllık nadiren tek yıllık bitkilerdir. Sürünücü rizomlara sahiptirler. Yapraklar basittir ve karakteristik güzel kokulu epidermal salgı tüyleri taşırlar. Çiçekler hermafrodit veya dişi organ aynı veya ayrı bitki üzerindedir. Kaliks aktinomorf veya sub-bilabiat, tubular veya kampanulat, 10-13 damarlı, 5 subekual veya ekual olmayan dişlidir. Korolla zayıfça iki dudaklı, subekual loblu, üsteki lob daha geniştir, genellikle emarginattır, tüb kaliksten daha kısadır. Stamenler 4 tanedir, dışa doğru üst dudakların altından yükselir. Meyveler küçük ve pürüzsüz, çukurcuklu, ağimsı veya az pürüzlüdür (Harley 1982 pp.384-385). Tablo 2-1'de *Mentha* cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması verildi (Telci 2001).

Tablo 2-1: *Mentha* Cinsinin Taksonomik Olarak Sınıflandırılması

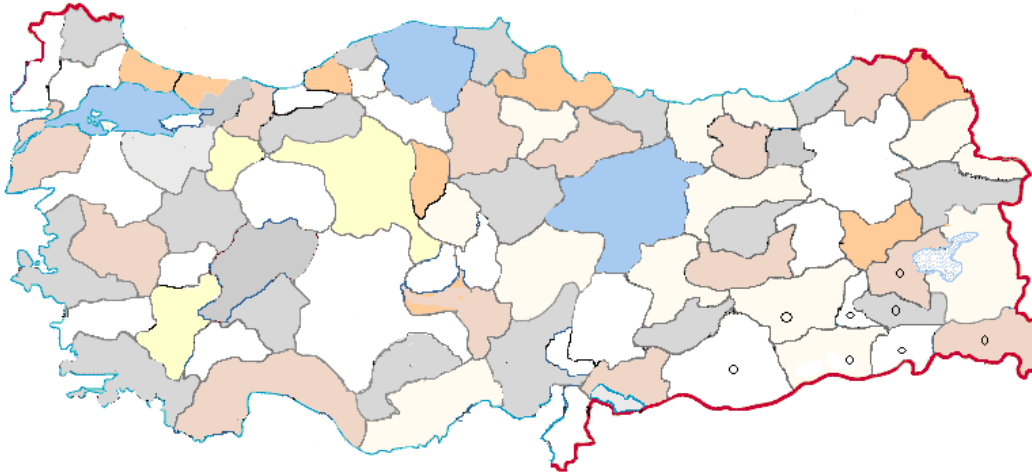
Divisio	Spermatopyta (Embryophyta)
Subdivisio	Angiospermae
Klassis	Dicotyledonae
Subklassis	Metachlamydeae (Sympetalae, Gamopetalae)
Ordo	Tubiflorae
Familya	Labiatae
Subfamilya	Nepetoideae
Tribüs	Mentheae
Cins	<i>Mentha</i> L.

Ülkemizde yetişen *Mentha* türleri şunlardır:

- *Mentha aquatica* L.
- *Mentha arvensis* L.
- *Mentha longifolia* (L.) Hudson
 - **M. longifolia* L. Hudson subsp. *longifolia*
 - * *M. longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley
 - * *M. longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides* var. *typhoides*
 - **M. longifolia* L. Hudson subsp. *typhoides* var. *calliantha* (Stapf) Briq.
 - **M. longifolia* L. Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq.
- *Mentha pulegium* L.
- *Mentha spicata* L.
 - **M. spicata* L. subsp. *spicata* L.
 - **M. spicata* L. subsp. *tomentosa* (Briq.) Harley
- *Mentha suaveolens* Ehrh.
- *Mentha x piperita* L.

2.1.3. *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq.

Tüylü, çok yıllık keskin kokulu bir türdür. Yapraklar petiolat, çiçeklerin gövdeleri 40-120 cm, yapraklar 25-30-90 × 10-32-40 mm'dir. Çiçekler beyazımsı sarı renklidir. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetişir (Davis 1982 pp. 388-391) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: *Mentha longifolia* subsp. *noeana* Bitkisinin Yetiştği Yerler

2.2. *Mentha* Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı

Mentha türleri (nane), ülkemizde ve dünyada hem tıbbi amaçla hem de baharat olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ülkemizde *Mentha piperita* L.'nin yapraklarından hazırlanan infüzyon bulantı kesici, gaz söktürücü ve koku verici olarak, *M. piperita*'nın çiçekli ve yapraklı dallarından elde edilen uçucu yağ koku verici, ferahlatıcı, antiseptik ve bulantı kesici olarak kullanılır (Baytop 1984 pp. 337-339).

Çin'de *M. haplocalyx* Briq.'in toprak üstü kısımları sindirim, solunum ve sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde halk arasında yaygın olarak kullanılmalarının yanı sıra gıda olarak da tüketilmektedir (She 2010 pp. 359).

Sudan ve Suudi Arabistan'da ticari olarak yetiştirilen *M. spicata* L. ve *M. longifolia* (L.) Huds. ssp. *schimperi* Briq. antispazmodik, karminatif, midevi ve baharat olarak kullanılmaktadır (Younis ve ark. 2004).

2.3. *Mentha* Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları

Dünyada uçucu yağ elde etmek için yaygın olarak *M. × piperita* L. (peppermint), *M. arvensis* L. (cornmint) ve *M. spicata* L. (spearmint) yetiştirilmektedir. *Mentha* türlerinden elde edilen uçucu yağ likör ve şekerleme endüstrisinde, baharat olarak, parfüm üretiminde ve tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Gulluce ve ark. 2007). *Mentha* türlerinden elde edilen uçucu yağlar üzerine yapılan çalışmalar Tablo 2-2 'de verildi.

Tablo 2-2: *Mentha* Türleri ile Yapılan Uçucu Yağ ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bitki Adı	Yetiştigi Yer	Uçucu Yağ Ana Bileşeni	Biyolojik Aktivite	Kaynaklar
<i>M. suaveolens</i> ssp. <i>suaveolens</i>	Korsika	Piperitenon (%73,5); piperitenon oksit (%72)		(Sutour ve ark. 2010)
<i>M. suaveolens</i> ssp. <i>insularis</i>	Korsika	Pulegon (%44,4); <i>cis-cis-p</i> -mentenolit (%27,3)		(Sutour ve ark. 2010)
<i>M. longifolia</i>	Tunus	Pulegon (%54,41)	Antioksidan	(Mkaddem ve ark. 2009)
<i>M. viridis</i>	Tunus	Karvon (%50,47)	Antioksidan	(Mkaddem ve ark. 2009)
<i>M. longifolia</i> ssp. <i>longifolia</i>	Muğla	-	Antimikrobiyal	(Sarac ve Uğur 2009)
<i>M. longifolia</i>	Muğla		Antimikrobiyal	(Sarac ve

<i>ssp. typhoides</i> <i>var. typhoides</i>		-		Uğur 2009)
<i>M. pulegium</i>	Muğla	-	Antimikrobiyal	(Sarac ve Uğur 2009)
<i>M. longifolia</i>	İran	Piperitenon oksit (çiçek: % 73.1, yaprak: %52.5)	-	(Kakhky ve ark. 2009)
<i>M. longifolia</i> <i>ssp. longifolia</i>	Tunus	Mentol (%32,5); menton (%28,8); pulegon (%17,8)	Antimikrobiyal	(Hajlaoui ve ark. 2008)
<i>M. arvensis</i>	Etyopya	-	Antimikrobiyal Antioksidan	(Getahun ve ark. 2007)
<i>M. longifolia</i>	Etyopya	-	Antimikrobiyal Antioksidan	(Getahun ve ark. 2007)
<i>M. piperita</i>	Etyopya	-	Antimikrobiyal Antioksidan	(Getahun ve ark. 2007)
<i>M. spicata</i>	Etyopya	-	Antimikrobiyal Antioksidan	(Getahun ve ark. 2007)
<i>M. longifolia</i>	Kırıkkale	Linalool (%37,8)	-	(Onar ve ark. 2007)
<i>M. longifolia</i> <i>ssp. longifolia</i>	Gümüşhane	<i>cis</i> -Piperiton epoksit (%18,4); pulegon (%15,5); piperitenon oksit (%14,7)	Antimikrobiyal Antioksidan	(Gulluce ve ark. 2007)
<i>M. longifolia</i> <i>ssp. polyadena</i>	Güney Afrika	Mentofuran (%51-62); piperitonon oksit (%15-66)	Antimikrobiyal	(Viljoen ve ark. 2006)

<i>M. longifolia</i> <i>ssp. capensis</i>	Güney Afrika	Menton (%50,9)	Antibakteriyal	(Oyedeki ve Afolayan 2006)
<i>M. longifolia</i>	Himalaya	Karvon (%61,12-78,70)	-	(Mathela ve ark. 2005)
<i>M. longifolia.</i> <i>ssp. schimperi</i>	Sudan	Karvon (%67,3)	-	(Younis ve Beshir 2004)
<i>M. spicata</i>	Sudan	Karvon (%78,9)	-	(Younis ve Beshir 2004)
<i>M. aquatica</i>		Menton; isomenton	Antimikrobiyal Antioksidan	(Mimica ve ark 2003)
<i>M. longifolia</i>		Menton; isomenton	Antimikrobiyal Antioksidan	(Mimica ve ark 2003)
<i>M. piperita</i>		1,8-Sineol	Antimikrobiyal Antioksidan	(Mimica ve ark 2003)
<i>M. longifolia</i>	İran	-	Antibakteriyal	(Shahverdi ve ark 2002)
<i>M. suaveolens</i>	Fas	Pulegon; piperitenon oksit; piperiton oksit	Antibakteriyal Antifungal	(Oumzil ve ark. 2002)
<i>M. longifolia</i>	Suudi Arabistan	Menton; mentol; pulegon; piperiton	-	(Al-Mutabagani ve ark.

2001)

<i>M. longifolia</i>	İran	Piperiton (% 43,9)	Antibakteriyal	(Rasooli ve Rezaei 2002)
<i>M. longifolia</i> var. <i>asiatica</i>	İran	Piperiton (yaprak % 67,6; çiçek piperiton %55,7)	-	(Jaimand ve Rezaee 2002)
<i>M. longifolia</i>	İran	Karvon (% 61,8)	-	(Monfared ve ark. 2002)
<i>M. longifolia</i>	Yugoslavya	Dihidrokarvon (46,49%)	-	(Matovc ve Lavadinovi c 1999)
<i>M. longifolia</i>	Ürdün	Piperitenon oksit (% 83,7)	-	(Abu-Al-Futuh ve ark. 2000)
<i>M. longifolia</i>	İran	Piperitenon oksit (% 23,5); β -karyofilen (% 23,2); piperiton oksit (% 17,5); germakren D (% 17,2)	-	(Nori-Shargh ve ark. 2000)
<i>M. longifolia</i> ssp. <i>schimperi</i>	Mısır	Piperitenon (21,57%); isoborneol (13,84%); 1,8-Sineol (11,63%)	Antimikrobiyal	(Soliman ve ark 1998)
<i>M. piperita</i>	Mısır	<i>L</i> -Menton (22,91%); <i>cis</i> -mirtanol (13,55%); mentofuran (13,34%)	Antimikrobiyal	(Soliman ve ark

1998)

<i>M.spicata</i>	Mısır	Pulegon (%42,54)	Antimikrobiyal	(Soliman ve ark. 1998)
<i>M. longifolia</i>	İsrail	1,8-Sineol (%26,4-34,5); menton (%10,0-16,7)	-	(Fleisher ve Fleisher 1998)
<i>M. longifolia</i> <i>ssp. petiolata</i>	Yunanistan	Piperiton oksit; <i>p</i> -mentan	-	(Karousou ve ark. 1998)
<i>M. × villosa-nervata</i>	Yunanistan	Piperiton oksit; <i>p</i> -mentan	-	(Karousou ve ark. 1998)
<i>M. longifolia</i>	Litvanya	Piperitenon oksit (% 44,2 ve % 57,2)	-	(Venskutonis 1996)
3 <i>Mentha</i> türü	Yugoslavya	Piperiton; linalool; mentol	-	(Dukic ve ark. 1991)
<i>M. longifolia</i> <i>ssp. himalaiensis</i>	Hindistan	<i>cis</i> -Piperiton oksit; piperitenon oksit	-	(Melkani ve ark. 1989)
<i>M. longifolia</i>	İsrail	1,8-Sineol (%28,77); piperiton (%13,87); <i>cis</i> -piperiton oksit (%15,36); piperitenon (%13,84)	-	(Fleisher ve Fleisher 1991)

<i>M. rotundifolia</i>		Piperitol (%57,6)	Merkezi Sistemi Aktivitesi	Sinir (Perez-Raya ve ark. 1990)
<i>M. longifolia</i>		Diofenol (%47,7); rotundifolon (%33,2)	Merkezi Sistemi Aktivitesi	Sinir (Perez-Raya ve ark. 1990)
<i>M. longifolia</i>		Piperiton oksit (% 3,75); limonen (%1,9)	-	(Souleles ve Argyriadou 1988)
<i>M. longifolia</i>	İtalya	Piperitenon oksit (%77,43)	-	(Maffei 1988)
<i>M. spicata ssp. longifolia</i>	Polonya	Dihidrokarvon	-	(Gora ve ark. 1975)
<i>M. longifolia</i> var. <i>mollissima</i>	İtalya	Piperiton (%51,23); piperitenon (%33,75)	-	(Calvarano ve Codignola 1974)
<i>M. aquatica-M. longifolia</i> F1 hibrit		Piperiton oksit (% 66)	-	(Murray ve Lincoln 1972)
<i>M. suaveolens</i> <i>ssp. suaveolens</i>	Korsika	Piperitenon oksit; piperitenon	-	(Sutour ve ark. 2010)
<i>M. suaveolens</i>	Korsika	Pulegon; <i>cis-cis-p</i> -mentenolit	-	(Sutour ve ark. 2010)

ssp. *insularis*

<i>M. longifolia</i>	Irak	-	Antimikrobiyal	(Al-Bayati 2009)
<i>M. longifolia</i>	Türkiye	-	Anticandidal	(Yigit ve ark. 2009)
<i>M. piperita</i>	Türkiye	-	Anticandidal	(Yigit ve ark. 2009)
<i>M. pulegium</i>	Hindistan	Pulegon (%65,9; %83,1)	-	(Agnihotri ve ark. 2004)
<i>M. pulegium</i>	İran	Pulegon (%37,8; %20,3)	-	(Nasrin ve ark. 2004).

M. longifolia'nın yaprak ve gövdesinden hazırlanan etanol ekstrelerinin yüksek fitotoksik aktiviteye, gövdesinden hazırlanan ekstrenin *Trichophyton longifusus* ve *Microsporum canis*'e karşı sırasıyla %75 ve %65 antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir (Khattak ve ark. 2004).

Fas'ta yetişen *M. longifolia*'dan hazırlanan etil asetat ekstresinin potansiyel anti-HIV etkiye sahip olduğu saptandı (Saaïd ve ark. 2003). Yine Fas'ta yetişen *M. longifolia*'dan beşi bilinen biri yeni (5,7,4'-trihidroksi-6,2',3'-trimetoksiflavon) olmak üzere altı flavonoit elde edilmiştir (Ghoulami ve ark. 2001).

M. longifolia'nın HPLC ile analizi sonucunda gallik asit, tanen, kafeik asit, ferulik asit, rutin, hesperidin, kumarin, luteolin, kersetin, kamferol ve apigenin içerdiği tespit edilmiştir (Tokhsyrova ve Popova 2009).

M. longifolia'nın metanol ekstresinden longifoamit A {6'-tetrakosenamit, (6'Z)-N-[2,3-dihidroksi-1-(hidroksimetil) oktadesil]} ve B {6'-tetrakosenamit, (6'Z)-N-[2,3,4-trihidroksi-1-(hidroksimetil) oktadesil]} adlı iki yeni bileşik elde edilmiştir (Ali ve ark. 2006).

Zaidi ve ark. (1998) *Menhta* türlerinden izole ettikleri flavon aglikonları Tablo 2-3 'de verildi.

Tablo 2-3: *Menhta* Türlerinden İzole Edilen Flavon Aglikonları

Bileşikler	<i>M. piperita</i>	<i>M. citrate</i>	<i>M. longifolia</i>	<i>M. spicata</i>	<i>M. aquatica</i>	<i>M. suaveolens</i>	<i>M. pulegium</i>
Thymonin	+	-	+	+	+	+	+
Thymusin	+	-	-	-	-	+	+
5,6-Dihidroksi-7,8,3'.4'- tetrametoksiflavon	-	-	-	-	-	+	-
Pebrellin	+	-	-	-	-	-	-
Jaceosidin	-	-	-	-	-	+	+
Hispidulin	-	-	-	-	-	+	-
Peetolarigenin	-	-	-	-	-	-	+
Ladanein	+	-	-	-	-	+	-
Sorbifolin	+	-	-	-	-	+	+
Pedalitin	-	-	-	-	-	-	+
5,6,4'-Trihidroksi-7,8- dimetoksiflavon	-	-	-	+	+	-	+
5,6-Dihidroksi-7,3'.4'- trimetoksiflavon	+	-	-	-	-	-	-
5-hidroksi-6,7,3'.4'- tetrametoksiflavon	-	-	-	-	-	-	+
Salvigenin	+	+	-	-	-	-	-
Nodifloretin	-	-	-	-	-	+	-
Xanthomierol	+	-	-	-	-	-	-
Gardenin B	+	+	-	-	-	-	-
Sideritoflavone	+	-	-	-	-	-	-
Gardenin D	+	-	-	-	-	-	-
5-O-Desmethylnobiletin	+	-	-	-	-	-	-
Apigenin	+	-	-	+	-	+	+
Acacetin	+	-	+	+	-	-	-
Luteolin	+	-	-	+	-	+	+
Diosmetin	-	-	-	+	-	-	-
Chrysoeriol	-	-	-	-	-	-	+

M. longifolia'nın etanol ekstresinin metanol ekstresine göre antimikrobiyal aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Etanol ekstresinden elde edilen flavonoidler: luteolin 7-*O*-glikozit, luteolin 7,3'-*O*-diglikozit, apigenin, kersetin 3-*O*-glikozit ve kamferol 3-*O*-glikozit (Akroum ve ark. 2009).

M. longifolia'nın uçucu yağından elde edilen (-)-mentolün antimikrobiyal aktivitesi patojenik ve patojenik olmayan 7 mikroorganizmaya (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans*) karşı test edildi. Disk difüzyon yönteminde, *P. aeruginosa* hariç test edilen bütün bakterilere karşı aktivite gösteren mentol, en yüksek aktiviteyi *S. mutans*'a karşı gösterdi. *C. albicans*'a karşı da iyi antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Al-Bayati 2009).

M. longifolia'dan yeni bir madde olan longifon (mentonun klorlu türevi), iki yeni β -sitosterol glikozit türevi olan longiside-A ve -B, ve yeni bir flavanon glikozit (longitin) elde edilmiştir (Ali ve ark. 2002).

Suudi Arabistan'da yetişen *M. longifolia*'nın toprak üstü kısımlarından 3 yeni flavonoid (trisetin 7-*O*-metileter 3'-*O*-glukozit 5'-*O*-ramnozit, trisetin 3'-*O*-glukozit 5'-*O*-ramnozit, trisetin 3'-*O*-ramnozil-(1 $\rightarrow$ 4)-ramnozit) ile 6 bilinen flavon glikozit (lucenin-1, luteolin 7-*O*-glukozit ve 7-*O*-neohesperidozit, isoorientin, vicienin-2) elde edilmiştir (Sharaf 1999).

Çin'de yetişen *M. spicata*'nın toprak üstü kısımlarından iki yeni lignan (spikatolignan A ve B) elde edilmiştir (Jian ve ark. 2007).

M. longifolia'nın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstresinden naringin (5,7,4'-trihidroksi 7-*O*-neohesperidozit) ve apigenin 7-*O*-glukozit ile birlikte çok sayıda metoksi grubu taşıyan iki flavon izole edildi. Ayrıca oleanolik asit ve fitalik asitin dioktil esteri elde edilmiştir (Al-Mutabagani ve ark. 2004).

M. longifolia'dan 5,8,4'-trihidroksi-6,7,3'-trimetoksiflavon isimli yeni bir flavonoid ve bilinen üç flavon mirisetin 4'-metil eter-3-*O*-ramnozit, 5-hidroksi-6,7,3',4'-

tetrametoksiflavon ve 5-hidroksi-7,8,2',3'-tetrametoksiflavon elde edilmiştir (Jahan ve ark. 2001).

M. longifolia'dan β -sitosterol, ursolik asit, luteolin, hesperetin 7-rutinozit ve 3'-hidroksi-4',5,6,7-tetrametoksiflavon izole edildi. Hesperetin 7-rutinozit asetat bileşiği ilk defa bu çalışmada elde edilmiştir (Al-Hazimi 1988).

M. longifolia'dan luteolin 7-glukozit, luteolin 7-rutinozit, luteolin 7-glukuronit, apigenin 7-glukuronit, akasetin 7-rutinozit, diosmetin 7-rutinozit, hesperetin 7-rutinozit, eriyodiktiyol 7-rutinozit, akasetin ve eriyodiktiyol izole edilmiştir (Bourwieg 1973).

M. longifolia'dan 7- β -(6-*O*-ramnopiranozil-*D*-glucopiranoziloksi)-5-hidroksikromon elde edilmiştir (Bourwieg ve ark. 1974).

M. haplocalyx'in toprak üstü kısımlarından biri yeni (*cis*-salvianolik asit J) ve yedisi bilinen (salvianolik asit J, litospermik asit, rosmarinik asit, litospermik asit B, magnezyum litospermat B, sodyum litospermat B, danşensu) polifenolik asitler elde edilmiştir (She ve ark. 2010).

Brezilya'da yetişen *M. villosa*'dan HPLC ile oniki triterpen izole edilmiştir (Monte ve ark. 1997).

M. villosa'dan yeni bir triterpenoit (metil 2 α ,3 β ,24-tri-*O*-asetilolean-12 α -kloro-28,13 β -olit) izole edilmiştir (Monte ve ark. 1998).

M. aquatica'nın etanol ekstresinden monoamin oksidaz inhibitörü olarak etki gösteren naringenin elde edilmiştir (Olsen ve ark. 2008)..

M. arvensis'in çiçeklerinden asetilkolinesteraz inhibitörü olarak etki gösteren linarin (akasetin-7-*O*- β -*D*-rutinozit) bileşiği elde edilmiştir (Oinonen ve ark. 2006).

M. arvensis'ten sitosterol- β -D-glukozit, *l*-mentil- β -D-glukozit, *l*-mentil-6'-O-asetil- β -D-glukozit, *lambda*-mentil- β -D-glukozit, 3-O- β -sitosteril-glukopiranozil-(1 α →2)-fruktofuranozit ve sukroz izole edilmiştir (Khan ve ark. 1997).

Voirin ve ark.'nın yaptıkları çalışmada *M. aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* ve *M. × piperita*'dan yirmi flavon elde edilmiştir (Voirin ve ark. 1999).

2.4. Terpenler

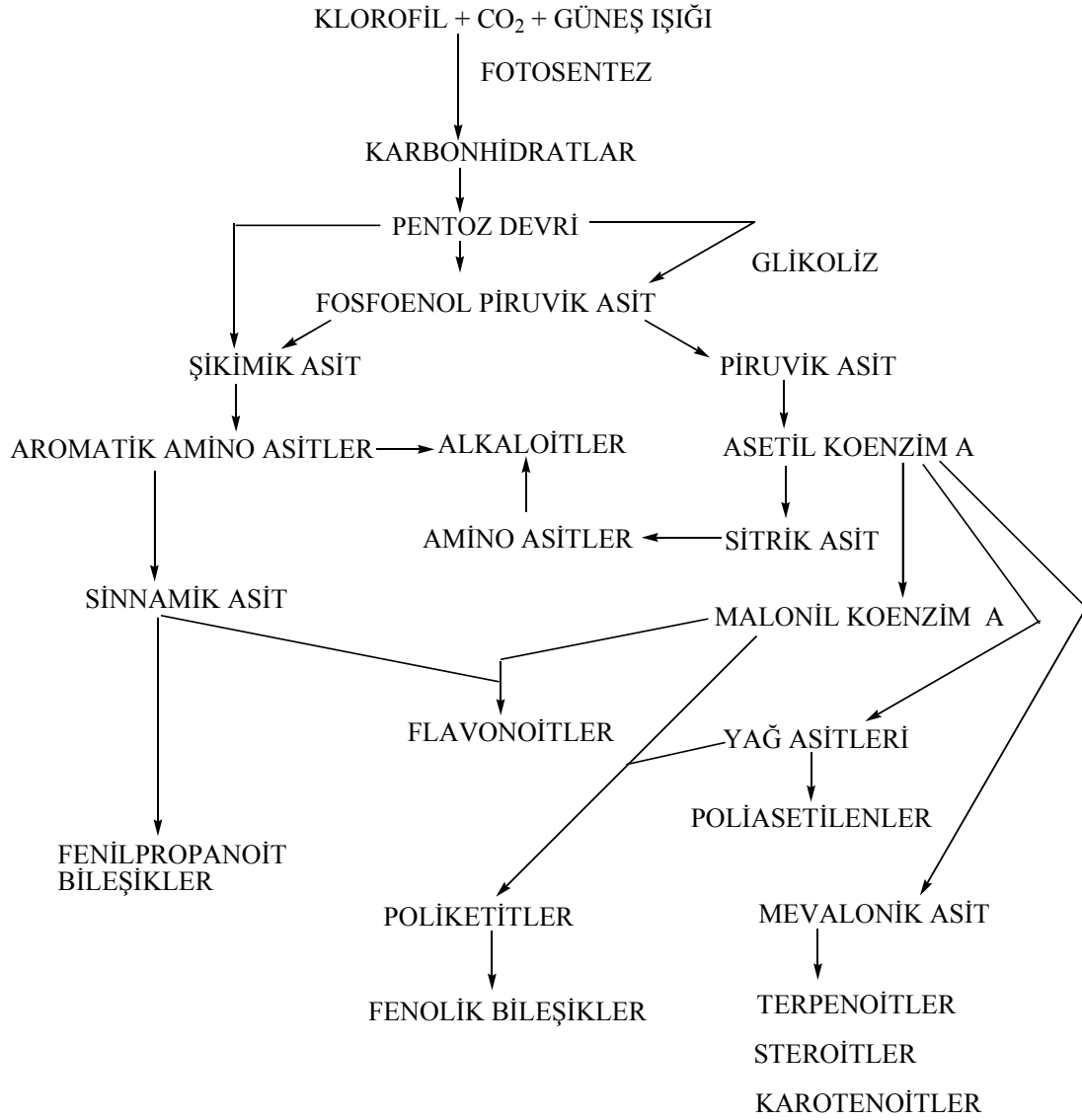
2.4.1. Dağılımları

Terpenler değişik yapısal özellikler gösteren ve yaygın olarak bulunan geniş doğal bileşikler sınıfıdır. Terpenler bitki dokularında genellikle serbest olarak, bazıları glikozitleri ya da organik asit esterleri halinde, bazıları da proteinlerle birleşmiş olarak bulunurlar. 10 ya da 15 karbonlu olan terpenler bitkilerden su buharı distilasyonu ile, daha fazla karbonlu olanlar ekstraksiyon yöntemleri ile ayrılırlar (Sönmez 1995).

2.4.2. Oluşumları

Terpenlerin ana iskeleti beş karbonlu izopren birimlerinden oluşur. Yapısında izopren birimi bulunan bileşiklere izoprene benzeyen anlamına gelen izoprenoit ismi verilir. İzopren birimini oluşturan mevalonik asitin başlangıç maddesi asetil koenzim A'dır (Tedder ve ark. 1972 pp. 219). Asetil coenzim A'nın ikincil metabolitlerin oluşumundaki rolü Şekil 2-2'de gösterildi. Mevalonik asitin 2 molekül ATP (adenozintrifosfat) ile fosforlanması sonucu mevalonik asit-5-pirofosfat oluşur. Mevalonik asit-5-pirofosfatın tersiyer OH grubunun fosforlanmasından sonra dekarboksilasyon ve dehidrasyon ile izopentil pirofosfat oluşur. İzopentil pirofosfatın enzim ile izomerizasyonu sonucu dimetilallil ester oluşur (Geissman ve Crout 1969 pp. 4, 217, 241, 291, 293, 300,305, 309). Bu iki izomerin kondenzasyonu geranil pirofosfatı oluşturur. Bu madde monoterpenleri verir. Geranil pirofosfatın izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu farnesil pirofosfatı oluşturur. Bu madde seskiterpenlerin geçiş bileşiğidir. Bu maddenin tekrar izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu geranil-geranil pirofosfatı verir. Geranil-geranil pirofosfat diterpenleri ve karotenoitleri oluşturur.

İzopentil, geranil ve farnesil pirofosfat moleküllerinin birbirleriyle değişik kondenzasyonları sonucu daha yüksek yapıları terpenler oluşur. Örneğin; triterpenler iki farnesil pirofosfatın, karotenoitler ise iki geranil-geranil pirofosfatın kondenzasyonu ile oluşmaktadır. Terpenlerin oluşumu Şekil 2-3'de gösterildi.

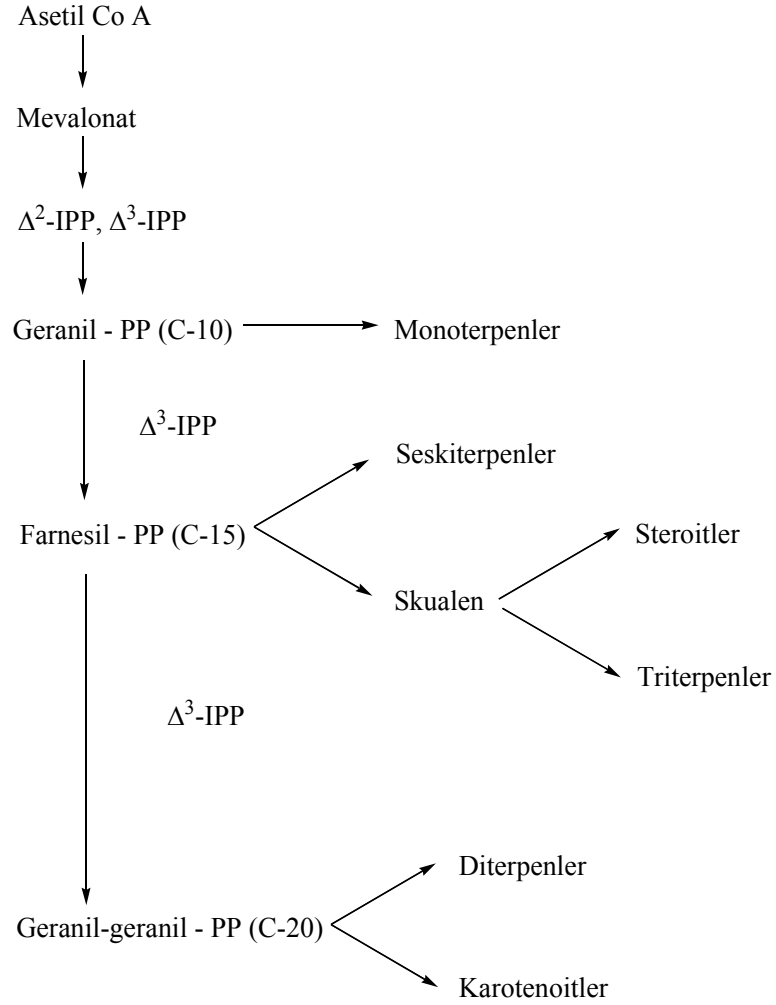


Şekil 2-2: İkincil Metabolitlerin Oluşumu

2.4.3. Terpenlerin Sınıflandırılmaları

İzopentil pirofosfat aktif bir olefin bileşiğidir. İzopentil pirofosfat moleküllerinden iki, üç, dört, beş, altı ve sekizi birleşerek açık zincirli ya da halkalı

terpenleri oluştururlar. Terpenlerin ana iskeletleri 5 karbonlu izopren (2-metil-1,3-butadien) moleküllerinden oluştuğundan sınıflandırılmaları izopren birimlerinin sayısına göre yapılır (Tablo 2-4). Ruzicka tarafından ortaya atılmış olan “İzopren Kuralına” göre bütün terpenlerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının birleşmesiyle oluşmuştur (Boiteau ve ark. 1964 pp. 3, 32, 184, 469).



Şekil 2-3: Terpenlerin Oluşumu

Terpenler fiziksel özelliklerine göre iki gruba ayrılırlar:

1. Uçucu Terpenler: Su buharı ile sürüklenebilen küçük moleküllü terpenlerdir ve uçucu yağlar olarak adlandırılırlar.

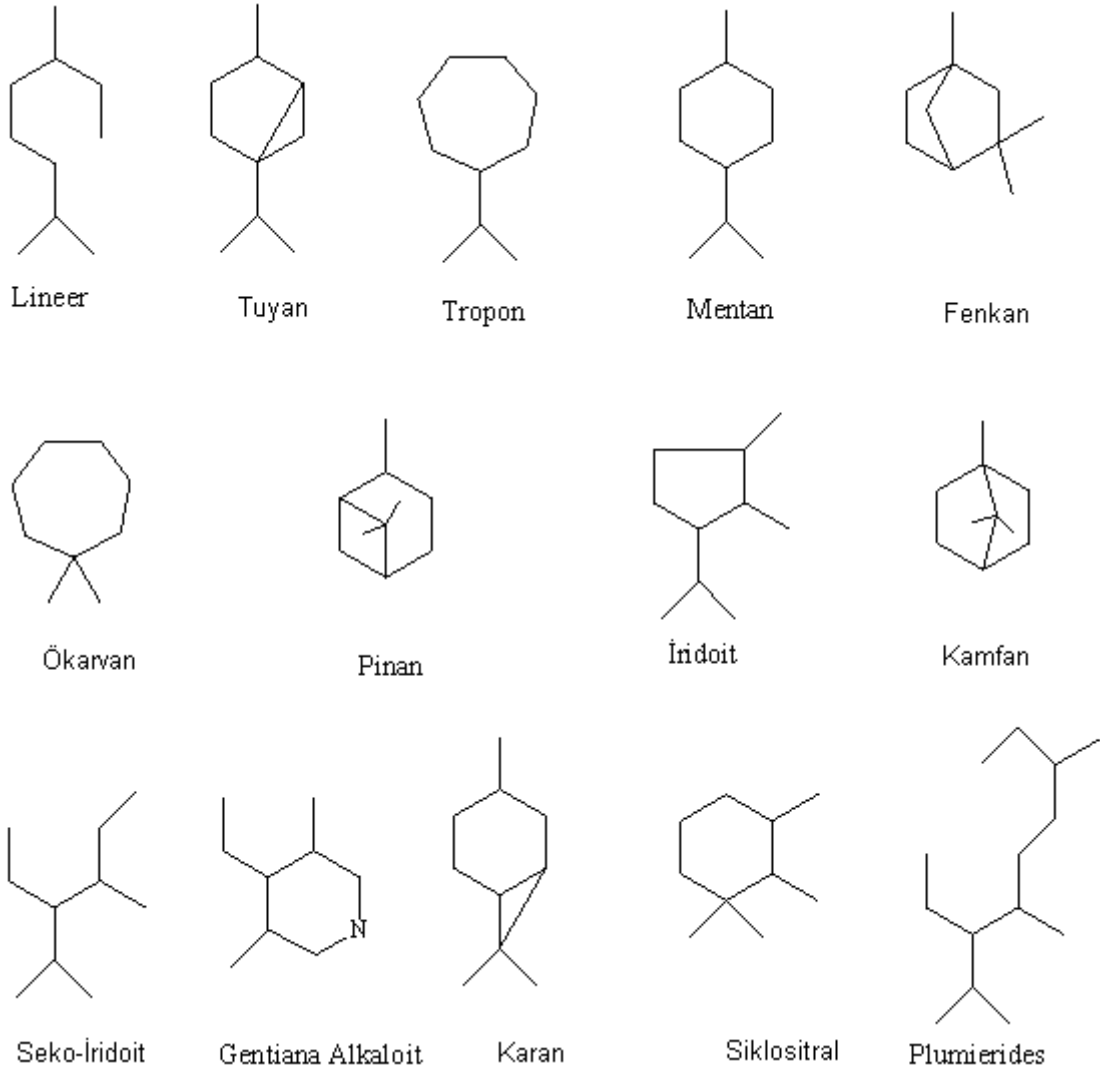
2. Uçucu Olmayan Terpenler: Büyük moleküllü terpenler; bazı seskiterpenler, diterpenler, sesterterpenler, triterpenler ve politerpenler.

Tablo 2-4: Terpenlerin Sınıflandırılması

İzopren Sayısı	Sınıfı	C Sayısı
1	Hemiterpenler	5 C
2	Monoterpenler	10 C
3	Seskiterpenler	15 C
4	Diterpenler	20 C
5	Sesterterpenler	25 C
6	Triterpenler	30 C
8	Tetraterpenler (Karotenoidler)	40 C
n	Politerpenler	(5 C) _n

2.4.3.1. Monoterpenler

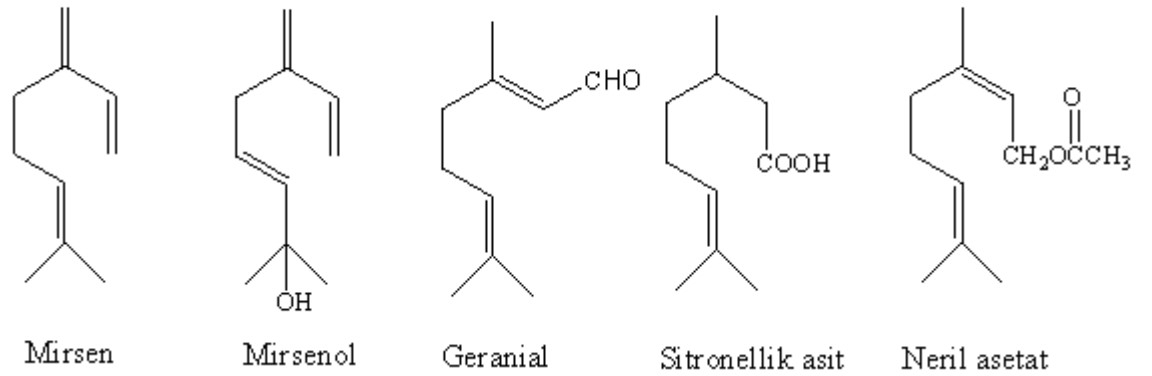
Monoterpenler 10 karbonlu olup bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan uçucu bileşiklerdir. Parfüm ve gıda maddelerinde koku verici olarak kullanılan monoterpenler antifungal, antibakteriyal, antioksidan ve antikanser etkilere sahiptirler. Monoterpenler taşıdıkları ana iskelete göre sınıflandırılırlar, doğada çok bulunan bazı monoterpen iskeletleri Şekil 2.4'te gösterildi (Devon ve Scott 1972 pp. 5-200).



Şekil 2-4: Doğada Çok Bulunan Monoterpen İskeletleri

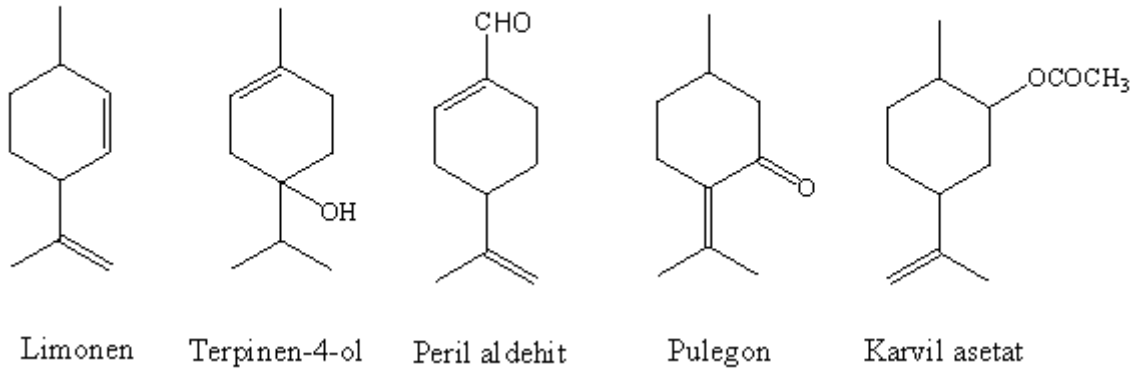
Monoterpenler başlıca 3 grup altında toplanabilir:

- ❖ Asiklik monoterpenler: Düz zincirlidirler, çifte bağ taşıyabilirler. Asimetrik karbon atomları nedeniyle optikçe aktiftirler. Hidrokarbonlarına mirsen, alkollerine mirsenol, aldehytlerine geranial, asitlerine sitronellik asit ve esterlerine neril asetat örnek olarak verilebilir (Şekil 2-5).



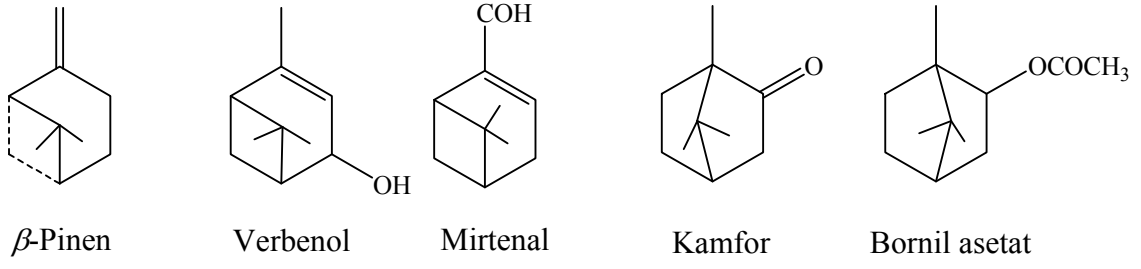
Şekil 2-5: Asiklik Monoterpenler

- ❖ Monosiklik monoterpenler: Çifte bağ ve bir halka taşırlar. Hidrokarbonlarına limonen, alkollerine terpinen-4-ol, aldehitlerine peril aldehit, ketonlarına pulegon, esterlerine karvil asetat örnek olarak verilebilir (Şekil 2-6).



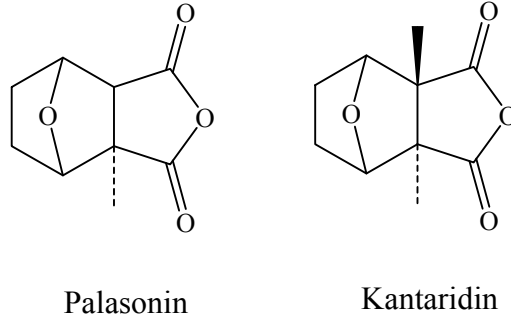
Şekil 2-6: Monosiklik Monoterpenler

- ❖ Bisiklik monoterpenler: İki halka ve çifte bağ taşırlar. Hidrokarbonlarına β -pinen, alkollerine verbenol, aldehitlerine mirtenal, ketonlarına kamfor, esterlerine bornil asetat örnek olarak verilebilir (Şekil 2-7).



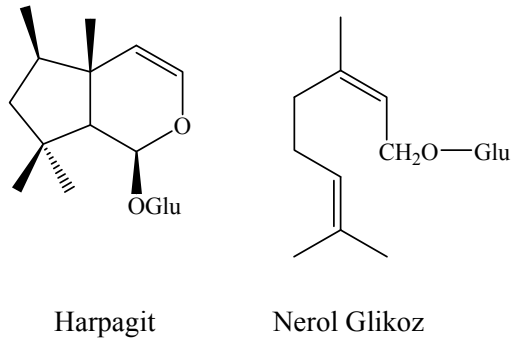
Şekil 2-7: Bisiklik Monoterpenler

- ❖ Trisiklik monoterpenler: Üç halka taşırlar, palasonin ve kantaridin örnek olarak verilebilir (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Trisiklik Monoterpenler

- ❖ Monoterpen glikozitlere örnek olarak harpagit ve nerol glikoz verilebilir (Şekil 2-9).

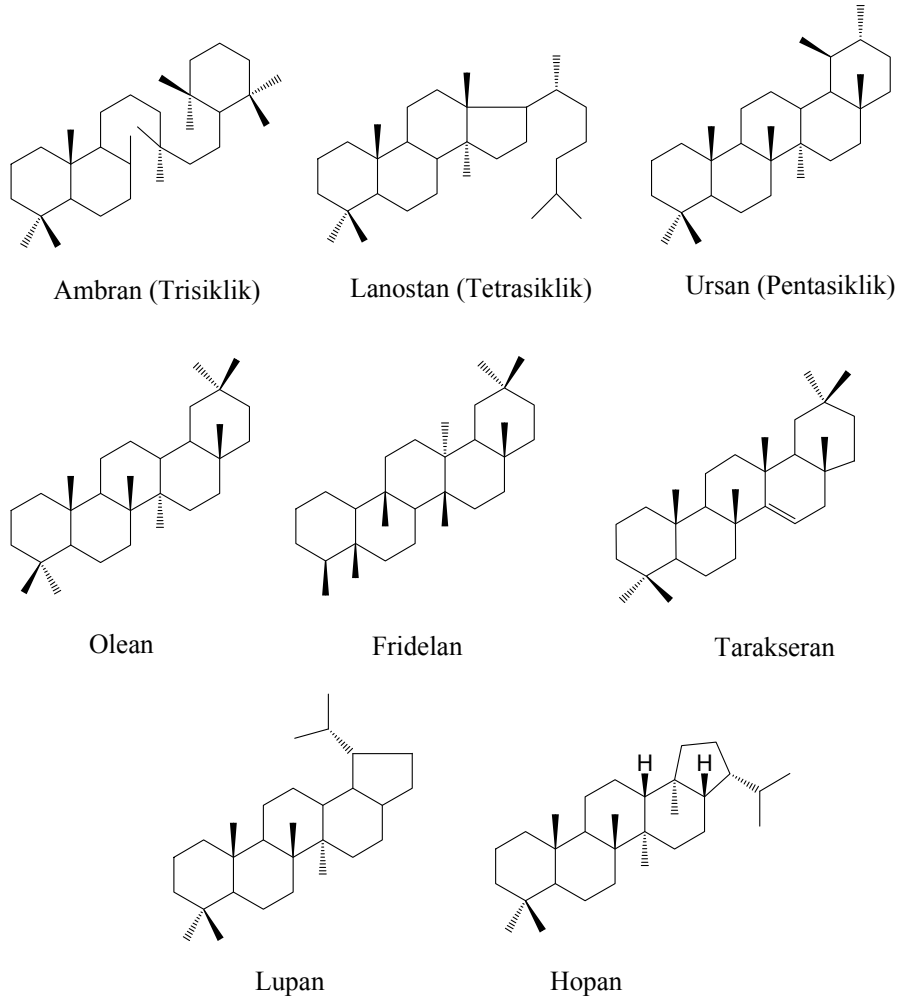


Şekil 2-9: Monoterpen Glikozitler

2.4.3.2. Triterpenler

Triterpenler altı izopren biriminden oluşmuş 30 karbonlu halkalı yapılardır. Bitkilerde serbest olarak bulunabildikleri gibi triterpenik saponinler olarak adlandırılan glikozitleri halinde de bulunabilirler. Serbest triterpenler, asit, alkol, aldehit, keton, epoksi ve lakton gruplarından bir ya da birkaçını bir arada taşıyabilirler. Doğal triterpenik bileşiklerin iskelet yapıları Şekil 2-10'de verildi. Taşıdıkları halka sayısı ve fonksiyonel gruplar da isimlendirmede etkindir. Triterpenler taşıdıkları halka sayılarına göre trisiklik, tetrasiklik ve pentasiklik olarak üç grupta toplanmaktadırlar. Hiç sübstitüent taşımazlarsa triterpen hidrokarbonlar olarak adlandırılırlar.

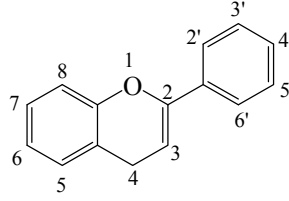
Triterpenlerin tanınmasında renk reaksiyonları önemlidir. Liebermann-Burchard en çok kullanılan renk reaksiyonudur. Mavi-yeşil renk triterpenlerin varlığını gösterirken, aynı reaksiyon steroidlerle yavaş yürür ve kıvılcık kahve bir renk verir (Boiteau ve ark. 1964 pp. 3, 32, 184, 469).



Şekil 2-10: Triterpen İskeletleri

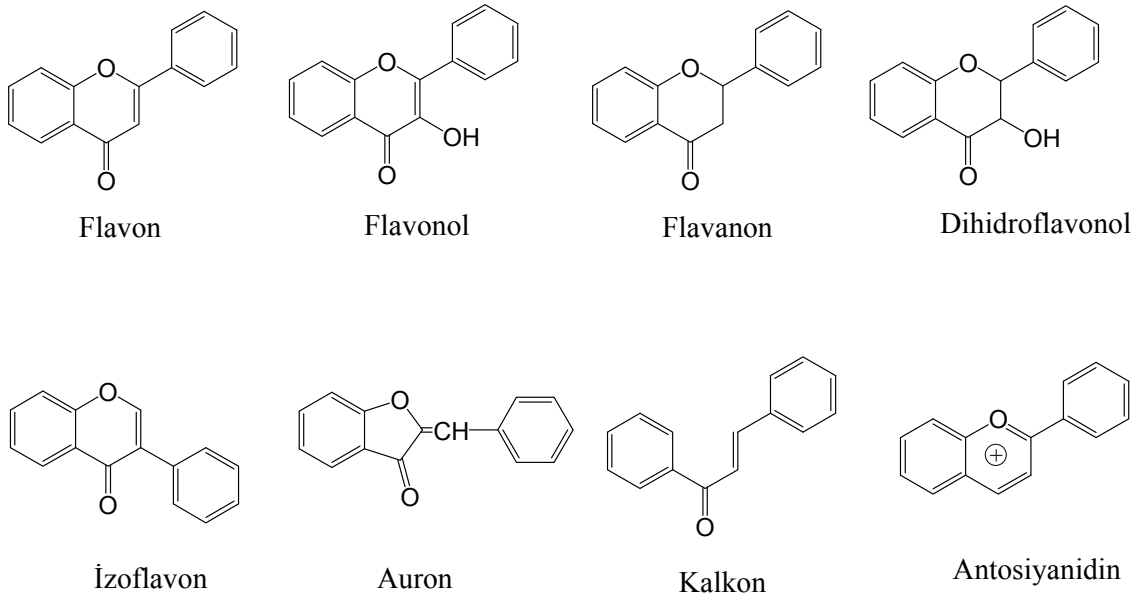
2.5. Flavonoitler

Flavonoitler 2-fenil benzopiran yapısındadır (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: 2-Fenil Benzopiran

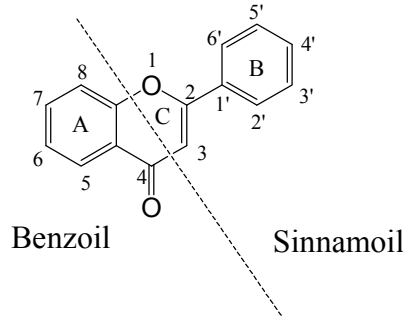
Flavonoitler bitkilerin fotosentezle oluşturdıkları ve hayati gereksinimleri için kullandıkları karbonhidrat, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türerler (Geissman ve Crout 1969 pp. 4, 217, 241, 291, 293, 300,305, 309). Biyosentez araştırmalarından elde edilen bulgulara göre fenil alanin gibi amino asitlerin enzimatik deaminasyonlarından oluşan sinamik asit türevleri malonil koenzim A ile kondanse olarak flavonoitleri oluştururlar. Karbon iskeleti $C_6-C_3-C_6$ şeklinde olan flavonoitlerin ana iskeletinde 15 karbon bulunur (Geissman ve Crout 1969 pp. 4, 217, 241, 291, 293, 300,305, 309, Harborne ve ark. 1975 pp.35-37, 865-867). Flavonoit iskeletleri Şekil 2-12'da gösterildi.



Şekil 2-12: Flavonoit İskeletleri

Flavonoitler glikozit halinde de bulunabilirler. Glikozitleşme eter bağı ile (*O*-glikozitler) ya da karbon bağları arasında (*C*-glikozitler) oluşur. *O*-glikozitlerin yapılarının aydınlatılmasında kimyasal ve enzimatik hidrolizden yararlanılır. Hidroliz sonucu şeker grubu aglikondan kopar ve hem aglikon hem de şeker grubunun yapıları belirlenir. Şekerin bağlı bulunduğu yeri saptamak için önce glikoziti metillemek, asetilemek veya trimetilsilillemek ve ardından hidrolizlemek gerekir. Serbest kalan hidroksil grubu şekerin bağlı olduğu yeri belirleyecektir. *C*-glikozitleri ise enzim ya da asit ile hidrolizlenmezler, şekerin yeri UV kaymaları ile saptanır (Mabry ve ark. 1970 pp. 258-273).

Flavonoitlerin UV spektrumunda, biri uzun diğeri ona göre daha kısa dalga boyunda olmak üzere iki absorpsiyon bandı gözlenir. Uzun dalga boyundaki banta Bant I adı verilir ve bu bant flavonoit yapısının B halkasıyla (sinnamoil grubu) ilişkilidir. Daha kısa dalga boyundaki bant Bant II olarak isimlendirilir ve flavonoit yapısının A halkası (benzoil grubu) ile ilişkilidir (Harborne ve ark. 1975 pp. 35-37, 865-867) (Şekil 2-13).



Şekil 2-13: Bant I ve Bant II'yi Veren Gruplar

Flavonoitlerin A ve B halkalarında hidroksil sayısı arttıkça bantlar uzun dalga boylarına kayarlar. Özellikle 3, 5 ve 4' konumlarındaki hidroksil grupları metillendikleri ya da glikozitlendiklerinde Bant I ve Bant II hidroksil grubu serbest olan bileşiğe göre daha kısa dalga boyuna kayar (Mabry ve ark. 1970 pp. 258-273).

Flavonlarda, Bant I 304–350 nm arasında, flavonollerde ise 3-OH grubu serbest ise 352–385 nm arasında, eğer hidroksil grubu serbest değilse 328–357 nm arasında izlenir. B halkasında oksijen fonksiyonunun artması Bant I'in, A halkasında 6 ile 8 konumunun oksidasyonu Bant II'nin daha uzun dalga boyuna kaymasına neden olur. Örneğin; 6-OCH₃ olduğunda Bant II 270-275 nm aralığında görülürken, 6-OH olduğunda 280-285 nm aralığında gözlenir. Flavon ve flavonollerde B halkasında 3' ve 4' konumlarında oksijenasyon söz konusu ise Bant II genellikle ikiye bölünür (Mabry ve ark. 1970 pp. 258-273).

UV kayma belirteçleri (sodyum metoksit, alüminyum klorür, seyreltik HCl, sodyum asetat, borik asit) ile alınan spektrumlar flavonoidlerin yapı tayininde önemli bilgiler verir.

Sodyum metoksit, flavon üzerindeki tüm hidroksil gruplarını iyonize eder. Sodyum metoksit ile alınan spektrumdaki Bant I, MeOH'de alınan spektrumdaki Bant I'den daha uzun dalga boyuna (~50-60 nm) kayarsa ve şiddeti artarsa 4' konumunda –OH grubunun bulunduğu anlaşılır.

Alüminyum klorür, A halkasında 3 ve 5 konumundaki serbest hidroksil grupları ve B halkasındaki *o*-dihidroksi grupları ile ayrı ayrı kelat oluşturur. Seyreltik HCl ilavesiyle B halkasındaki *o*-dihidroksi grupları ile oluşan kelat bozunur. Ayrıca, AlCl₃/HCl spektrumunda Bant I'in metanol spektrumundaki Bant I'e oranla 34-50 nm ileri kayması 5-OH ve 6-H olduğunu, 25-30 nm kayması 5-OH, 6-OH olduğunu, 16-25 nm ileri kayması 5-OH ve 6-OCH₃ olduğunu gösterir (Harborne ve ark. 1975 pp. 35-37, 865-867).

Sodyum asetat, sodyum metoksitten daha zayıf bir baz olduğu için asidik karakterdeki 3, 7 ve 4' hidroksillerini etkiler. Flavon ve flavonollerde 7 konumunda –OH grubu varsa Bant II 5–20 nm uzun dalga boyuna kayar. Ancak flavonlarda C–6 veya C–8'de oksijen fonksiyonu varsa bu durum görülmeyebilir. 4' konumunda –OH ve 7 konumunda metoksi veya şeker varsa Bant I, sodyum metoksit ile alınan spektrumdaki Bant I ile aynı dalga boyunda çıkar. Borik asit ilavesinde, flavon ve flavonollerde B halkasında *o*-dihidroksi grupları varsa bunlar borik asit ile kelat oluştururlar ve Bant I 12–30 nm daha uzun dalga boyuna kayar (Harborne ve ark. 1975 pp.:35-37, 865-867; Mabry ve ark. 1970 pp. 258-273).

2.6. Fenolik Bileşikler

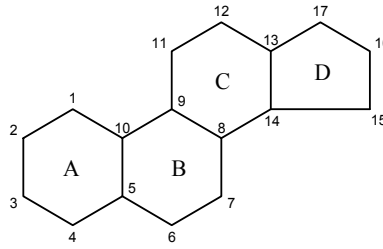
Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik bileşiklerdir. Bitkilerden 8000'in üzerinde fenolik bileşik elde edilmiştir (Geissman ve Crout 1969 pp. 137-166). Fenolik bileşikler iskeletlerindeki karbon atomu sayılarına göre sınıflandırılırlar (Tablo 2-5).

Tablo 2-5: Bitkisel Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

<u>C atomu</u>	<u>İskelet</u>	<u>Sınıf</u>	<u>Örnek</u>
6	C ₆	Basit fenoller	Hidrokinon
		Benzokinonlar	2,6-Dimetoksibenzokinon
7	C ₆ -C ₁	Fenolik asitler	Salisilik asit
8	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar	3-Asetil-6-OMe-benzaldehit
		Fenilasetik asitler	<i>p</i> -Hidroksifenilasetik asit
9	C ₆ -C ₃	Hidroksisinnamik asitler	Kafeik asit
		Fenilpropenler	Öjenol
		Kumarinler	Umbelliferon
		İzokumarinler	Bergenin
		Kromonlar	Öjenin
12	C ₆ -C ₄	Naftakinonlar	yuglon
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantonlar	Mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler	Lunularik asit
		Antrokinonlar	Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoitler	Kersetin
		İzoflavonoitler	Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanlar	Pinoresinol
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoitler	Amentoflavon
n	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninler	
	(C ₆) _n	Kateşol melaninleri	
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninlerle kondense olmuş flavonlar	

2.7. Steroitler

Bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları steroid sınıfı bileşiklerdir. Steroitlerin karakteristik halka yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir (Şekil 2-14).



Şekil 2-14: Steroitlerin İskelet Yapısı

Bitkisel steroidler genellikle, C-3'te OH, C-5'te çifte bağ, C-17'de yan zincir taşırlar. C-3'teki OH grubu, halkadaki metil gruplarıyla dik açı yaparsa A ve B halkaları *cis* şeklinde birleşmişlerdir. Bu konumdaki OH grubu β şeklindedir. OH grubu metil gruplarına paralel ise A ve B halkaları *trans* yapıda olup OH grubu α şeklindedir. Yan zincirin konfigürasyonu ise steroidlerde genellikle β şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* birleşirler (Cram ve Hammond 1964 pp. 671-673).

UV spektrumu steroidlerin yapı tayini için fazla bilgi vermez. Steroitlerin çifte bağları genel olarak izole durumdadır ve 200-210 nm aralığında kuvvetli bir uç absorpsiyon yaparlar. IR spektrumunda, hidroksil grupları 3000-3500 cm^{-1} 'de, alifatik C-H bağları 2850-2900 cm^{-1} 'de görülür. Parmak izi bölgesi karışık ve karakteristiktir. ^1H NMR spektrumunda, metil pikleri 0-1,5 ppm aralığında, metilen pikleri 1,5-2,5 ppm aralığında çıkar. Steroitlerde metilen pikleri çok karmaşık ve yaygındır. O nedenle metilen pikleri yerine metilen zarfı denilir. Hidroksil grubuna komşu hidrojenler 3,5-4,5 ppm'de, doymamışlık pikleri 5-6 ppm'de izlenir. Kütle spektrumunda $[\text{M}]^+$, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, ayrıca $[\text{M}-\text{yan zincir}]^+$ veya $[\text{M}-\text{D}+\text{yan zincir}]^+$ pikleri görülür.

2.8. Yağ Asitleri

Yağ asitleri uzun zincirli karboksilik asitlerdir. Doymuş ve doymamış yağ asitleri, gliserol (katı ve sıvı yağlar), uzun zincirli alkoller (vakslar), şeker türevleri (glikolipitler), ve bazı fosfor içeren moleküllerle (fosfolipitler) esterleşmiş olarak meydana gelirler. Doymamış yağ asitleri, hidroksi asitler, ketoasitler ve bu fonksiyonel gruplardan iki ya da daha fazlasını içeren asitler bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunurlar. Birçok doymamış yağ asidi bazı yapısal benzerliklere sahip olmalarına rağmen bunları sınıflandırmak oldukça zordur (Tablo 2-6, 2-7). (Geissman ve Crout 1969 pp. 66-67).

Tablo 2-6: Doğal Olarak Oluşan Δ^9 -Alkenoik Asitler

İsim	Yapı
Gadoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Oleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Palmitoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Miristoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Δ^9 -undesenoik	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Δ^9 -desenoik	$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Tablo 2-7: Doğal Olarak Oluşan Δ^9 Haricindeki Diğer Doymamış Alkenoik Asitler

Yaygın isim	Sistematik isim
Linderik	Δ^4 -dodesenoik asit
Lauroleik	Δ^5 -dodesenoik asit
Tsuzuik	Δ^4 -tetradesenoik asit
Petroselinik	Δ^6 -octadesenoik asit
Vaksenik	Δ^{11} -octadesenoik asit

2.9. Antioksidanlar

Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler (Papas 1996). Bu durum yaygın olarak “Oksidatif Stres” şeklinde ifade edilir. Oksidatif stresin baş sorumluları reaktif oksijen ve azot türleridir (Tablo 2-8) (Aruoma ve Cuppet 1997 pp. 241).

Tablo 2-8: Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Azot Türleri	
Radikaller	Radikal Olmayanlar	Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Azot Oksit ($NO^{\bullet}$)	Nitröz Asit (HNO_2)
Hidroksi ($HO^{\bullet}$)	Hipokloröz Asit ($HOCl$)	Azot Dioksit ($NO_2^{\bullet}$)	Nitrozil Katyonu (NO^+)
Peroksi ($RO_2^{\bullet}$)	Hipobromik Asit ($HOBr$)		Nitroksi Anyonu (NO^-)
Alkoksi ($RO^{\bullet}$)	Ozon (O_3)		Diazot Tetraoksit (N_2O_4)
Hidroperoksi ($HO_2^{\bullet}$)	Singlet Oksijen ($^1\Delta_g \text{ } ^1O_2$)		Diazot Trioksit (N_2O_3)
			Peroksinitrit ($ONOO^-$)
			Peroksinitröz Asit ($ONOOH$)
			Nitronyum Katyonu (NO_2^+)
			Alkilperoksi Nitritler ($ROONO$)

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda çeşitli şekillerde meydana gelirler:

- Hücrenin normal solunumu sırasında yan ürün olarak reaktif oksijen ve azot türleri oluşur.
- Süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, sitokrom P450 ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artabilir (Fridovich 1986; Halliwell 1994).
- Vücudumuz, doğal ve insan kaynaklı radyasyona maruz kalabilir. Yüksek enerjili elektromagnetik ışın, suyu parçalayabilir ve hidroksi radikali oluşturur (Von-Sonntag 1987).

Reaktif oksijen ve azot türleri dışarıdan da organizmaya alınabilirler. Sigara dumanının ana bileşiği $\text{NO}_2^\bullet$ 'dir. $\text{NO}_2^\bullet$ 'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesiyle karbon merkezli radikallerin oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı olarak serbest radikal üretimini artırmaktadır (Papas 1996).

Yabancı organizmalara karşı koruyucu görev yapan fagositler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eosinofiller) yabancı organizmayı öldürmek için süperoksit ve hidrojen peroksit üretirler. Bu önemli savunma sisteminin bozukluğu, doku hasarıyla sonuçlanan aşırı fagosit aktivitesinin eşlik ettiği romatoid artirit ve iltihaplı bağırsak hastalığı gibi bazı hastalıklara sebep olur (Moncada ve ark. 1991; Babior ve Woodman 1990; Anggard 1994).

Oksidasyon, radikalik zincir reaksiyonları üzerinden yürür. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparırlar. Bu özellikleri, radikallerin kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar ve bunların organizmadaki varlığı biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olur.

Reaktif oksijen ve azot türleri DNA bazlarını hasara uğratarak mutasyona sebep olur. $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Anggard 1994, Aruoma ve ark. 1989), $\text{OH}^\bullet$ (Takeuchi ve ark. 1994; Floyd ve ark. 1986), ve ONOO^- (Floyd ve ark. 1986; Yermilov ve ark. 1995). DNA hasarının sebebi olarak bilinir. DNA hasarı kanserden sorumlu olan baş faktördür (Guyton ve

Kensler 1993). Hücrede DNA tamir mekanizmaları mevcut olmasına rağmen bu mekanizmalar bazen yetersiz kalabilirler.

Antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç ve/veya gelişme basamağında önleyen veya geciktiren maddelerdir. Canlı organizmalarda antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için önemli bir ihtiyaçtır. Antimutajenik, antikarsinojenik, yaşlanmayı geciktirici gibi birçok etki canlılardaki antioksidan özellikteki maddelerden kaynaklanır (Cook ve Samman 1996). Antioksidan maddelerin eksikliğinde reaktif oksijen ve azot türleri kanser, diyabet, kireçlenme, parkinson, AIDS, beyin ve kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olurlar (Packer ve Cadenas 2002).

Doğal kaynaklı antioksidanlar, bitkilerde bulunan fenolik bileşikler (tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler), azotlu bileşikler (alkaloitler, klorofil türevleri, proteinler, aminler), organik asitler ve karotenoidlerdir (Larson 1988, Hudson 1990). Sistein, metiyonin, histidin, triptofan ve lizin (Taylor ve Richardson 1980) gibi aminoasitler ile sülfürlerce zengin olan tiyoredoksin (Buchanan ve ark. 1994) proteini de antioksidan özellik gösterirler.

Birçok epidemiyolojik çalışma bol meyve-sebze tüketiminin kalp-damar ve kanser hastalıklarını azalttığını ortaya koymuştur (Hertog ve ark. 1993; Stampfer ve ark. 1993). Sebze ve meyvelerin bu özellikleri içerdikleri antioksidan maddelere (askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler, flavonoidler) dayandırılmaktadır. Örneğin yeşil çay yaprakları (-)-epikateşin, (-)-epikateşin gallat, (-)-epigallocateşin ve (-)-epigallocateşin gallat içerirler (Amarowicz ve Shahidi 1996; Ho ve ark. 1997) ve antihipertansif (Henry ve Stephens-Larson 1984), antioksidatif (Ho ve ark. 1992), antiaterosklerotik (Hertog ve ark. 1993; Luo ve ark. 1997), antikarsinojenik (Luo ve ark. 1997; Wang ve ark. 1994) gibi etkilere sahiptirler. Kateşinler metal iyonlarını bağlayıcı ve oksijen radikalini tutucu antioksidanlar olarak tanınırlar (Husain ve ark. 1987; Chen ve ark. 1990).

Diğer taraftan sentetik antioksidanlar gıdaların bozunmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadırlar. Günümüzde BHA (bütillenmiş hidroksi-anisol), BHT (bütillenmiş hidroksitoluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*-bütillhidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdıkları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar vardır (Yamazaki ve ark. 2007; Tepe ve ark. 2007). Bu nedenle

doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidan maddelerin bulunmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu alanda yapılan araştırmalar artmıştır.

2.9.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

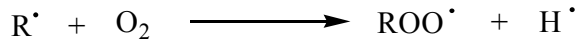
Antioksidanlar, reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Bazı antioksidanlar ise birden fazla aktivite mekanizması gösterirler ve bunlar çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılırlar (Reische ve ark. 2002).

2.9.1.1. Birincil Antioksidanlar

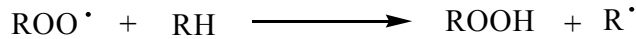
Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Bir lipit (alkil) radikali ($R^\bullet$) oluşturmak için, doymamış yağdan α -metilenik hidrojen ayrıldığında otooksidasyon başlar (Reische ve ark. 2002).



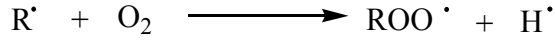
Oluşan lipit radikali çok reaktiftir, ilerleyen aşamalarda peroksi radikali ($ROO^\bullet$) oluşturmak için oksijenle reaksiyona girer (Reische ve ark. 2002).



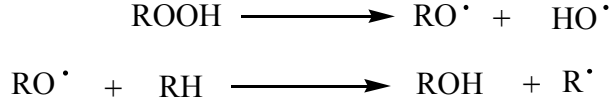
Reaksiyonun ilerleyen aşamalarında peroksi radikalleri lipitle reaksiyona girerek hidroperoksit ve yeni bir kararsız lipit radikali oluştururlar (Reische ve ark. 2002).



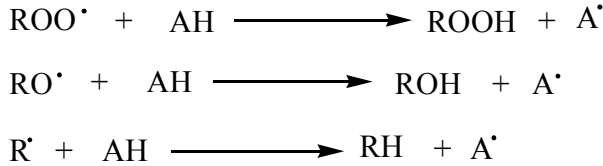
Daha sonra bu lipit radikali başka peroksi radikali oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girecektir. Bu oksidatif mekanizma kendiliğinden katalizlenir ve böylece otooksidasyon devam eder (Reische ve ark. 2002).



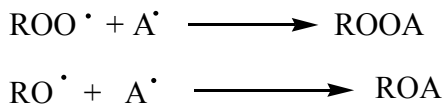
Hidroperoksitler (ROOH) kararsızdırlar ve bozunarak radikaller oluştururlar. Bu da reaksiyonun hızlanmasına neden olur (Reische ve ark. 2002).

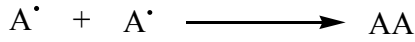


Birincil antioksidanlar (AH) lipid radikali ($R^{\bullet}$) ve peroksi radikalleriyle ($ROO^{\bullet}$) reaksiyona girerler ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birincil antioksidanlar lipid radikallerine hidrojen atomları verirler ve lipid türevleri ile antioksidan radikaller meydana getirirler ($A^{\bullet}$). Hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipidlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu yüzden otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi ($ROO^{\bullet}$) ve oksi ($RO^{\bullet}$) serbest radikalleri birincil antioksidanlar tarafından giderilirler. Antioksidanlar lipid radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler (Reische ve ark. 2002).



Hidrojenin verilmesiyle oluşan antioksidan radikali lipidlerle çok az reaksiyona girer. Oksijen veya lipidlerle antioksidan radikalinin reaksiyonu çok yavaş olduğundan reaksiyon hızı azalır. Kararlı rezonans hibritler oluşturmak için fenol halkasının çevresindeki ortaklanmamış elektronun delokalizasyonu ile antioksidan radikali kararlı hale getirilir. Antioksidan radikaller peroksi, oksi ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme yeteneğine sahiptirler (Reische ve ark. 2002).





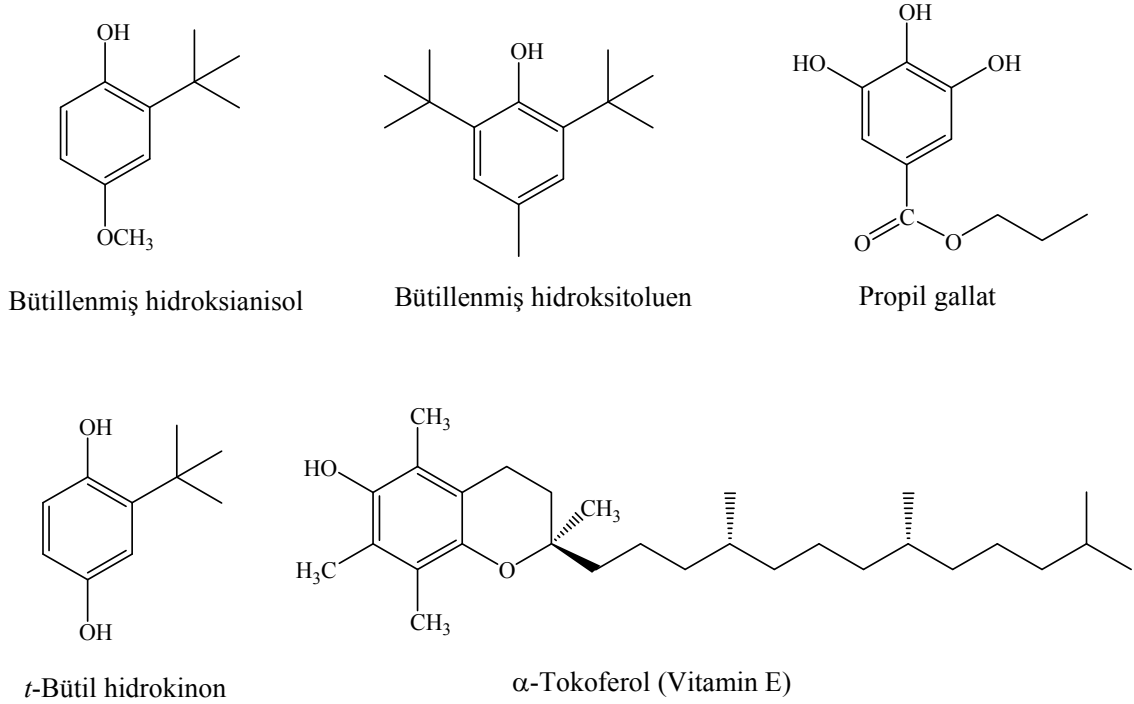
Katı ve sıvı yağlarda antioksidan dimerlerin oluşumu göze çarpar ve bu oluşum fenolik antioksidan radikallerin kolayca sonlandırma reaksiyonlarına uğradığını gösterir. Antioksidan dimerler, radikal olmayan şekillerinde ne kadar uzun süre kalırlarsa otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını o kadar etkili şekilde durdururlar (Reische ve ark. 2002).

Otooksidasyonun başlangıcından önce, antioksidanların tüketildiği ve serbest radikallerin olduğu indüksiyon zamanı olmalıdır. Bu yüzden birincil antioksidanlar, otooksidasyon basamakları meydana gelmeden oksidasyonun indüksiyon ve başlangıç aşamalarında ilave edilirlse daha etkili olurlar (Reische ve ark. 2002).

Radikal gidermeye ilaveten birincil antioksidanlar, hidroperoksitleri hidroksi bileşiklerine indirgeyebilirler. Bununla beraber birincil antioksidanların esas antioksidatif mekanizması radikal gidermedir (Reische ve ark. 2002).

Birincil antioksidanlar, çeşitli halka sübstitüsyonlarına sahip mono veya polihidroksi fenollerdir. Fenoldeki hidroksil grubuna göre orto ve para konumuna elektron veren grupların sübstitüsyonundan oluşan indüktif etki bileşiğin antioksidan aktivitesini artırır. Fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu arttırarak onun reaktifliğini azaltır. Hidroksil grubuna göre para konumunda etil veya bütül grupların sübstitüsyonu, antioksidan aktiviteyi artırır. Bununla beraber sterik engelleme nedeniyle para pozisyonlardaki uzun zincir veya dallanmış alkil gruplarının varlığı antioksidan etkiyi azaltabilir. Orto pozisyonlardaki dallanmış alkil gruplarının sübstitüsyonları kararlı rezonans yapılar oluşturarak fenolik antioksidanın etkisini arttırırlar ve antioksidan radikalının reaksiyonlara katılma yeteneğini azaltırlar.

Sentetik birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat ve *t*-bütül hidrokinon verilebilir (Şekil 2-15). Tokoferoller ve karotenoitler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır.



Şekil 2-15: Birincil Antioksidanlar

2.9.1.2. İkincil Antioksidanlar

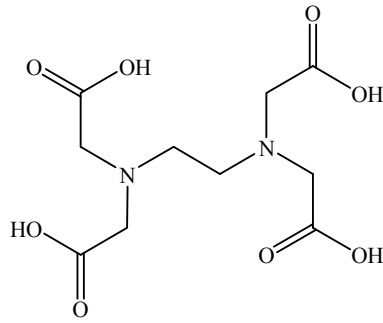
İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar, fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metallerle kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar, genellikle birincil antioksidanların aktivitesini arttırırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve β -karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Şekil 2-16).

İkincil antioksidanlar en önemli etki mekanizmalarına göre başlıca üç gruba ayrılabilirler.

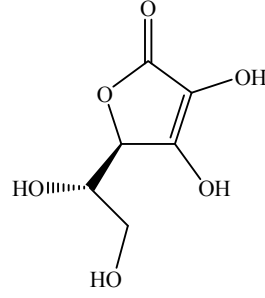
a) Kelat Yapıcılar: Sitrik asit, fosforik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tartarik asit.

b) Oksijen Gidericiler ve İndirgeme Ajanları: Askorbik asit, askorbil palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbat, sülfidler.

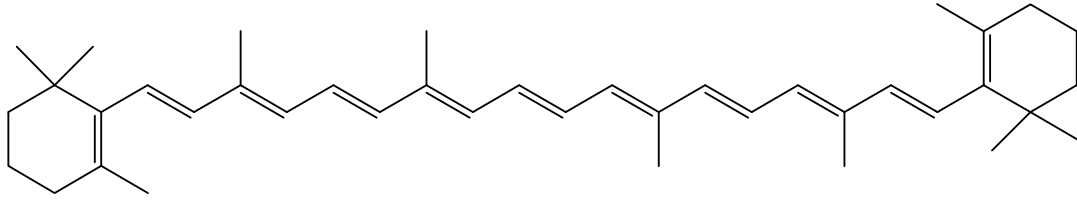
c) Singlet Oksijen Gidericiler: Karotenoitler (β -Karoten, likopen ve lutein)



Etilendiamintetraasetikası (EDTA)



Askorbik asit

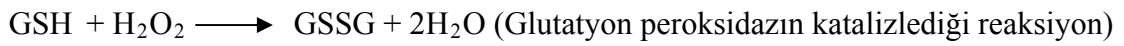


β -Karoten (A vitamini)

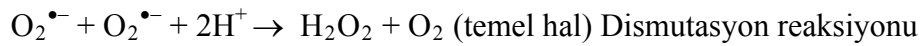
Şekil 2-16: İkincil Antioksidanlar

Antioksidanlar, enzimler (Katalaz, Glutasyon peroksidaz, Süperoksit Dismutaz (SOD), doğal kaynaklı ve sentetik antioksidanlar olarak da sınıflandırılabilirler (Halliwell ve Gutteridge 1989).

Katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasında görev alırlar.



SOD, dismutasyon reaksiyonunu katalizler ve süperoksidin uzaklaştırılmasını sağlar;



2.9.2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

2.9.2.1. Folin Ciocalteu Fenol Reaktifiyle Toplam Fenolik Miktar Tayini Yöntemi

Fenolik bileşikler, Folin Ciocalteu Fenol Reaktifi ile sadece alkali ortamda reaksiyon verdiklerinden sodyum karbonat ile ortamın pH'sı yaklaşık 10'a ayarlanır. Fenolik antioksidanların varlığında Mo(VI)'in indirgenmesiyle renk sarıdan maviye döner. Oda şartlarında 2 saat kadar bekletildikten sonra absorbans 760 nm dalga boyunda ölçülür. Bu yöntem toplam fenolik miktarı için geliştirilmiştir (Slinkard ve Singleton 1977; Singleton ve ark. 1999).

2.9.2.2. β -Karoten Renk Açılım Yöntemi

Oksijen ile doyurulmuş suya linoleik asit ve β -karoten koyulur. Linoleik asitten oluşan radikaller ($\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OR}$, $\cdot\text{OOR}$, vs.), 490 nm'de maksimum absorbans veren β -karoteni parçalayarak renginin açılmasına neden olurlar. Antioksidanlar, oluşan radikalleri söndürerek β -karotenin renginin açılmasını önlerler (Miller 1971; Huang ve ark. 2005). Bu yöntem hidrofilik, hidrofobik ve emülsiyonların oksidasyonunu ölçmek için kullanılır.

2.9.2.3. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kararlı yapıda bir azot radikalidir. DPPH'nin etanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 517 nm'de absorbansı ölçülür. DPPH çözeltisine antioksidanların ilave edilmesiyle söz konusu dalga boyundaki absorbansta düşüş meydana gelir ve çözeltinin rengi sarıya doğru kayar. Bu yöntem, antioksidanların serbest radikali giderme kabiliyetlerini belirleyen hızlı, pratik ve güvenilirliği yüksek olan bir yöntemdir (Blois 1958). Bu yöntemin olumsuz yönlerinden birisi 517 nm'de absorbsiyon yapan karotenoitler gibi bazı maddelerin analizinin güç olmasıdır. Bazı antioksidan maddeler, sterik engellemeden dolayı DPPH ile reaksiyona yavaş girerler veya giremezler. Bu nedenle antioksidan kapasiteyi tam anlayabilmek için bu testin yanında başka testler de yapılmalıdır.

2.9.2.4. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Bu yöntemde 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) $K_2S_2O_8$, MnO_2 , H_2O_2 gibi güçlü yükseltgenler ile tepkimeye sokulup $ABTS^{+\bullet}$ oluşturulur. Bu radikal 2 gün karanlıkta oda sıcaklığında kararludur. 660, 734 ve 820 nm dalga boylarında maksimum absorbans veren radikal, konjuge çifte bağlı antioksidanların aktivitesini ölçmede yararlıdır. Antioksidan ile tepkimeye sokulduğunda, $ABTS^{+\bullet}$ 'nin absorbansındaki düşme antioksidanın aktif olduğunu gösterir. Geliştirilen bu yöntemin en büyük avantajı hem hidrofilik hem de lipofilik sistemlerde kullanılabilmesidir (Re ve ark. 1999).

2.9.2.5. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)

Bu yöntemde 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin) ve Cu (II) aynı ortama koyulur. Antioksidanın Cu (II)'yi indirgemesi sonucu oluşan Cu (I)'in neokuproin ile yaptığı kompleks 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir (Apak ve ark. 2004). Bu yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik sistemlere uygulanabilir, kolay ve pratiktir.

2.9.2.6. FRAP Yöntemi (Demir (III) İyonu İndirgeme Gücü)

FRAP yöntemi, demir (III)'ün indirgenmesi yoluyla antioksidanların aktivitelerinin belirlenmesine dayanır. Düşük pH'larda Fe (III), tripiridiltriiazin (TPTZ) ile reaksiyona girerek $[Fe(III)-TPTZ]$ kompleksini oluşturur. Fe (III)'ün antioksidan tarafından indirgenmesiyle $[Fe(II)-TPTZ]$ kompleksi meydana gelir, 593 nm'de maksimum absorbans veren bu kompleksin rengi koyu mavidir (Benzie ve Strain 1996).

2.9.2.7. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Bu yöntem, pH=8'e ayarlanmış tampon ortamında nikotinamitadenin dinükleotit (NADH) ile fenazinmetasülfat (PMS) arasındaki tepkime sonucu açığa çıkan süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\bullet-}$), nitroblutetrazolyum (NBT) boyasının rengini gidermesine dayanır. Süperoksit, NBT ile reaksiyona girdiğinde önce monoformazon sonra

diformazon oluşur. NBT boyası 560 nm dalga boyunda maksimum absorbanı vermezken diformazon bu dalga boyunda yüksek absorbanı vermektedir. Antioksidanlar oluşan $O_2^{\bullet-}$ 'i gidererek NBT boyasının 560 nm'deki absorbanında azalma sağlarlar. Absorbanstaki düşüşün fazla olması antioksidanın $O_2^{\bullet-}$ 'i çok iyi giderdiğini göstermektedir (Liu ve ark. 1997).

2.9.2.8. Ferrisiyanür İndirgeme Gücü Yöntemi

pH'ı 6.6 olan fosfat tamponuyla hazırlanmış $K_3[Fe(CN)_6]$, antioksidan madde ile birlikte inkübasyona tutulduktan sonra asitlendirilir. Trikloroasetik asit ile düşük pH sağlandıktan sonra Fe (III) ile muamele edilir. Oluşan Prusya mavisi rengindeki $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ kompleksinin 700 nm'de absorbanı okunur. Bu yöntemde absorbanı yüksek çıkan maddelerin antioksidan aktivitesi de yüksektir (Oyaizu 1986).

2.9.2.9. TRAP Yöntemi (Toplam Radikal Tutma Parametresi)

Bu yöntemde, plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitelebilen maddelerden ve 2,2'-azobis (2-amidopropan) dihidroklorürden (AAPH) meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır. Plazmaya AAPH'ün ilavesinden sonra, yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu, reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesiyle belirlenir. Plazma içerisinde bulunan antioksidan maddeler oksidasyon reaksiyonunun yavaş gerçekleşmesine neden olurlar. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek plazmadaki antioksidan kapasite hesaplanır (Wayner ve ark. 1985).

2.9.2.10. Luminol Yöntemi (Kemilüminesans)

AAPH'dan üretilen peroksil radikallerinin luminolü yükseltgemesi sonucu ışık saçan luminol radikalleri meydana gelir. Yayılan ışık lüminometre ile ölçülür. Antioksidanlar kemilüminesans ışığının oluşumunu belli bir süre için engellerler. Gecikme zamanı bir örnekteki toplam antioksidan aktivitesi ile doğrudan orantılıdır (Wayner ve ark. 1986, Alho ve Leinonen 1999). Luminolü yükseltgeyen AAPH'den başka H_2O_2 veya perborat gibi yükseltgenler de kullanılmıştır (Whitehead ve ark.

1992). Bu deneyde reaksiyonu daha çabuk gerçekleştirebilmek için horseradish peroksidaz katalizörü kullanılarak ışık yayılması hızlandırılmıştır. Ortama *p*-iyodofenol konulması ışığın emisyonunu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı hale getirmektedir.

2.9.2.11. Diklorofloresin-Diasetat Yöntemi

Bu yöntemde AAPH peroksil radikalini oluşturmak için kullanılırken 2,7-diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA) yükseltgenebilen substrat olarak kullanılır. AAPH'dan oluşan peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan diklorofloresin (DCF) floresans özellik gösterir (Valkonen ve Kuusi 1997). DCF 480 nm'de uyarılıp 526 nm'de emisyon yapar.

2.9.2.12. ORAC Yöntemi (Oksijen Radikalini Absorplama Kapasitesi)

Bu yöntemde peroksil radikalini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikalini oluşturmak için Cu (II)-H₂O₂ ve yükseltgenebilen protein substratı olarak fikoeritrin kullanılmaktadır. Oluşturulan radikaller ile fikoeritrin arasındaki yükseltgenme reaksiyonu sonucunda, fikoeritrin floresansındaki zamana bağlı düşüş ölçülerek toplam antioksidan aktivite hesaplanmaktadır (Cao ve ark. 1993; Cao ve Prior 1999).

2.9.2.13. Siklik Voltametri Yöntemi

Biyolojik sıvılarda veya doku homojenatlarındaki düşük molekül ağırlıklı antioksidanların toplam indirgeme güçlerini ölçen bir yöntemdir. Örnek hazırlandıktan sonra camı karbon bir çalışma elektrot, Ag/AgCl'den oluşan referans elektrot ve platin telden oluşan yardımcı elektrot olmak üzere üç elektrotlu bir sistem içine yerleştirilir. Çalışma elektroduna sabit bir hızla (100 mV/dk) pozitif ve negatif potansiyeller uygulanmaktadır. Bu işlem sırasında potansiyel akım eğrisi (voltamogram) elde edilir. Örneğin indirgeme gücü, pik potansiyeli olan [Ep(a)] ve anodik akım olan (AC) ye bağlıdır. Ep(a) akımın yarı artışında ölçülür ve yarı dalga potansiyeli (E_{1/2}) olarak ifade edilir. Yarı dalga potansiyelinin düşük olması durumunda, analizlenen bileşiklerin çalışma elektroduna elektron verme yeteneği daha yüksektir. Ancak bazı antioksidanların camı karbon elektroduna elektronları yeteri kadar verememeleri durumunda başka tip elektrotlarla çalışılması uygun olabilir (Kohen ve ark. 1999).

2.10. Alzheimer Hastalığı

İnsan ömrünün uzamasına ve dünya nüfusunun yaşlanmasına bağlı olarak çeşitli sağlık sorunları hem sosyal hem de ekonomik önem kazanmaktadır. Bu sorunlardan biri olan demans, günlük yaşam işlevlerinin sürdürülmesini engelleyen ilerleyici bir beyin hastalığı olup, bellek kaybı, günlük yaşamın gereksinimlerini yerine getirmede zorlanma; algılamada, toplumsal davranışların düzenlenmesinde ve duygusal tepkilerin kontrolünde bozulma gibi sık karşılaşılan belirtilerle tanımlanmaktadır. Kesin bir tedavisi olmayan demansın birçok tipi olmasına rağmen, Alzheimer hastalığı (AD) en sık görülen tipidir (Orhan ve ark. 2002). İlk kez 1907 yılında Alman Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanan Alzheimer hastalığı, ilerleyen hafıza kaybı ve bilişsel bozulma ile karakterize edilen nörodejeneratif bir hastalıktır (Orhan 2002). Bu hastalık, demans durumundaki 65 yaş üzeri kişilerde %50-60 oranında görülen, öncelikle yaşlı nüfusu etkileyen ve halk sağlığı açısından çok önemli bir hastalıktır (Howes ve ark. 2003).

İnsan beyininde iki kolinesteraz bulunur; 7. kromozom üzerindeki bir gen tarafından kodlanan asetilkolinesteraz (AChE) ve diğeri 3. kromozom üzerindeki bir gen tarafından kodlanan butirilkolinesteraz (BChE). Enzimler, aminoasit dizilimleri %65 oranında birbirlerine benzemesine rağmen farklı genler üzerinde kodlanırlar (Savalev ve ark. 2004, Şahin 2002). AChE'nin kolinerjik iletimdeki rolü oldukça iyi bilinmekle birlikte BChE'nin rolü yeterince anlaşılmış değildir. Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin esas olarak AChE tarafından yapıldığı, BChE'nin buna çok az katkısının olduğu kabul edilmektedir. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin % 80'inden AChE, geriye kalan % 20'inden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Şahin 2002).

Alzheimer hastalığı'nın sebebi tam olarak anlaşılamamıştır, fakat beyin bazı bölgelerinde ciddi bir kolinerjik nöron kaybı söz konusudur. Güncel klinik strateji, antikolinesteraz inhibitörleri kullanarak AD hastalarının kötüye gidişini yavaşlatmak şeklindedir (Lin ve ark. 2008). Hastalığın oluşma mekanizmalarından birisinin, beyin ve korteksteki sinir uçlarından salınan asetilkolin adlı nöromediyatörün yetersizliğinden kaynaklandığı kabul edilmektedir (Orhan ve ark. 2002). Asetilkolinesterazın (AChE)

başlıca rolü kolinerjik sinapslarda asetilkolin (ACh)'in hızlı hidroliziyle sinir impulsunu sonlandırmaktadır (Mukherjee ve ark. 2007). AChE inhibitörleri bu nöromediyatörü salındığı sinir ucunda hidroliz yoluyla parçalayan asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmek suretiyle, asetilkolin miktarının azalmasını engelleyen ilaçlardır (Orhan ve ark. 2002). Günümüzde Alzheimer hastalığının tedavisinde en yararlı sonuçların alındığı tek ilaç grubu olarak, asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörleri belirtilmektedir. Ancak bu grup ilaçların sadece hafif ve orta şiddetteki Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabilmeleri ve yan etkileri, hastalığın tedavisi için yeni anti-Alzheimer ilaçların bulunmasını gerekli hale getirmektedir (Orhan ve ark. 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Mentha longifolia (L.) Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq. bitkisinin toprak üstü kısımları Mardin Gercüş Midyat yolu üzerinden Ağustos 2008'de Abdulselam Ertaş tarafından toplandı. Arş.Gör. Yeter Yeşil tarafından teşhis edildi. Kurutulmuş bitki örneği İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (ISTE: 83521).

3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

β -karoten, linoleik asit, kersetin, pirokatekol, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), potasyum iyodür, potasyum hidroksit, DTNB (5,5-ditiyobis(2-nitro benzoik asit)), asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, α -tokoferol Sigma firmasından (St. Louis); Tween-40, hekzan, petrol eteri, kloroform, diklorometan, dietil eter, metanol, etanol, alüminyum nitrat, potasyum asetat, hidroklorik asit, silika jel 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM, Merck KGaA 1.07734), ince tabaka plakları (Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄, Merck KGaA 1.05554) Merck (Darmstadt, Almanya), Sephadex LH-20, galantamin hidrobromür, sodyum metoksit, alüminyum klorür (Sigma-Aldrich), asetiltiyokolin iyodür, Folin-Ciocalteu reaktifi (Applichem), butiriltiyokolin iyodür (Fluka), susuz sodyum sülfat, sodyum karbonat, sodyum asetat, borik asit, sodyum hidrojen fosfat ve sodyum dihidrojen fosfat Riedel-de-Haen firmasından temin edildi. Kullanılan kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.2.1. Toplam Fenolik Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 2 g Na_2CO_3 100 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile hacmine tamamlandı.
- Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungstik-fosfomolibdik asit + CuSO_4) satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 17,6 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 100 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.
- 1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 9,6150 g CH_3COOK 100 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

3.2.2.3. β -Karoten Renk Açılım Yönteminde Kullanılan Çözelti

- β -Karoten reaktifinin hazırlanması: 0,2 mg β -Karoten 1 mL kloroformda çözülerek bir balona aktarıldı. Üzerine 200 μL Tween-40 ve 20 μL lineloik asitten ilave edip karıştırıldı. Vakum altında kloroform uçurulduktan sonra üzerine daha önceden oksijen ile doyurulmuş 50 mL su ilave edildi ve kuvvetlice çalkalandı.

3.2.2.4. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan Çözelti

- 0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etil alkolde çözüldü.

3.2.2.5. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

- Kersetin Çözeltilisinin Hazırlanması: 25,8 mg kersetin 25 mL etil alkolde çözülerek 1000 ppm'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.
- Pirokatekol Çözeltilisinin Hazırlanması: 10 mg pirokatekol 100 mL su ile çözülerek 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı.
- BHT (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksitoluen) Çözeltilisinin Hazırlanması: 10 mg BHT 10 mL etanol içinde çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlandı.
- BHA (2-*t*-bütil-4-hidroksianisol) Çözeltilisinin Hazırlanması: 10 mg BHA 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik BHA çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlandı.
- α -Tokoferol Çözeltilisinin Hazırlanması: %97'lik 10,31 mg α -tokoferol 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik α -tokoferol çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlandı.
- 4000 μ M Galantamin Çözeltilisinin Hazırlanması: 2,3 mg galantamin 2 mL etanolde çözülerek galantamin çözeltisi hazırlanmış olur.

3.3.2.2. Antikolinesteraz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltilerinin hazırlanması: 8,890 g Na_2HPO_4 tartıldı ve 500 mL deiyonize su ile çözüldü. 1,56 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 100 mL deiyonize su ile çözüldü.

pH 7 Tamponu: Hazırlanan 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 6,1 mL ve hazırlanan 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 3,9 mL alınarak karıştırıldı ve deiyonize su ile 20 mL'ye tamamlandı. pH metre ile pH 7 kontrol edildi.

pH 8 Tamponu: Hazırlanan 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 94,7 mL ve hazırlanan 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 5,3 mL alınarak karıştırıldı ve deiyonize su ile 200 mL'ye tamamlandı. pH metre ile pH 8 kontrol edildi.

- DTNB reaktifinin hazırlanması: 16 mg DTNB 1 mL pH 7 tamponunda çözüldü. 7,5 mg NaHCO₃ 1 mL pH 7 tamponunda çözüldü. Her iki çözelti karıştırılarak hacim pH 7 tamponuyla 4 mL'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce pH 8 tamponuyla hacmi 8 mL'ye tamamlandı.
- Enzim çözeltisinin hazırlanması: 0,2 mg enzim (asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz ayrı yerlerde olmak üzere) 1 mL fosfat tamponunda (pH 8) çözüldü.
- Asetiltiyokolin iyodür çözeltisinin hazırlanması: 16,4 mg asetiltiyokolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözülerek pH 8 tamponuyla hacmi 16 mL'ye tamamlandı.
- Butiriltiyokolin iyodür çözeltisinin hazırlanması: 4 mg butiriltiyokolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözülerek pH 8 tamponuyla hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

3.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler

UV/Vis spektrofotometresi (Shimadzu UV-1601, Japonya)

IR spektrofotometresi (Perkin Elmer Tetra-100)

NMR (Varian UNITY INOVA-500 MHz ve Varian UNITY INOVA-600 MHz)

Kütle (Thermo Elemental X Series ICP-MS)

Rotaevaporator (Büchi, İsviçre)

Otomatik pipetler (20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL) (Eppendorf, Almanya)

Hassas terazi (Scaltec SBA 31)

Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya)

pH-metre (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri)

BioTek Power Wave XS (Amerika Birleşik Devletleri)

Elma S15 ultrasonic bath (Almanya)

Ultra saf su cihazı (Younglin Instrument, aquaMAX-Ultra, Kore)

Vortex (LMS Co. LTD, Japonya)

Hesap makinası (Casiofx-3600 PA, Japonya)

Pulvarizatör

Azot tüpü

Oksijen tüpü

1cm'lik cam küvetler

Balon jojeler (10, 25, 50, 100 mL)

Magnetler

Armudi cam balonlar

Tanklar

Ayırma hunileri (1 L'lik)

3.4. Ekstrelerin Hazırlanışı

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinin toprak üstü kısımları (1350 g) gölgede kurutulup toz edildikten sonra önce petrol eteri (3 L, 3 × 24 saat), sonra aseton (3 L, 7 × 24 saat) ve en son metanol (3 L, 5 × 24 saat) ile oda sıcaklığında masere edildi. Petrol eteri ekstresi (MLP) 8,933 g, aseton ekstresi (MLA) 28,5 g ve metanol ekstresi (MLM) 41,8 g olarak elde edildi. Tablo 3-1'de ekstrelerin % verimleri ve kısaltmaları verildi.

Tablo 3-1: *M. longifolia* subsp. *noeana*'dan Elde Edilen Ekstreler ve % Verimleri

Bitki Materyali	Kullanılan Çözücüler	Ekstrelerin Adları	Ekstrelerin Kısaltmaları	Verimleri (%)
<i>M. longifolia</i> subsp. <i>noeana</i>	Petrol eteri	Petrol eteri ekstresi	MLP	0,66
	Aseton	Aseton ekstresi	MLA	2,11
	Metanol	Metanol ekstresi	MLM	3,09

3.5. Uçucu Yağ Eldesi

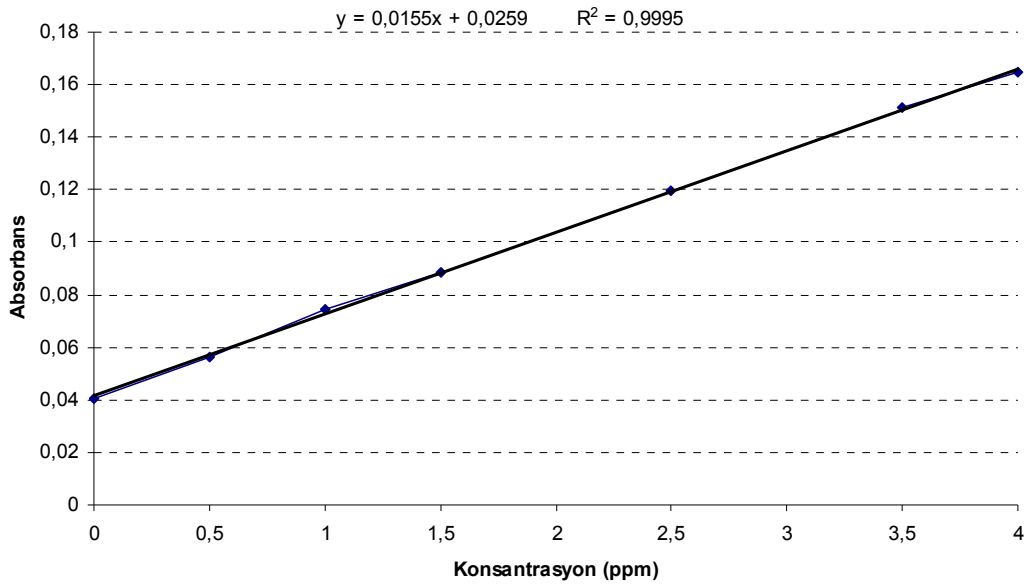
Uçucu yağ eldesi, Clevenger aparatı kullanılarak su buharı distilasyonu yöntemi ile gerçekleştirildi. Yöntemin esası; soğutucu ile irtibatlandırılan bir cam balon içerisinde su ve bitki materyalinin 2-8 saat süre ile kaynatılarak, su buharı ile birlikte hareket eden yağ moleküllerinin soğutucuda yoğunlaştırılıp sudan ayrıştırılmasına dayanmaktadır (Fakhari ve ark. 2005). İki yüz gram *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisinden bu yöntemle 100 mg uçucu yağ (MLU) elde edildi.

3.6. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi

3.6.1. Toplam Fenolik İçeriklerinin Belirlenmesi

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton 1977; Singleton ve ark. 1999). *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının 1000 ppm konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Bir mg ekstre içeren örnek çözeltileri distile su ile 46 mL'ye tamamlandı. Bu karışıma 1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve 3 dak sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 mL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden (Şekil 3-1) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi.

$$\text{Absorbans} = 0,0155(\mu\text{g}) + 0,0259 \quad (R^2: 0,9995)$$

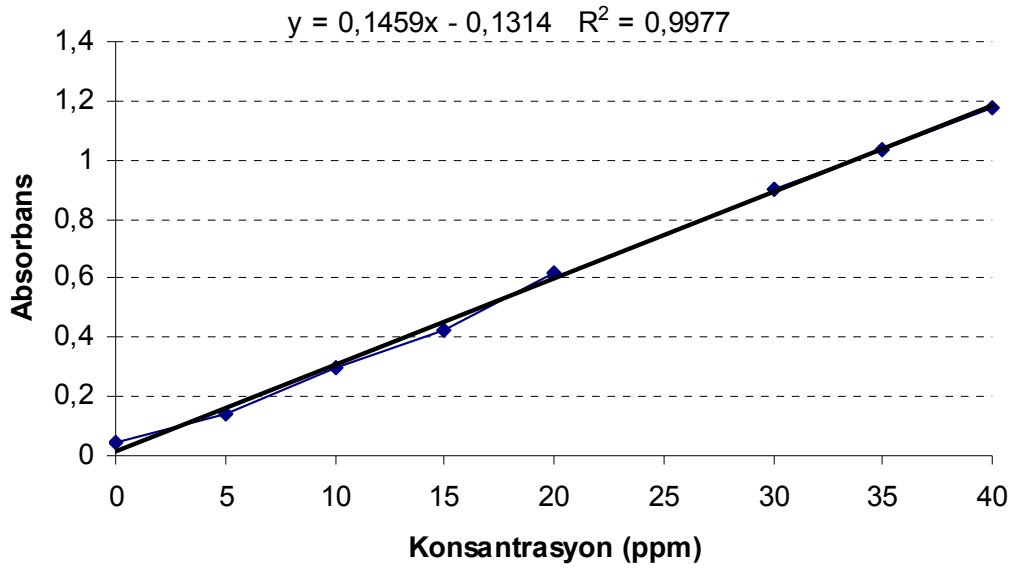


Şekil 3-1: Pirokatekolün ölçü eğrisi

3.6.2. Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi (Moreno ve ark. 2000). Bin ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 µL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. 0,1 mL 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 0,1 mL %10'luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de kontrole karşı UV spektrofotometresinde absorbansları okundu. Aynı şekilde *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisinin petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin tek konsantrasyonda (100 ppm) hazırlanan çözeltilerinin de absorbans değerleri okundu. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri, standart kersetin grafiğinden (Şekil 3-2) elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

$$\text{Absorbans} = 0,1459(\mu\text{g}) - 0,1314 \quad (R^2: 0,9977)$$



Şekil 3-2: Kersetinin ölçü eğrisi

3.7. Antioksidan Tayin Yöntemleri

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının ve saf maddelerin antioksidan aktivite tayini β -karoten-linoleik asit test sistemi ve DPPH serbest radikal giderim yöntemi ile yapıldı.

3.7.1. β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Toplam Antioksidan Aktivite Tayini)

Bu yöntem, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine dayanmaktadır (Miller 1971). Analiz örneklerinin stok çözeltilerden 50, 125, 250, 500 μ L alınarak distile su ile hacimleri 1 mL'ye tamamlandı ve üzerlerine β -karoten-linoleik asit çözeltisinden her bir örneğe 4 mL ilave edilir edilmez ultraviyole spektrofotometresi kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Hazırlanan çözeltiler 50°C'de 120 dakika bekletildi (Miller 1971). Bu süre sonunda absorbanslar tekrar ölçüldü. β -Karotenin renk açılım oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$R = \ln (a/b)/t$$

ln=doğal logaritma

a=başlangıç absorbansı

b= t zaman (dakika) inkübasyonundan sonraki absorbans.

Toplam antioksidan aktivite, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam Antioksidan Aktivite (\%İnhibisyon)} = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT, BHA, α -Toc ve kersetin kullanıldı.

3.7.2. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi

Analiz örneklerinin stok çözeltilerden 50, 125, 250 ve 500 μ L alınarak etanol ile hacimleri 40 μ L'ye tamamlandı ve üzerlerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 160 μ L ilave

edildi. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı (Blois 1958). Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

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

A: Absorbans

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı. Standart olarak BHT, BHA, α -Toc ve kersetin kullanıldı.

3.8. Antikolinesteraz

Mikroplakadaki kuyucuklara 150 μ L 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 8), 10 μ L örnek çözeltisi ve enzim çözeltisinden (AChE veya BChE) 20 μ L konuldu. Bu karışım 25°C'de 15 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda 10 μ L DTNB reaktifi ve 10 μ L substrat (asetiltiyokolin iyodür veya butiriltiyokolin iyodür) her bir kuyucuğa ilave edildi. Analiz edilen çözeltilerin son konsantrasyonu 200 μ g/mL'dir. On dakika sonra mikroparka ELISA okuyucuya (BioTek Power Wave XS) yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Standart olarak galantamin kullanıldı ve örneklerin absorbansları kontrol olarak kullanılan etanole karşı değerlendirildi (Ellman ve ark. 1961).

3.9. İstatistik Hesaplamalar

Antioksidan aktivite sonuçlarında elde edilen veriler 3 paralel testin ortalaması ve standart sapması olarak verildi. Sonuçlar Student's *t*-testine göre %95 güven sınırları içinde bulundu. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ kabul edildi. En küçük kareler yönteminin kullanıldığı doğrusal regresyon analizi eğim, intersept ve korelasyon katsayılarının değerlendirilmesiyle yapıldı.

3.10. Kromatografik Yöntemler

3.10.1. Sütun Kromatografisi

Ekstreleri fraksiyonlandırarak, fraksiyonlardan saf maddeler elde etmek amacıyla iki çeşit dolgu maddesi kullanıldı. Bu dolgu maddeleri silika jel ve Sephadex LH-20'dir.

Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek silika jel ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silika jel ile doldurulmuş sütunun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Her bir ekstrenin elüsyonuna %100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile polarite arttırılarak elüsyona devam edildi, sonunda %100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Benzer fraksiyonlar İTK yapılarak birleştirildi ve saflaştırma için daha küçük boyuttaki sütunlarda silika jelin yanı sıra Sephadex LH-20 adsorban olarak kullanıldı.

Sephadeks LH-20 ile hazırlanan sütunlarda karışımın polaritesine göre iki çözücü sistemi kullanıldı: apolar özellik gösteren fraksiyonlar için hekzan:kloroform:metanol (7:4:1) çözücü sistemi, polar özellik gösteren fraksiyonlar için ise %100 metanol kullanıldı. Fraksiyonlar, sütunda kullanılacak çözücü sisteminde çözülerek sıvı halde Sephadex LH-20 ile doldurulmuş sütunun üst kısmına ilave edildi. Benzer fraksiyonlar İTK yapılarak birleştirildi.

3.10.2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde (İTK), silika jel hazır plaklardan (20 × 20 cm) yararlanıldı. Sütun kromatografisinde elde edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında İTK plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

3.10.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Çalışma Şartları

Uçucu yağ

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın bileşenleri TÜBİTAK-UME'de bulunan Thermo Electron Trace 2000 GC model gaz kromatografisi ve Thermo Electron DSQ quadropol kütle spektrometresi ile belirlenmiş ve sonuçlar değerlendirilerek tarafımıza gönderilmiştir. GC-MS analizi apolar Phenomenex DB-5 kolonunda (30 m × 0,32 mm, 0.25 µm film kalınlığı) helyum gazı (1mL/dak ve 20 psi) ile yapıldı. GC fırın sıcaklığı 60°C'de 10 dakika tutuldu, 280°C'ye 4°C/dakika hızla çıkarıldı ve bu sıcaklıkta (280°C) 10 dakika sabit tutuldu. Split oranı 1:50 olarak ayarlandı, injeksiyon hacmi 0.1 µL'dir. Kütle spektrometresi (EI/MS) 70 eV iyonizasyon enerjisine ayarlandı. Kütle spektrometresi tarama aralığı m/z 35-500 atomik kütle birimi (amu) aralığına ayarlandı. Kovats Indisi (KI) hesaplamasında referans noktalar olarak alkanlar kullanıldı. Uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanması retansiyon zamanlarının ve kütle spektrumlarının, orijinal örneklerin retansiyon zamanları ve kütle spektrumları ile karşılaştırılması ile yapıldı. Ayrıca NIST ve Wiley GC-MS kütüphaneleri ile TUBİTAK-UME uçucu yağ kütüphanesi bileşenlerin belirlenmesinde kullanıldı.

Yağ asidi

TÜBİTAK-UME'de bulunan Thermo Electron Trace 2000 GC model gaz kromatografisi ve Thermo Electron DSQ quadropol kütle spektrometresi yağ asidi metil esterlerinin analizinde kullanıldı. Tübitak-ÜME sonuçları değerlendirilerek tarafımıza gönderdi. GC-MS analizi apolar Phenomenex DB-5 kolonunda (30 m × 0,32 mm, 0.25 µm film kalınlığı) helyum gazı (1mL/dak ve 20 psi) ile yapıldı. GC fırın sıcaklığı 40°C'de 5 dakika tutuldu, 280°C'ye 5°C/dakika hızla çıkarıldı ve bu sıcaklıkta (280°C) 10 dakika sabit tutuldu. Split oranı 1:20 olarak ayarlandı, injeksiyon hacmi 0.1 µL'dir. Kütle spektrometresi (EI/MS) 70 eV iyonizasyon enerjisine ayarlandı. Kütle spektrometresi tarama aralığı m/z 35-450 atomik kütle birimi (amu) aralığına ayarlandı. NIST ve Wiley GC-MS kütüphaneleri ile TUBİTAK-UME kütüphanesi, bileşenlerin belirlenmesinde kullanıldı. Ayırılan bileşenlerin relatif yüzde miktarı, computerized integratörle toplam iyon kromatografisinden hesaplandı.

Yağ asitlerinin esterleştirilmesi

Yüz miligram yağ örneği, 0,1M KOH çözeltisi ve metanol (2 mL) içinde 1 saat geri çeviren soğutucuda tutuldu. Çözelti soğutulduktan sonra 5 mL su ilave edildi. Sulu karışım, 0,5 mL HCl çözeltisi ile nötralize edildi ve hekzan:dietil eter (1:1; 3-5 mL) karışımı ile ekstre edildi. Organik tabaka ayrıldı ve su ile yıkandı (10 mL), daha sonra susuz Na_2SO_4 üzerinde kurutuldu. Organik çözücü rota evaporatörde uçurularak yağ asidi esterleri elde edildi

3.11. Spektroskopik Yöntemler

3.11.1. UV/Vis Spektroskopisi

Saf maddelerin metanolde çözülerek boşa karşı 200–400 nm dalga boyları arasında UV spektrumları alındı. Flavonoitin yapısının belirlenmesinde kayma belirteçleri kullanılarak spektrumları alındı.

3.11.2. Kayma Belirteçleri ile Flavonoitin UV Spektrumlarının Alınması

UV spektrumu alınacak flavonoitin absorpsiyon bantlarının 0,600 ile 0,800 arasında absorbans değerlerini verebilmesi için, 0,35 mg madde 10 mL metanolde çözülerek flavonoitin stok çözeltisi hazırlandı (Mabry ve ark. 1970).

3.11.2.1. Sodyum Metoksit (NaOCH_3) Belirteci ile UV Spektrumunun Alınması

Flavonoitin stok çözeltisinden 3 mL alınarak boşa karşı dakikada 50 nm okuma hızı ile UV spektrumu alındı. Metanolde alınan spektrumu, dalga boylarının doğruluğunu belirlemek için dakikada 10 nm okuyarak düşük tarama hızında tekrar alındı. Bu çözeltinin üzerine sodyum metoksit stok çözeltisinden 3–5 damla ilave edilir edilmez hemen UV spektrumu alındı. 5 dakika sonra flavonoitin bozulup bozulmadığını anlamak için tekrar ölçüm yapıldı (Mabry ve ark. 1970).

3.11.2.2. Alüminyum Klorür/Hidrojen Klorür (AlCl_3/HCl) Belirteci ile UV Spektrumunun Alınması

Flavonoitin stok çözeltisinden 3 mL alınarak boşa karşı metanol spektrumu alındı. Altı damla alüminyum klorür çözeltisi eklendikten hemen sonra yeniden spektrum alındı. Bazı izoflavonların ve dihidroflavonollerin AlCl_3 reaktifi ile en iyi etkiyi yapabilmesi için 1 dakika gibi zamana ihtiyaç olduğundan 1 dakika sonra tekrar spektrum alındı. Daha sonra flavonoit ve AlCl_3 içeren çözeltiye seyreltik HCl 'den 3–5 damla eklenerek UV spektrumu alındı (Mabry ve ark. 1970).

3.11.2.3. Sodyum Asetat/Borik Asit ($\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$) Belirteci ile UV Spektrumunun Alınması

Flavonoitin stok çözeltisinden 3 mL alınarak boşa karşı metanol spektrumu alındı. Bu çözeltiye sodyum asetatın aşırı toz halinde eklendi ve yaklaşık 2 dakika sonra spektrum alındı. Beş dakika sonra, bozunmanın olup olmadığını anlamak için yeniden spektrum alındı. Bu çözeltiye susuz borik asit ilave edildikten sonra UV spektrumu alındı (Mabry ve ark. 1970).

3.11.3. Infra-Red Spektroskopisi (IR)

Saf maddeler kloroformda çözülerek cihazda ATR kristalinin üzerine bir damla olarak damlatıldı.

3.11.4. Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (NMR)

Saf maddelerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, APT, HMBC ve HMQC spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak döterokloroform ve döterometanol kullanıldı.

3.11.5. Kütle Spektroskopisi

Saf maddelerin kütle spektrumları İ.Ü. İleri Analizler Laboratuvarında bulunan Thermo Elemental X Series ICP-MS cihazında alındı.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *Mentha longifolia* subsp. *noeana* bitkisinin toprak üstünden uçucu yağ (MLU) elde etmek için bir miktar ayrıldıktan sonra bitkinin kalan kısımları önce petrol eteri (MLP), ardından aseton (MLA) ve en son olarak metanol (MLM) ile ekstre edildi. Bu ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. Ekstrelerin, uçucu yağın ve saf maddelerin antioksidan aktivite tayinleri β -karoten renk açılım metodu ve DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemleriyle, antikolinesteraz aktivite tayini Ellman yöntemi ile yapıldı.

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinin uçucu yağ ve yağ asidi analizleri, petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin kimyasal içeriklerinin, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi ilk kez bu tez çalışması ile yapıldı.

4.1. Uçucu Yağ Analizi Sonuçları

İlaç, kozmetik, gıda, şekerleme ve içecek endüstrisinde yaygın kullanım alanına ve ekonomik değere sahip olan *Mentha* uçucu yağını elde etmek için dünyada bu türlerin kültürü yapılmaktadır (Mkaddem ve ark. 2009). Ülkemizde yetişen *Mentha* türleri taşıdıkları uçucu yağ miktarı ve bu yağın bileşenleri bakımından büyük farklılıklar göstermektedir. Bunun nedeni ekolojik koşullar ve *Mentha* türlerinin birbirleriyle kolaylıkla melezleşmeleridir (Baytop 1984 pp. 337-339). GC/MS analizi sonucu *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisinin uçucu yağında ana bileşenin pulegon (%32,3) olduğu belirlendi. Menton %13,8 miktarla uçucu yağ bileşiminde ikinci sırada yer aldı. %9,2 oranında bulunan madde ise tanımlanamadı (Tablo 4-1). *M. longifolia* subsp. *noeana*, keskin kokusu nedeniyle Nusaybin yöresinde “yılan kovucu” olarak adlandırılmakta ve yılanları uzak tutmak amacıyla evlerin ve tarlaların etrafına dikilmektedir.

Tablo 4-1: Uçucu Yağ Analizi Sonuçları

RT	Bileşikler	% Miktar	RI
9,50	α -Pinen	0,3	939
10,82	Sabinen	0,3	975
11,00	β -Pinen	0,6	979
11,27	β -Mirsen	t	991
11,39	3-Oktanöl	0,4	991
12,58	Simen	t	1025
12,75	Limonen	0,9	1029
12,90	1,8-Sineol	8,0	1031
17,36	Menton	13,8	1153
17,76	Isomenton	2,6	1163
18,18	Isopulegon	8,9	1155
18,25	Isopulegol	9,7	1160
18,66	α -Terpineol	1,2	1189
20,45	Pulegon	32,3	1237
20,96	Piperiton	0,9	1253
21,95	Anetol	0,6	1253
22,89	Dihidrokarveol asetat	2,7	1344
23,97	Berbenon	0,6	1175
26,70	Karyofilen	0,8	1409
27,10	Kopaen	0,4	1432
27,40	Tanımlanamadı	9,2	1438
27,79	α -Humulen	t	1439
31,60	Spatulenol	0,3	1578
31,83	Karyofilen oksit	3,3	1583
Toplam		97,8	

RT: Alıkonma zamanı, dk. (Retention Time)**RI:** Alıkonma İndisi (Retention indices)**t:** Trace (Eser) (<0.05%)

4.2. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri Sonuçları

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisinden hazırlanan her üç ekstrenin fenolik içerik açısından benzer oldukları belirlendi. Aynı şekilde flavonoit içerik bakımındanda birbirine yakın değerlerde içeriğe sahip oldukları tespit edildi. (Tablo 4-2). Ayrıca her üç ekstrenin fenolik içeriğinin flavonoit içeriğine oranla daha zengin olduğu belirlendi.

Tablo 4-2: Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarları ^a

Ekstreler	Toplam Fenolik Miktar ($\mu\text{gPEs/mg}$ ekstre) ^b	Toplam Flavonoit Miktar ($\mu\text{gQEs/mg}$ ekstre) ^c
MLP	225,65 $\pm$ 3,42	33,54 $\pm$ 1,60
MLA	217,10 $\pm$ 1,82	29,10 $\pm$ 0,47
MLM	218,06 $\pm$ 3,19	24,08 $\pm$ 1,14

^a Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verildi.

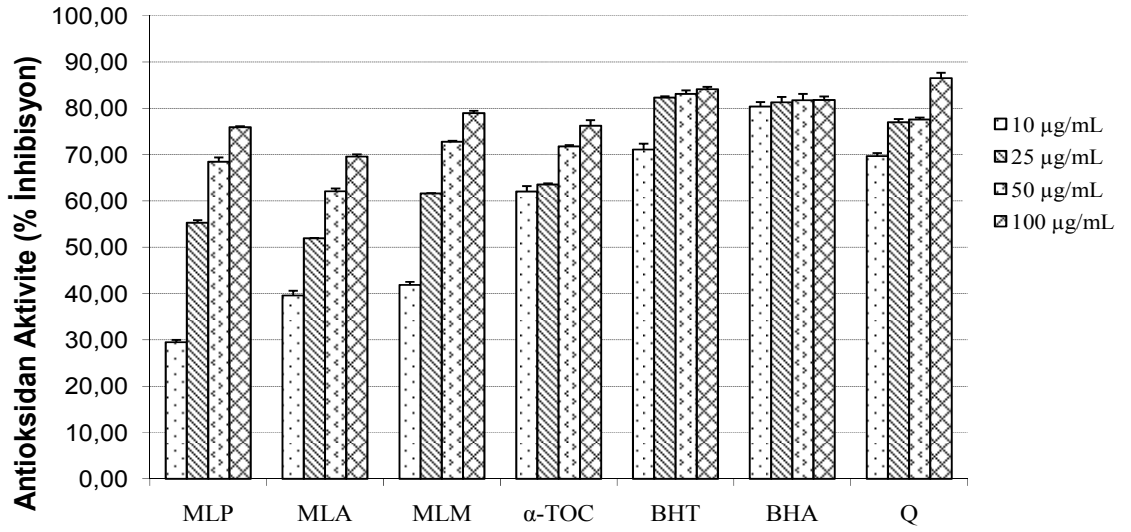
^b Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik ($y=0,0155x+0,0259$ $R^2=0,9995$)

^c Kersetine eşdeğer flavonoit içerik ($y=0,1459x-0,1314$ $R^2=0,9977$)

4.3. Ekstrelerin ve Uçucu Yağın Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.3.1. β -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları

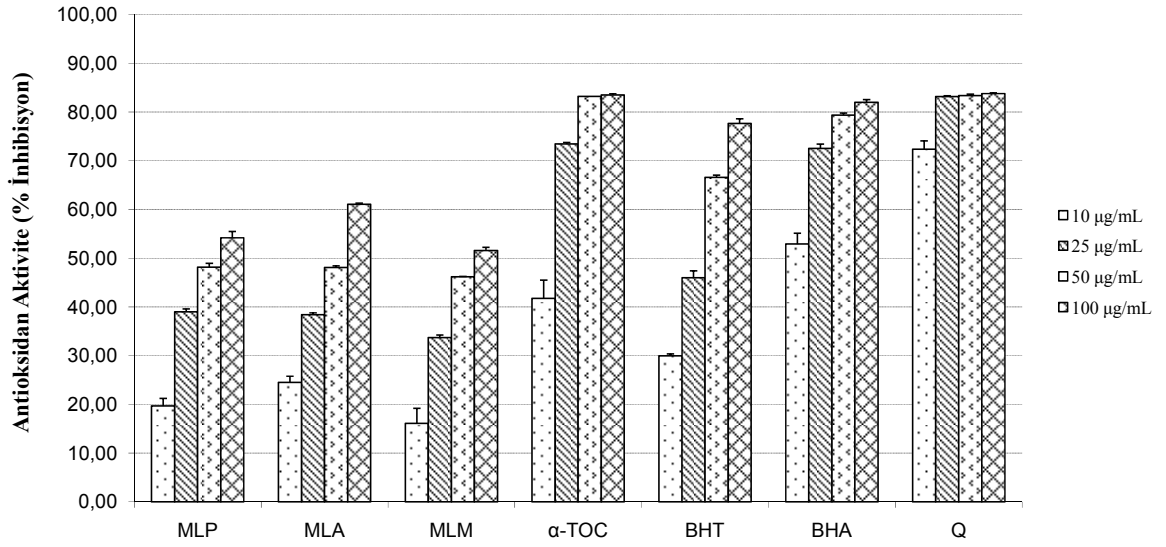
M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinden hazırlanan ekstrelerin ve uçucu yağın toplam antioksidan aktiviteleri β -karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) yapıldı. Antioksidan aktivite karşılaştırmalarında standart olarak α -TOC, BHT, BHA ve kersetin kullanıldı. Bu yöntemde petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon hariç diğer konsantrasyonlarda %50'nin üzerinde inhibisyon gösterdikleri, 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ise yaklaşık α -TOC kadar aktiviteye sahip oldukları belirlendi (Şekil 4-1). Uçucu yağ, aktivite göstermediği için Şekil 4-1'de yer verilmedi.



Şekil 4-4-1: *M. longifolia* subsp. *noeana* Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin β -Karoten Renk Açılım Yöntemi ile Antioksidan Aktiviteleri

4.3.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinden hazırlanan ekstrelerin ve uçucu yağın DPPH serbest radikali giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) tayin edildi. Standart olarak kullanılan α -TOC, BHT, BHA ve kersetine göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. Bu yöntemde, petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin aktivitelerinin hemen hemen aynı olduğu, ancak standartlardan daha düşük etkiye sahip oldukları tespit edildi (Şekil 4-2). Ekstreler arasında en iyi etkiyi aseton ekstresi 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de gösterdi. β -Karoten renk açılım yönteminde olduğu gibi bu yöntemde de uçucu yağ aktif olmadığı için grafikte gösterilmedi.



Şekil 4-4-2: *M. longifolia* subsp. *noeana* Bitkisinde Hazırlanan Ekstrelerin DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi

4.4. Ekstrelerin ve Uçucu Yağın Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinde hazırlanan ekstrilerden ve uçucu yağdan hiç biri asetilkolinesteraz enzimini (AChE) inhibe edici etki göstermezken aseton ve metanol ekstrileri birbirlerine yakın iyi düzeyde butirilkolinesteraz enzimini (BChE) inhibe edici etki gösterdi. Antioksidan etki göstermeyen uçucu yağ, standart olarak kullanılan galantamine yakın BChE inhibe edici etkiye sahipken ($77,36 \pm 0,29$) AChE'ye karşı hiç bir aktivite göstermedi (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları^a

Örnekler	AChE (%İnhibisyon)	BChE (%İnhibisyon)
MLP	AD	27,83 ± 2,72
MLA	AD	58,96 ± 1,72
MLM	AD	61,69 ± 5,00
MLU	AD	77,36 ± 0,29
Galantamin ^b	89,99 ± 0,11	87,17 ± 0,83

^a 200µg/mL^b Standart madde

AD: Aktif değil

4.5. *M. longifolia* subsp. *noeana* Bitkisinden Hazırlanan Ekstrelerin Kimyasal İçerikleri

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları, antioksidan ve antikolinesteraz aktivite sonuçları değerlendirildiğinde bu üç ekstrenin benzer etkilere sahip oldukları belirlendi. Bu nedenle üç ekstreden kromatografik yöntemler kullanılarak saf madde elde edilmesine ve bu saf maddelerin yapılarının aydınlatılarak aktivitelerinin tayin edilmesine karar verildi.

4.5.1. *M. longifolia* subsp. *noeana* Bitkisinin Petrol Eteri Ekstresinin (MLP) Fraksiyonlandırılması

MLP silika jel içeren sütunda fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve elüsyona %5 çözücü polaritesi arttırılarak sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile devam edildi, %100 metanole ulaşıncaya elüsyon tamamlandı. İTK ile benzer fraksiyonlar birleştirildi. Toplam 23 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlara sütun ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak toplam 5 saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıldı. Ayrıca MLP'nin silika jel sütunda %100 petrol eteri ile elüsyonundan yağ asidi karışımı elde edildi ve GC/MS analizi ile bu karışımın bileşimi tayin edildi.

4.5.1.1. MLP'den Elde Edilen Yağ Asidinin GC/MS Analiz Sonucu

MLP'den elde edilen yağ asidi karışımının GC/MS analizi sonucunda, doymuş ve doymamış, karbon sayısı 14 ile 24 arasında değişen toplam 14 bileşen içerdiği ve ana bileşenin de palmitik asit (%40,8) olduğu belirlendi (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Yağ Asidi Analizi Sonucu

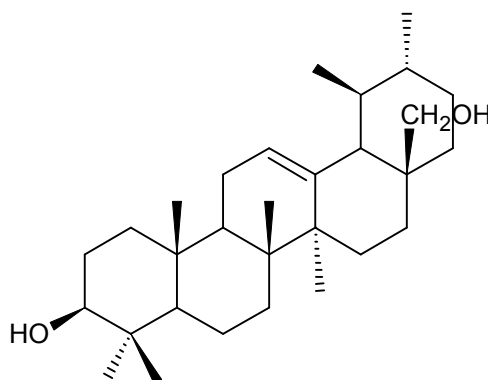
RT	Bileşikler	% Miktar
35,24	Miristik asit, metil ester (C14:0)	2,0
37,91	Pentadekanoik asit, metil ester (C15:0)	1,1
39,92	Palmitoleik asit, metil ester (C16:1)	1,1
40,49	Palmitik asit, metil ester (C16:0)	40,8
42,92	Heptadekanoik asit, metil ester (C17:0)	t
44,61	Linoleik asit, metil ester (C18:2n6c)	15,3
44,73	Oleik asit, metil ester (C18:1n9c)	17,8
44,85	Elaidik asit, metil ester (C18:1n9t)	2,4
45,27	Stearik asit, metil ester (C18:0)	9,0
49,67	Araşidik asit, metil ester (C20:0)	5,3
51,75	Heneikosanoik asit, metil ester (C21:0)	t
53,74	Behenik asit, metil ester (C22:0)	3,6
55,67	Trikosanoik asit, metil ester (C23:0)	t
57,65	Lignoserik asit, metil ester (C24:0)	t
Toplam		98,4

RT: Alikonma zamanı, dk. (Retention Time)

t: Trace (Eser) (<0.6%)

4.5.1.2. MLP'den Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri

4.5.1.2.1. MLP-1: Uvaol



Renksiz olan MLP-1 bileşiği amorf halde elde edildi. Silika jel plakta UV lamba (254 nm) altında görülmeyen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 209 nm'de absorpsiyon verdi (Şekil 4-3). IR spektrumunda (CHCl₃) 3380 (OH), 2926-2865 (C-H), 1664 (C=C) cm⁻¹'de bantlar izlendi (Şekil 4-4).

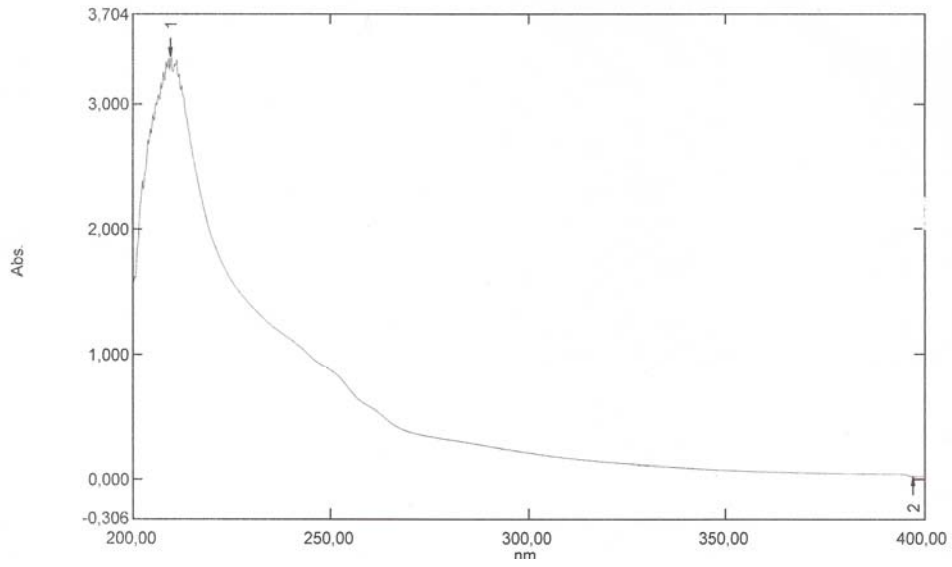
¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃, 500 MHz) (Şekil 4-5); δ 0,72 ile 1,01 arasında izlenen 7 metil piki bileşiğin bir triterpen olduğunu düşündürdü. 3,16 ppm'de (1H, *dd*, J = 4,39; 10,74 Hz) hidroksil grubuna komşu proton (H-3 α), 3,27 ppm'de (1H, *d*, J = 10,73 Hz) H-28b ve 3,73 ppm'de (1H, *d*, J = 10,73 Hz) H-28a, 5,12 ppm'de (1H, *t*, J = 3,41 Hz) vinilik proton (H-12) pikleri görüldü. ¹³C-NMR (APT) (CDCl₃, 125 MHz) (Şekil 4.6) δ 38,43 (C-20) ve 38,37'de (C-19) izlenen pikler triterpenin ursan yapısında olduğunu, δ 137,72 (C-13) ve 124,06 (C-12) pikleri çifte bağın C-12'de bulunduğunu, δ 78,03 (C-3) hidroksil grubunun bağlı olduğu karbonu ve 68,93 (C-28) hidroksimetilen grubunun karbonunu gösterdi.

Literatürde verilen spektral değerler ile MLP-1'in değerleri karşılaştırıldığında bileşiğin uvaol ($3\beta,28$ -dihidroksi-12-ursen) (6 mg) olduğu belirlendi (Siddiqui ve ark. 1986). MLP-1 bileşiği *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi.

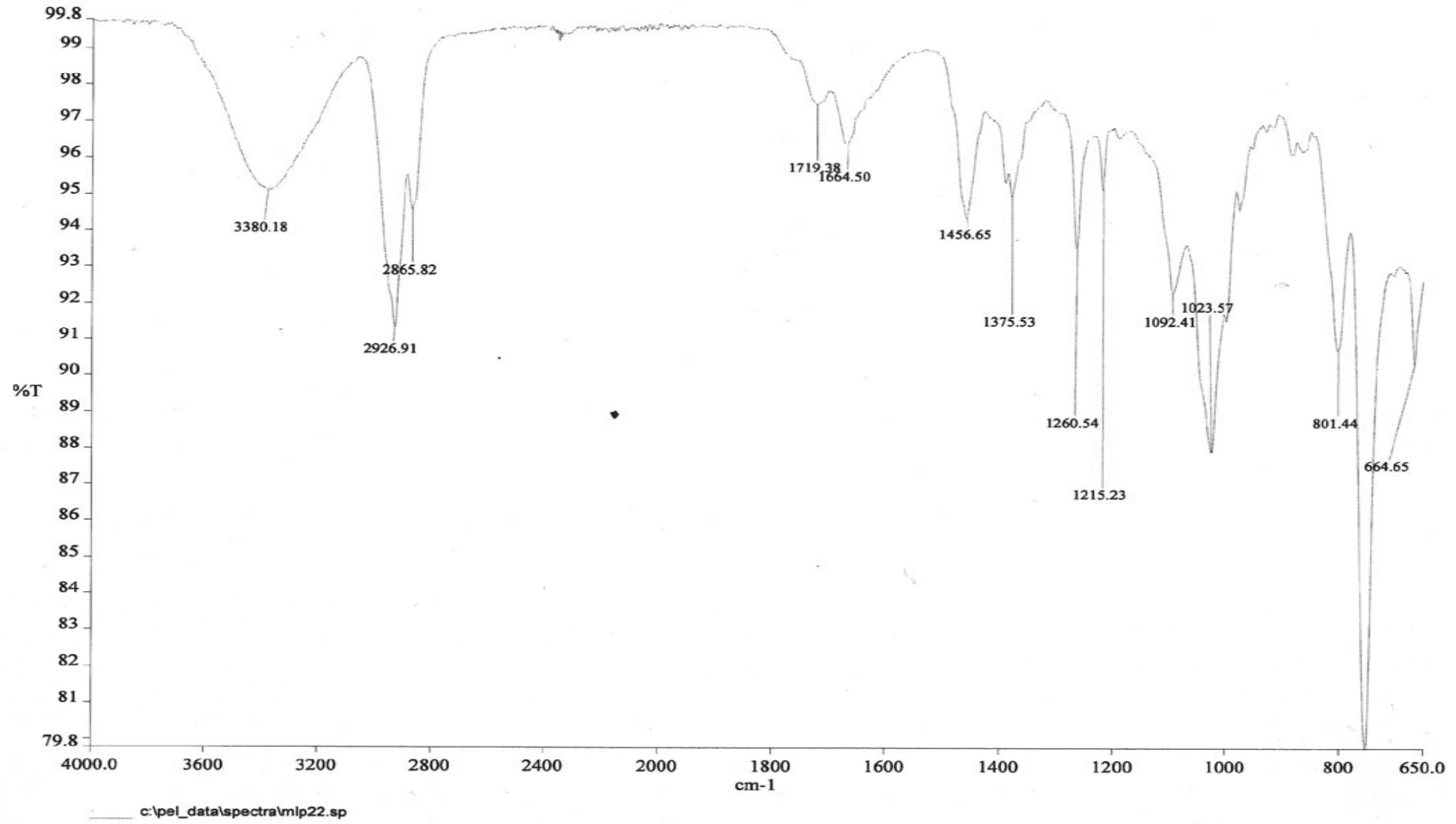
Spectrum Peak Pick Report

07.04.2011 13:34:17

Data Set: MLP38 - RawData - C:\Documents and Settings\pc\Desktop\MLP38.spc



Şekil 4-4-3: Uvaol'ün UV Spektrumu



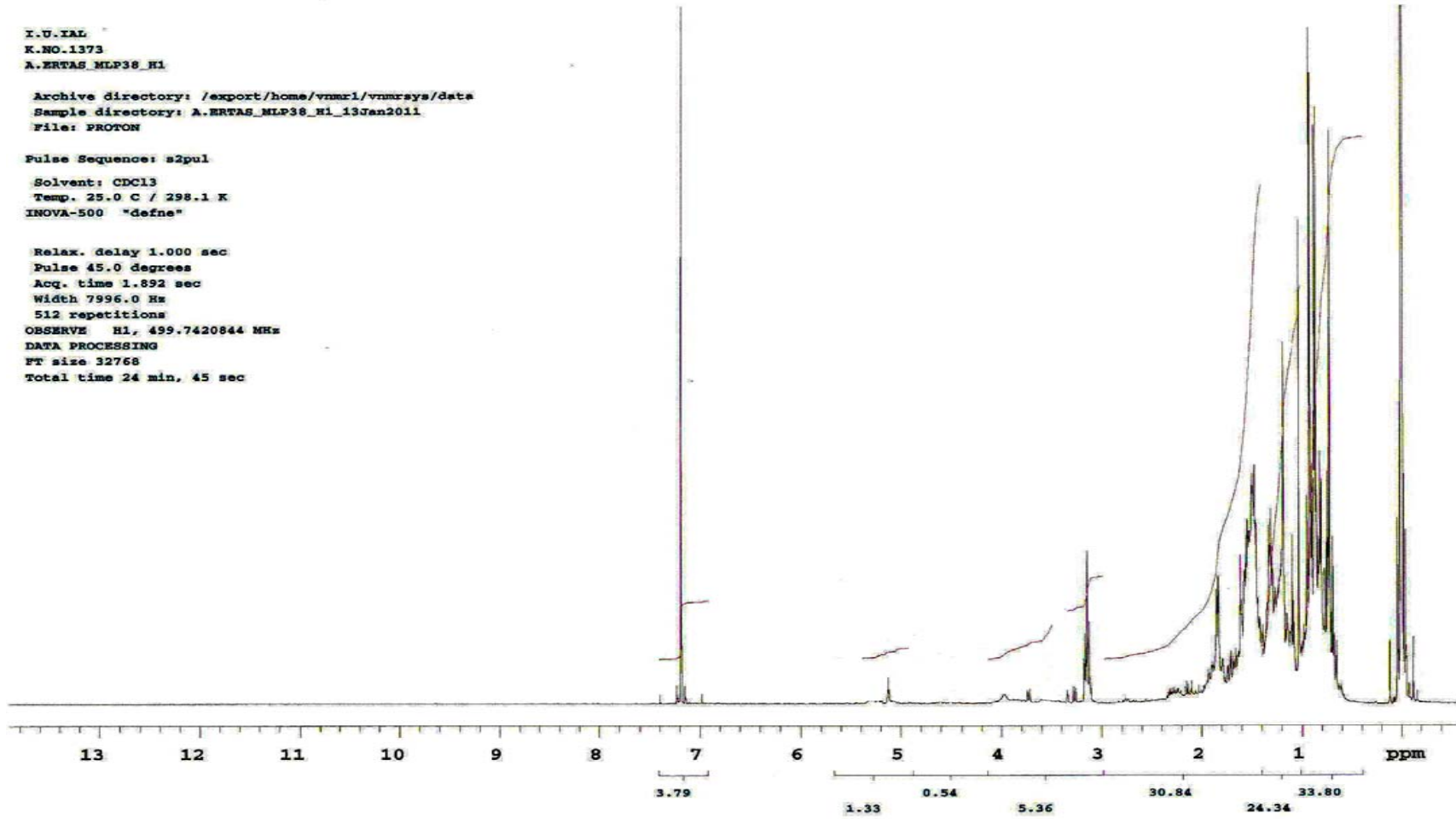
Şekil 4-4: Uvaol'ün IR Spektrumu

I.U.IAL
K.NO.1373
A.ERTAS_MLP38_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP38_H1_13Jan2011
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl₃
Temp. 25.0 C / 298.1 K
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
512 repetitions
OBSERVE H1, 499.7420844 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 24 min, 45 sec



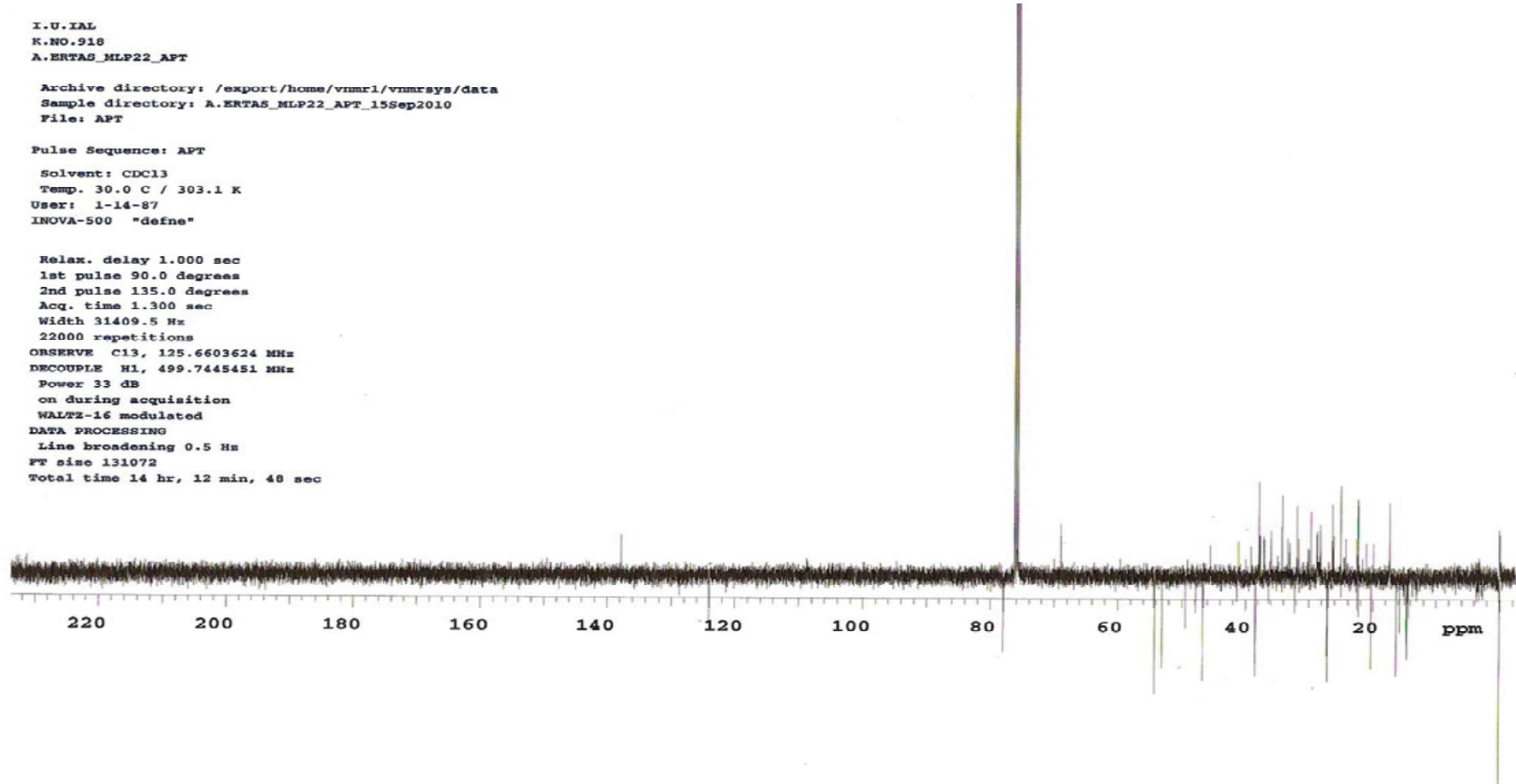
Şekil 4-5: Uvaol'ün ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 500 MHz)

I.U.IAL
K.NO.918
A.ERTAS_MLP22_APT

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP22_APT_15Sep2010
File: APT

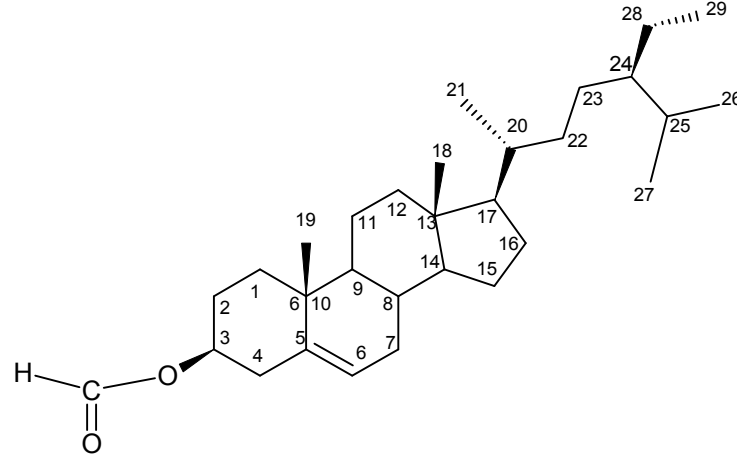
Pulse Sequence: APT
Solvent: CDCl₃
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
1st pulse 90.0 degrees
2nd pulse 135.0 degrees
Acq. time 1.300 sec
Width 31409.5 Hz
22000 repetitions
OBSERVE C13, 125.6603624 MHz
DECOUPLE H1, 499.7445451 MHz
Power 33 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131072
Total time 14 hr, 12 min, 48 sec



Şekil 4-6: Uvaol'ün ¹³C-NMR (APT) Spektrumu (CDCl₃, 125 MHz)

4.5.1.2.2. MLP-2: Stigmast-5-en-3 β -il format



Renksiz olan MLP-2 bileşiği amorf halde elde edildi. Silika jel plakta UV lamba (254 nm) altında görülmeyen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) açık sarı renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 201 ve 223 (omuz) nm'de absorpsiyon verdi (Şekil 4-7). IR spektrumunda (CHCl₃) 2923-2852 (C-H), 1728 (C=O), 1667 (C=C) cm⁻¹'de bantlar izlendi (Şekil 4-8).

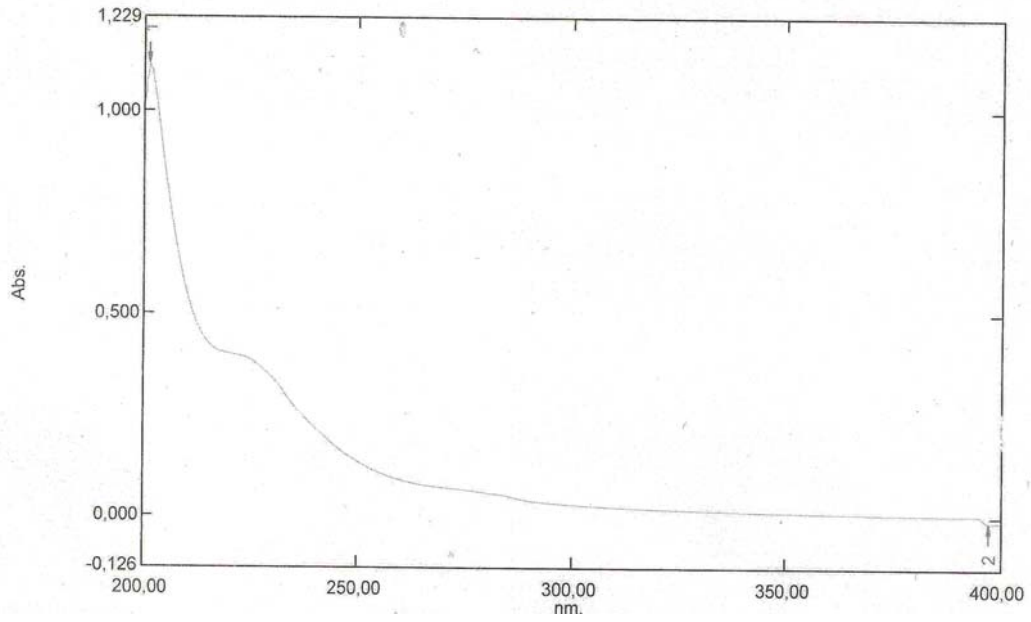
¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃, 500 MHz) (Şekil 4-9); δ 0,62 ile 0,96 arasında izlenen 6 metil piki bileşiğin bir steroid olduğunu düşündürdü. 7,96 ppm'de (1H, *s*) formil grubu, 4,66 ppm'de (1H, *m*) H-3 α , 5,32 ppm'de (1H, *d*, *J* = 4,88 Hz) vinilik proton (H-6) pikleri görüldü. ¹³C-NMR (APT) (CDCl₃, 125 MHz) (Şekil 4-10) δ 160,10'de formil grubu (OCHO), 73,00'de formil grubunun bağlı olduğu karbon (C-3), 138,33'de C-5 ve 121,98'de C-6 pikleri izlendi.

Literatürde verilen spektral değerler ile MLP-2'nin değerleri karşılaştırıldığında bileşiğin stigmast-5-en-3 β -il format (8 mg) olduğu belirlendi (Chumkaew ve ark 2010). MLP-2 bileşiği *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi.

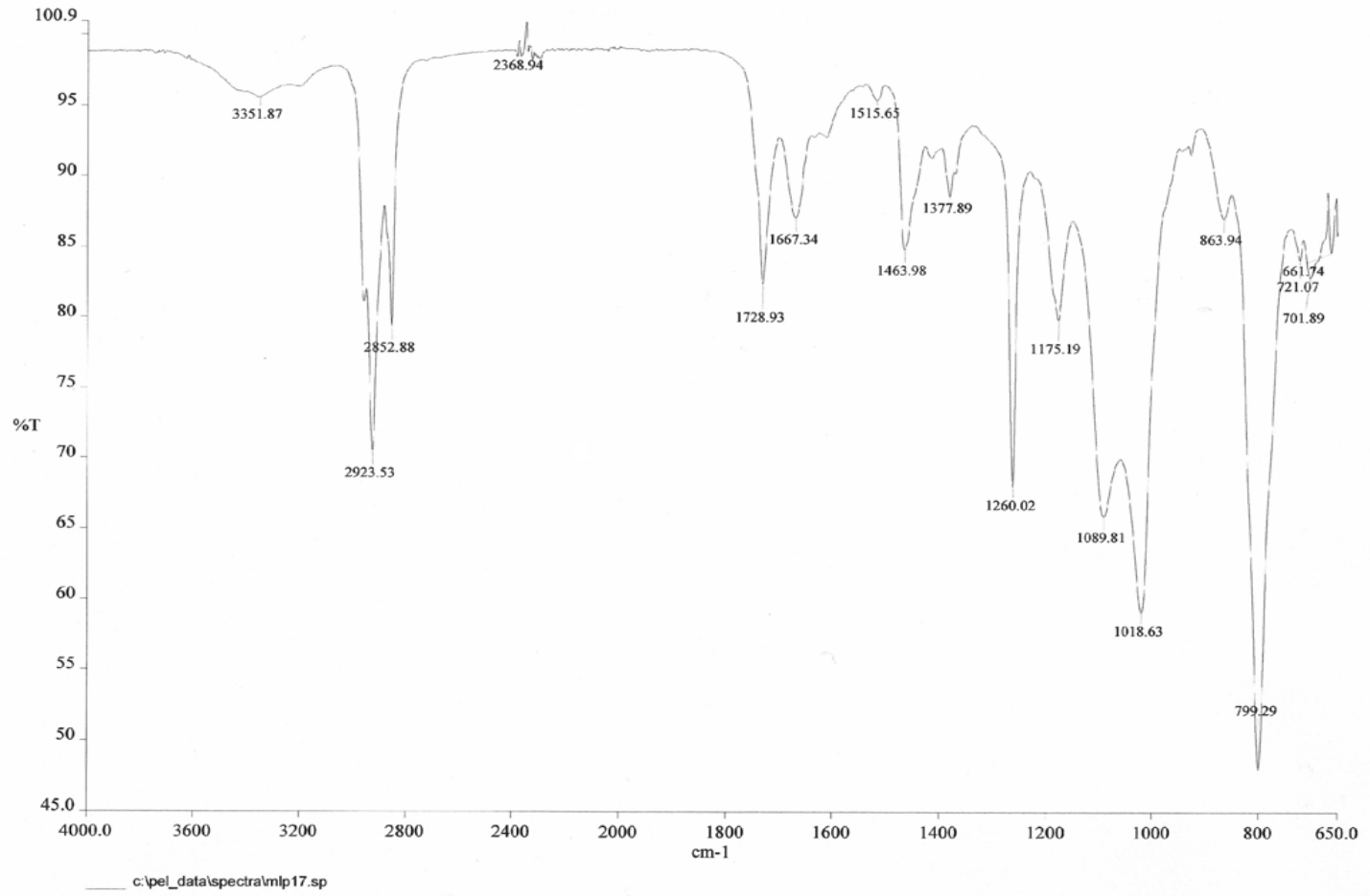
Spectrum Peak Pick Report

07.04.2011 13:38:14

Data Set: MLP17 - RawData - C:\Documents and Settings\pc\Desktop\File_110407_133751.spc



Şekil 4-7: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın UV Spektrumu



Şekil 4-8: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın IR Spektrumu

T.U.IAL
K.NO.864
A.ERTAS_MLP16_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP16_H1_26Aug2010

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl₃

Temp. 30.0 C / 303.1 K

File: PROTON

INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.892 sec

Width 7996.0 Hz

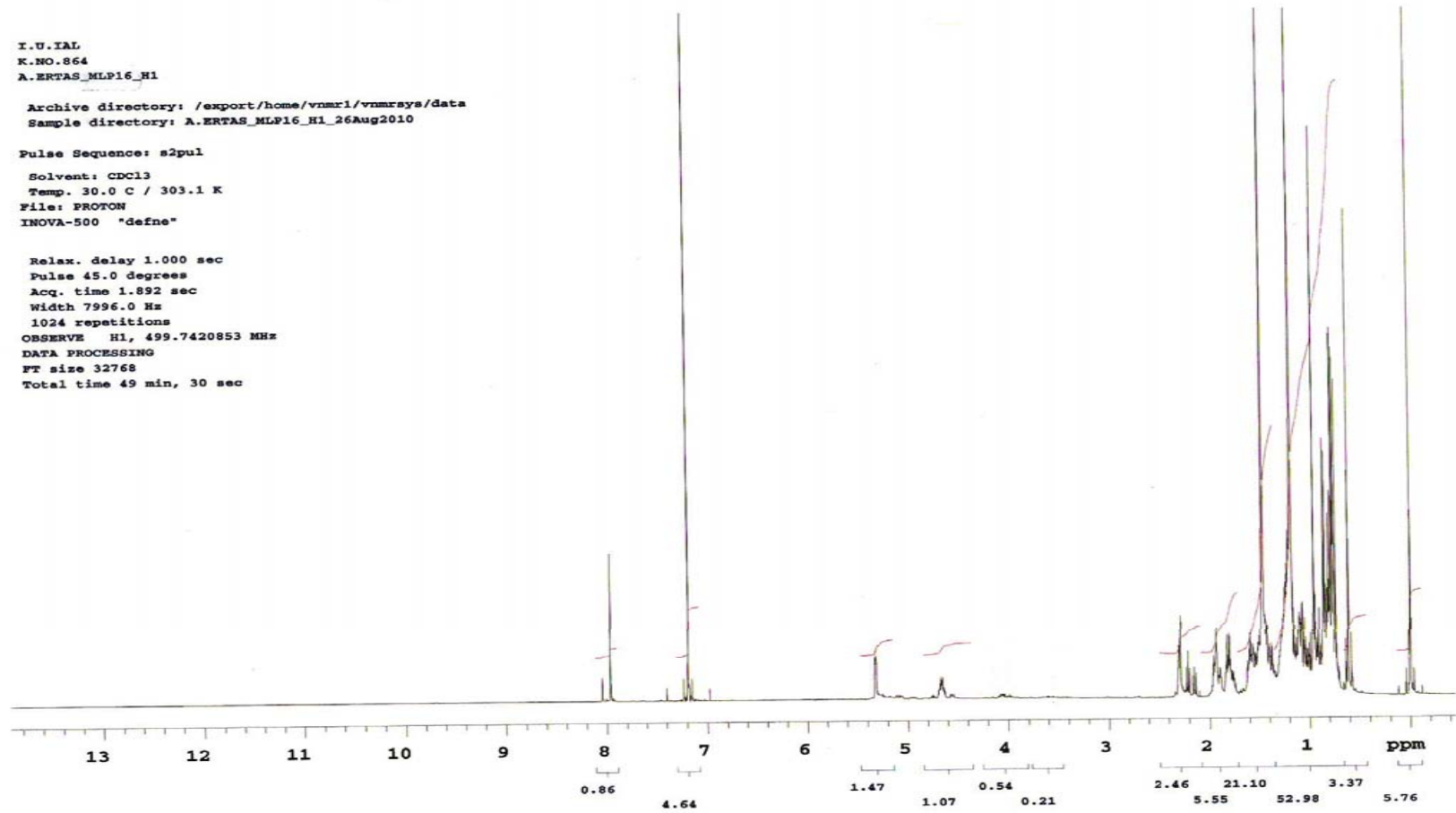
1024 repetitions

OBSERVE H1, 499.7420853 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 49 min, 30 sec



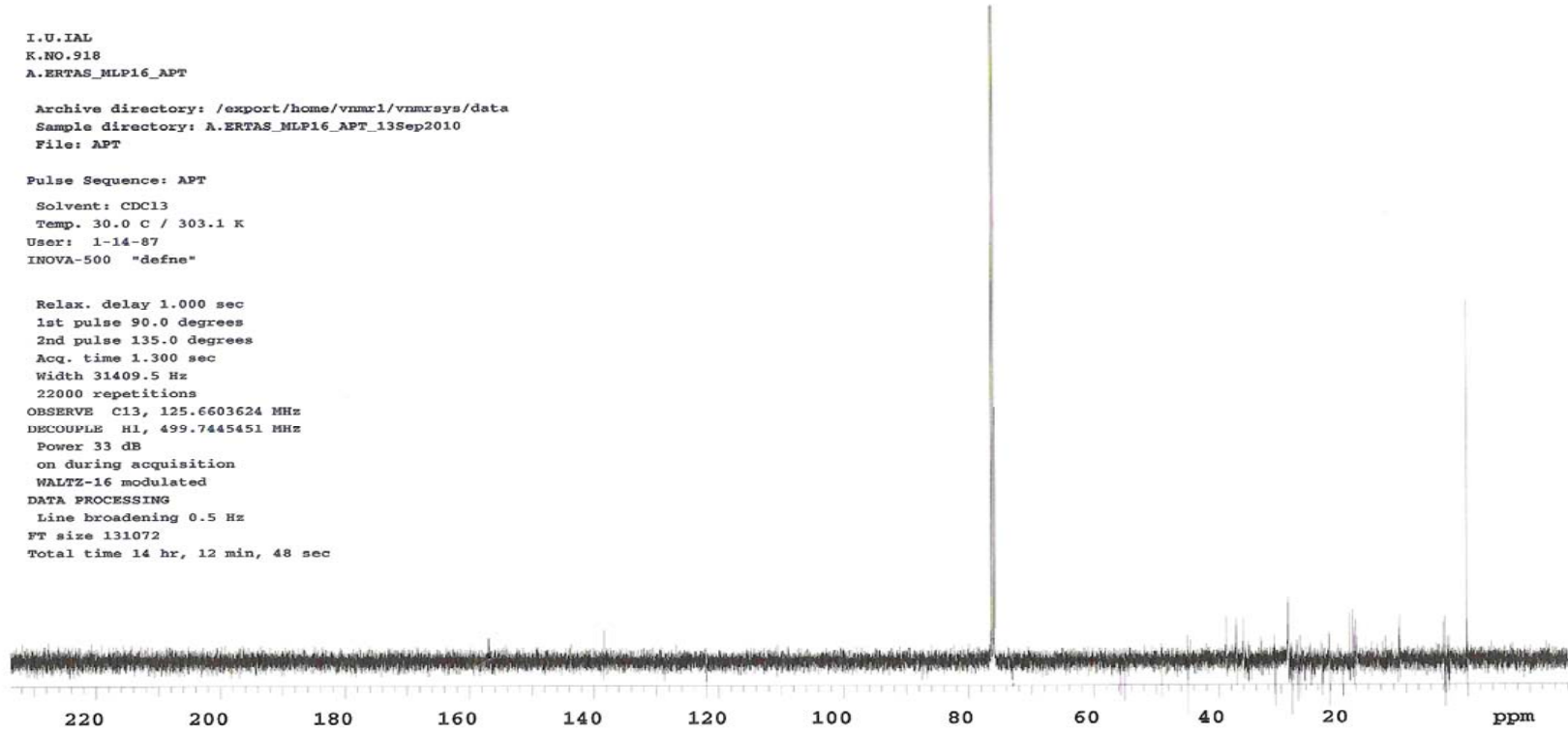
Şekil 4-9: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 500 MHz)

I.U.IAL
K.NO.918
A.ERTAS_MLP16_APT

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP16_APT_13Sep2010
File: APT

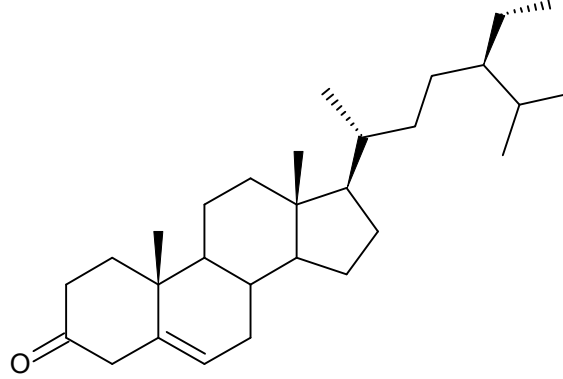
Pulse Sequence: APT
Solvent: CDCl₃
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
1st pulse 90.0 degrees
2nd pulse 135.0 degrees
Acq. time 1.300 sec
Width 31409.5 Hz
22000 repetitions
OBSERVE C13, 125.6603624 MHz
DECOUPLE H1, 499.7445451 MHz
Power 33 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131072
Total time 14 hr, 12 min, 48 sec



Şekil 4-10: Stigmast-5-en-3 β -il format'ın ¹³C-NMR Spektrumu (CDCl₃, 125 MHz)

4.5.1.2.3. MLP-3: Stigmast-5-en-3-on



Renksiz olan MLP-3 bileşiği amorf halde elde edildi. Silika jel plakta UV lamba (254 nm) altında görülmeyen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) açık sarı renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 209 nm'de absorpsiyon verdi (Şekil 4-11). IR spektrumunda (CHCl₃) 2918-2850 (C-H), 1736 (C=O), 1671 (C=C) cm⁻¹'de bantlar izlendi (Şekil 4-12).

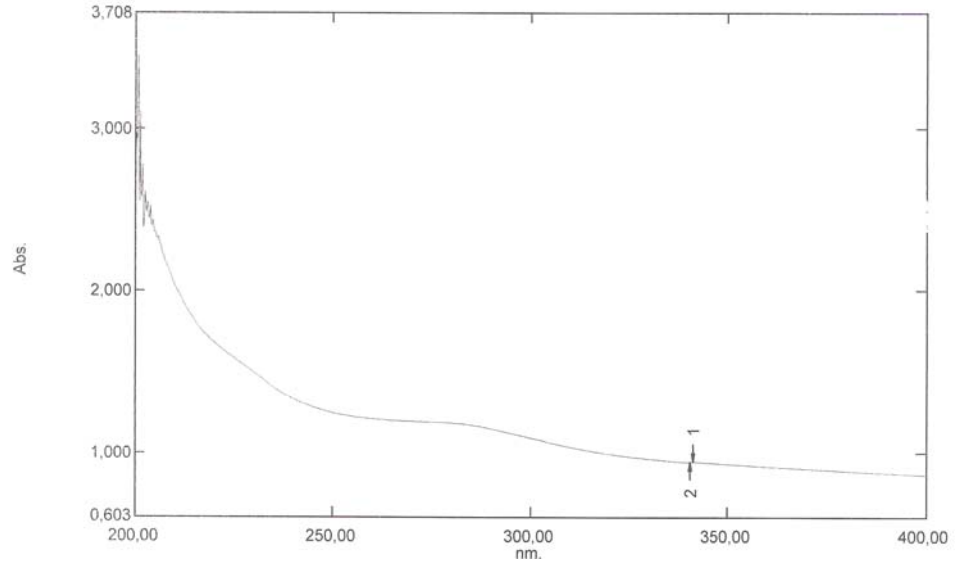
¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃, 500 MHz) (Şekil 4-13); δ 0,61 ile 0,95 arasında izlenen 6 metil piki bileşiğin bir steroid olduğunu gösterdi. 5,27 ppm'de (1H, *d*, *J* = 5,21 Hz) vinilik proton (H-6) piki görüldü. ¹³C-NMR (APT) (CDCl₃, 125 MHz) (Şekil 4-14) δ 199,13'de karbonil grubunun izlenmesi ve ¹H-NMR spektrumunda H-3'ün görülmemesi bu grubun C-3'de bulunduğunu gösterdi. ¹³C-NMR (APT) spektrumunda δ 138,25'de C-5 ve 122,32'de C-6 pikleri izlendi.

Literatürde verilen spektral değerler ile MLP-3'ün değerleri karşılaştırıldığında bileşiğin stigmast-5-en-3-on (6,8 mg) olduğu belirlendi (Chumkaew ve ark 2010). MLP-3 bileşiği *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi.

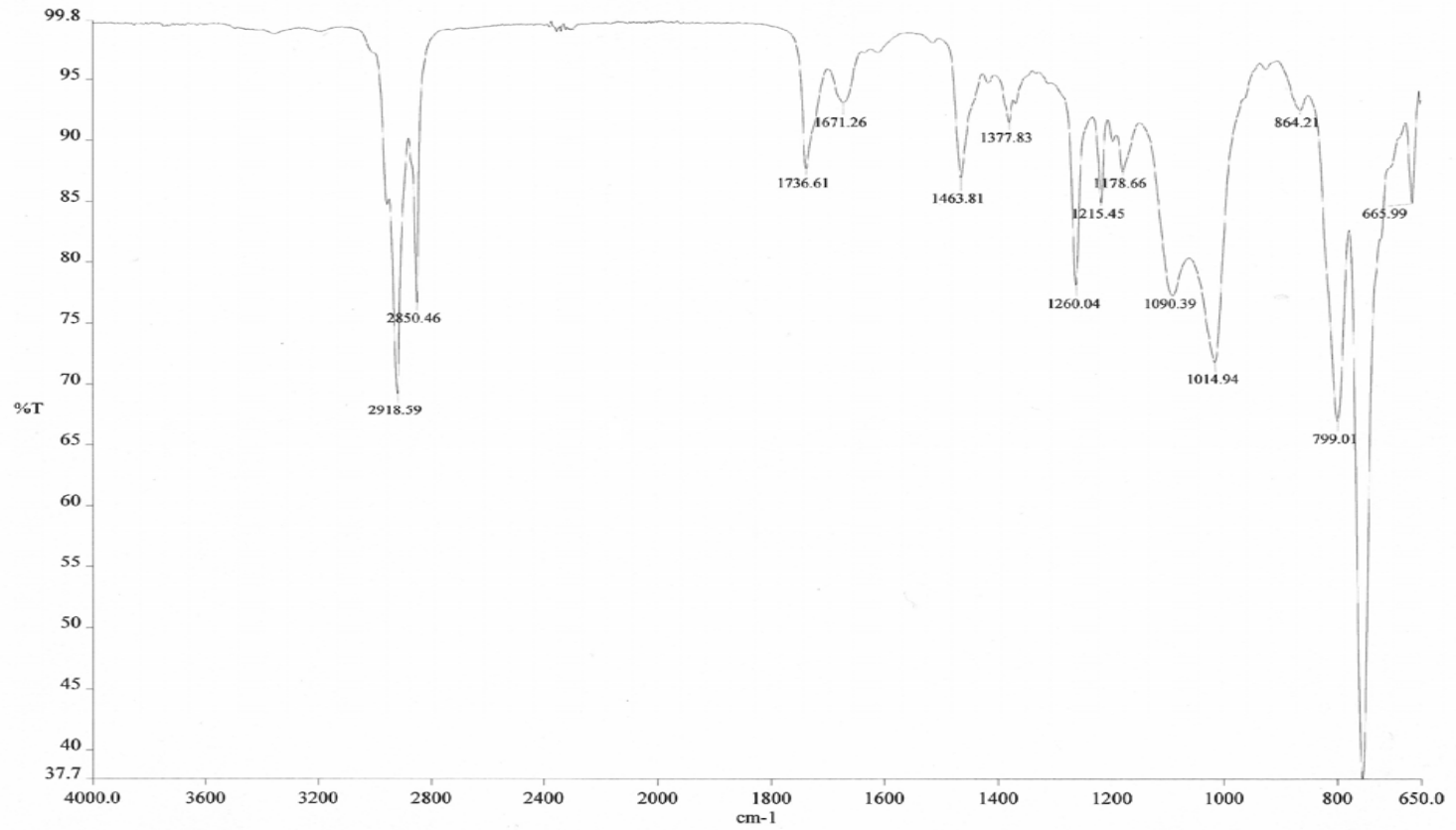
Spectrum Peak Pick Report

28.04.2011 13:08:00

Data Set: Storage 092555 - RawData - E:\TEZ\Uv Spektrumlar\YENÝMLP15.spc



Şekil 4-11: Stigmast-5-en-3-on'un UV Spektrumu



c:\documents and settings\spectrum 100\desktop\abdulselam_genel kimya\mlp15.sp

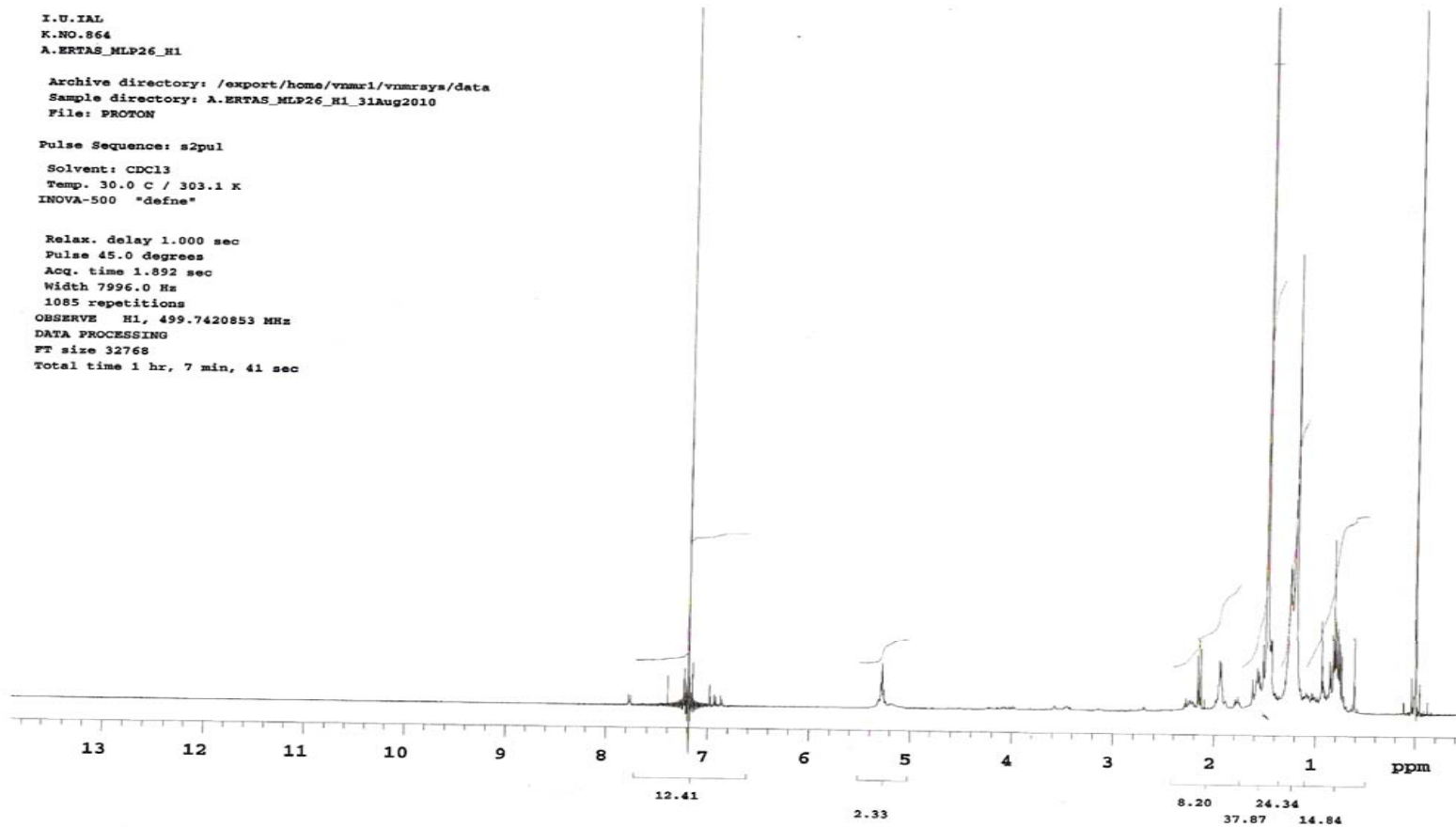
Şekil 4-12: Stigmast-5-en-3-on'un IR Spektrumu

I.U.IAL
K.NO.864
A.ERTAS_MLP26_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP26_H1_31Aug2010
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Temp. 30.0 C / 303.1 K
INNOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
1085 repetitions
OBSERVE H1, 499.7420853 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 1 hr, 7 min, 41 sec



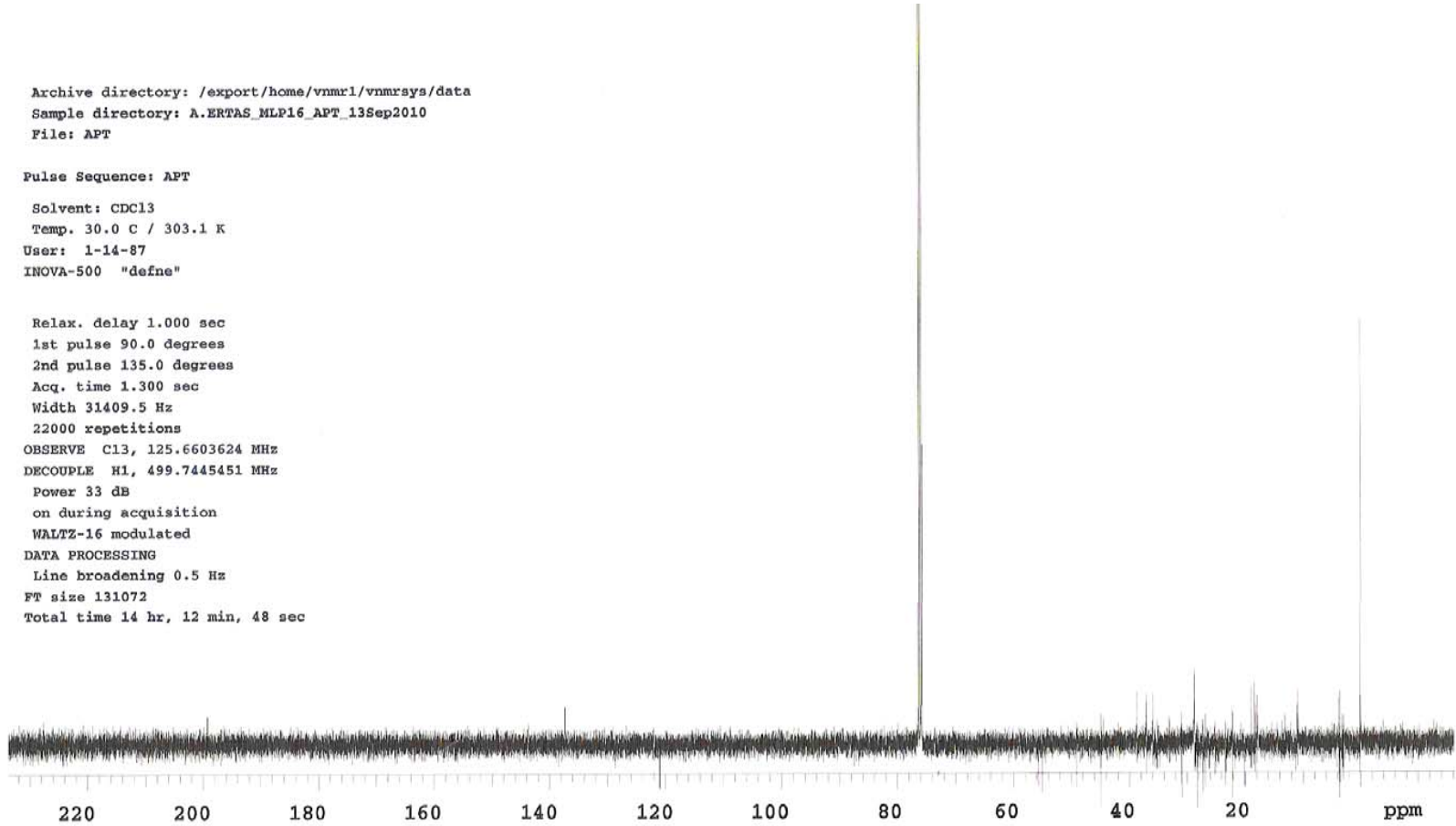
Şekil 4-13: Stigmast-5-en-3-on'un ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 500 MHz)

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP16_APT_13Sep2010
File: APT

Pulse Sequence: APT

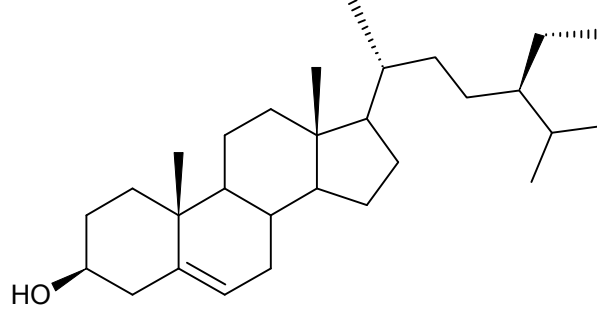
Solvent: CDCl₃
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
1st pulse 90.0 degrees
2nd pulse 135.0 degrees
Acq. time 1.300 sec
Width 31409.5 Hz
22000 repetitions
OBSERVE C13, 125.6603624 MHz
DECOUPLE H1, 499.7445451 MHz
Power 33 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131072
Total time 14 hr, 12 min, 48 sec



Şekil 4-14: Stigmast-5-en-3-on'un ¹³C-NMR (APT) Spektrumu (CDCl₃, 125 MHz)

4.5.1.2.4. MLP-4: β -Sitosterol



Renksiz olan MLP-4 bileşiği 4 mg olarak elde edildi. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110°C’de yakıldığında önce turkuaz sonra kahverengi renk aldı.

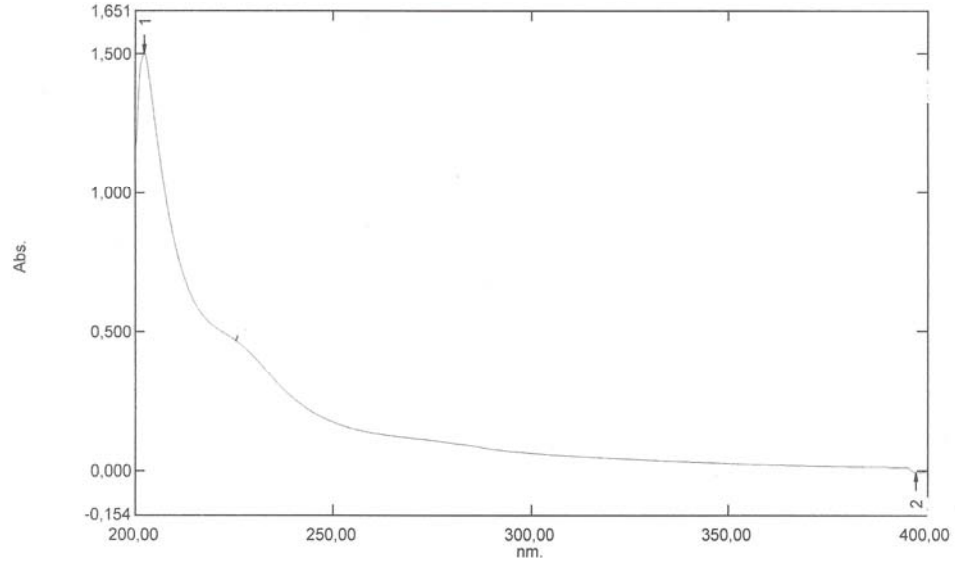
UV spektrumunda (MeOH) 203 nm’de uç absorpsiyon bandı görüldü (Şekil 4-15). ^1H NMR spektrumunda (CDCl_3 , 500 MHz) (Şekil 4-16) δ 0,61 (3H, *s*, Me-18), 0,94 (3H, *s*, Me-19), 0,87 (3H, *d*, $J = 6,43$ Hz, Me-21), 0,82 (3H, *d*, $J = 6,84$ Hz, Me-26), 0,78 (3H, *d*, $J = 6,84$ Hz, Me-27) ve 0,74’de (3H, *t*, $J = 7,82$ Hz, Me-29) metil pikleri, 3,48’de (1H, *m*) H-3 α piki ve 5,25’de (1H, *m*, H-6) vinilik protona ait sinyal izlendi.

İnce tabaka kromatografisinde yapılan karşılaştırma sonucunda standart madde ile aynı olduğu belirlenen MLP-5 bileşiğinin, spektral değerleri literatürde verilen değerler ile uyumlu olduğu belirlendi ve yapısı β -sitosterol olarak tespit edildi (Kolak ve ark. 2005).

Spectrum Peak Pick Report

07.04.2011 13:55:23

Data Set: MLP37 - RawData - C:\Documents and Settings\pc\Desktop\File_110407_135418.spc

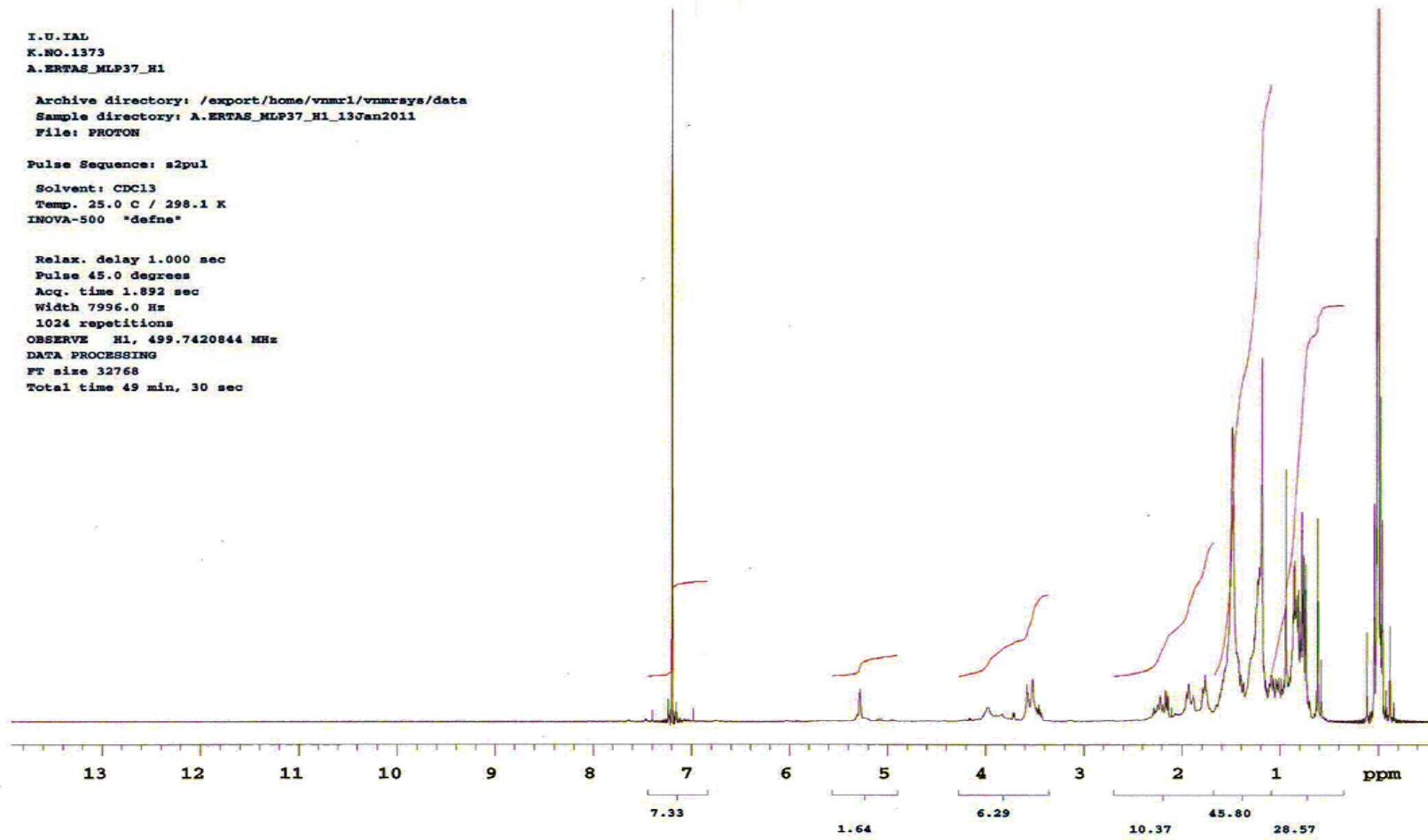
**Şekil 4-15: β -Sitosterol'un UV Spektrumu**

I.U.TAL
K.NO.1373
A.ERTAS_MLP37_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP37_H1_13Jan2011
File: PROTON

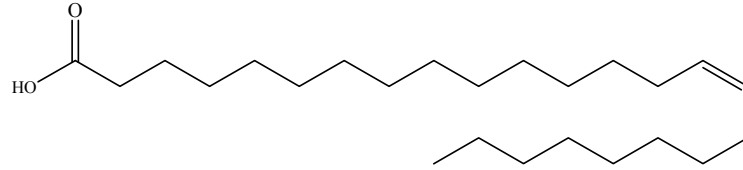
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
1024 repetitions
OBSERVE H1, 499.7420844 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 49 min, 30 sec



Şekil 4-16: β -Sitosterol'un ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 500 MHz)

4.5.1.2.5. MLP-5: Nervonik Asit



Renksiz olan MLP-5 bileşiği silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmedi, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110°C’de yakıldığında açık kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 201 ve 225 (omuz) nm’de absorpsiyon verdi (Şekil 4-17). IR spektrumunda (CHCl₃) 3358 (OH), 2957-2852 (C-H), 1734 (C=O), 1659-1632 (C=C) cm⁻¹’de bantlar izlendi (Şekil 4-18).

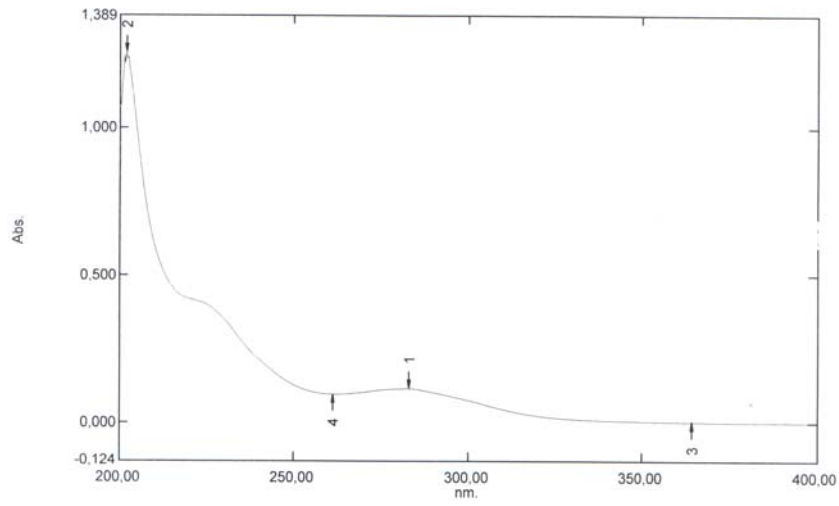
¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃, 500 MHz) (Şekil 4-19); δ 2,15’de (2H, *t*, *J* = 7,81 Hz) H-2, 1,57’de (2H, *pentet*, *J* = 7,83 Hz) H-3, 1,94’de (4H, *m*) H-14 ve H-17, 5,27-5,28’de (2H, *m*) H-15 ve H-16, 0,81’de (3H, *t*, *J* = 7,32 Hz) Me-24 ve 1,18-1,28’da (32H, *m*) metilen pikleri izlendi.

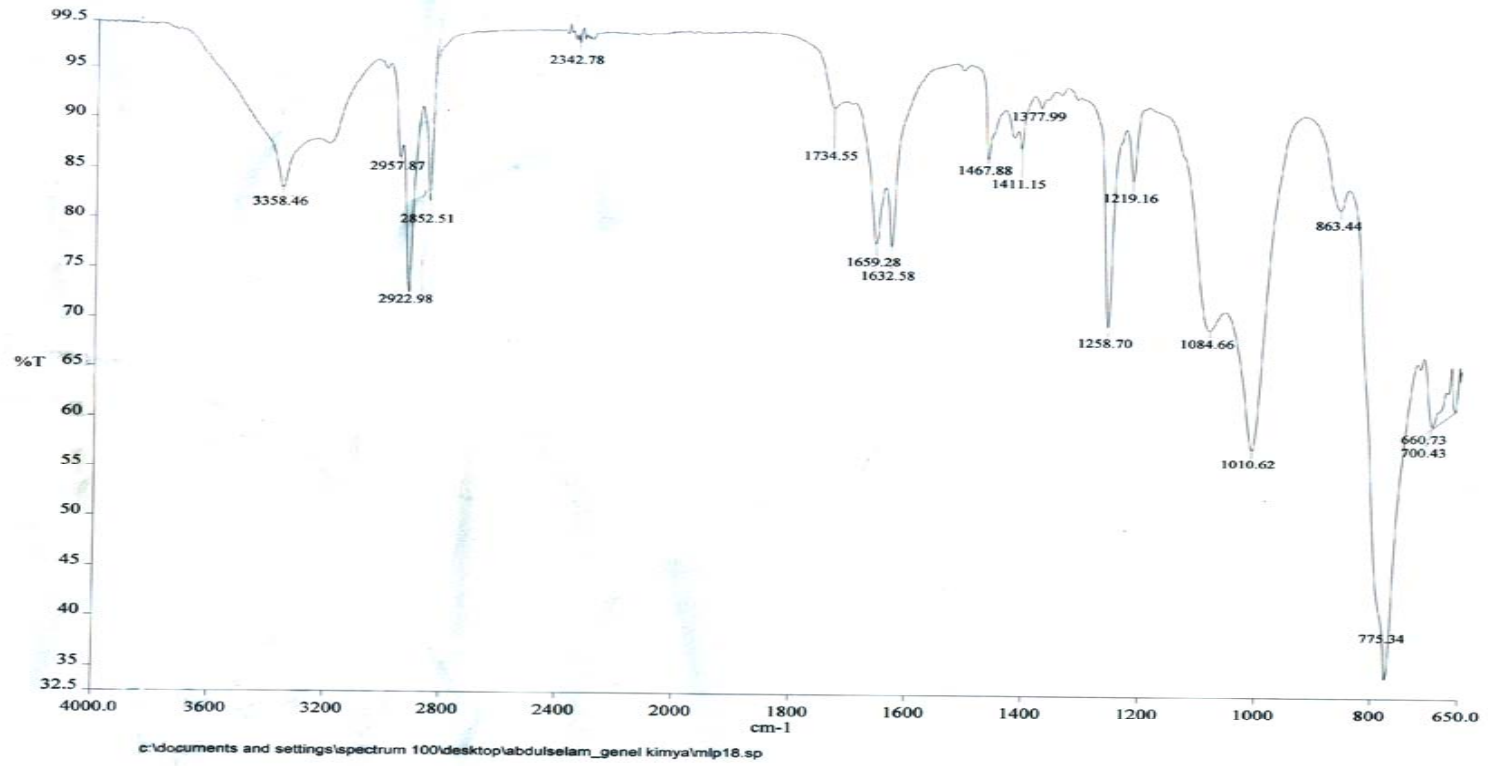
Literatürde verilen spektral değerler ile MLP-5’in değerleri karşılaştırıldığında bileşiğin nervonik asit ((15*Z*)-tetrakosenoik asit) (2 mg) olduğu belirlendi (Aires-de-Sousa, M. ve ark. 2002).

Spectrum Peak Pick Report

28.04.2011 13:15:43

Data Set: MLP18 - RawData - E:\TEZ\Uv Spektrumlar\YENÝ\MLP18.spc

**Şekil 4-17: Nervonik Asit'in UV Spektrumu**



Şekil 4-18: Nervonik Asit'in IR Spektrumu

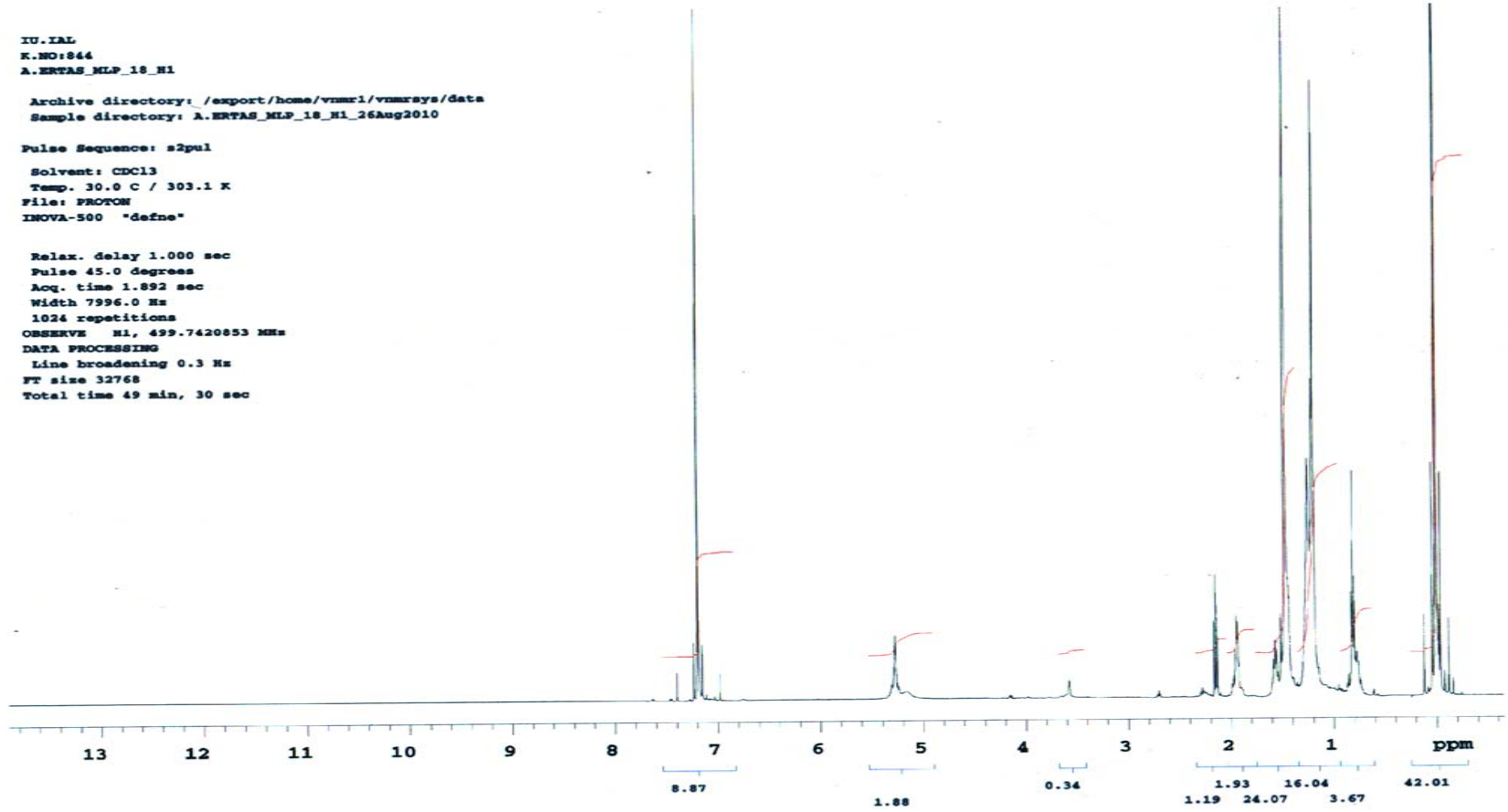
IU.LAL
K.NO:844
A.ERTAS_MLP_18_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsws/data
Sample directory: A.ERTAS_MLP_18_H1_26Aug2010

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl₃
Temp. 30.0 C / 303.1 K
File: PROTON
INOVA-500 "define"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
1024 repetitions
OBSERVE H1, 499.7420853 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 32768
Total time 49 min, 30 sec



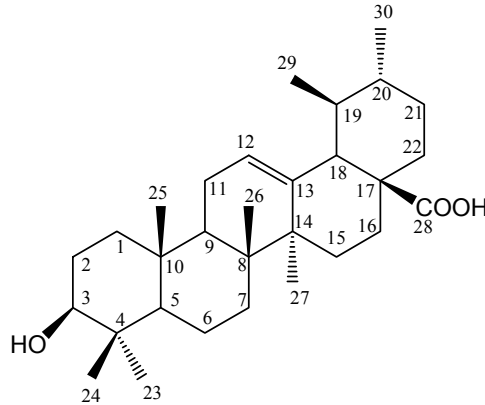
Şekil 4-19: Nervonik Asit'in ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃ , 500 MHz)

4.5.2. *M. longifolia* subps. *noeana*'nın Aseton Ekstresinin (MLA) Fraksiyonlandırılması

MLA silika jel içeren sütunda fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı, %5 çözücü polaritesi artırılarak sırasıyla kloroform, aseton ve metanol elüsyona ile devam edildi, %100 metanole ulaşılınca elüsyon tamamlandı. İTK ile benzer fraksiyonlar birleştirildi. Toplam 27 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlara silika jel ve Sephadex LH-20 sütun, silika jel preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak 2 saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıldı. Aseton ekstresinden (28,5 g) 10 g (verim %35) ursolik asit elde edildi, bu nedenle *M. longifolia* subps. *noeana* bitkisi ursolik asit kaynağı olarak değerlendirilebilir.

4.5.2.1. MLA'dan Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri

4.5.2.1.1. MLA-1: Ursolik Asit

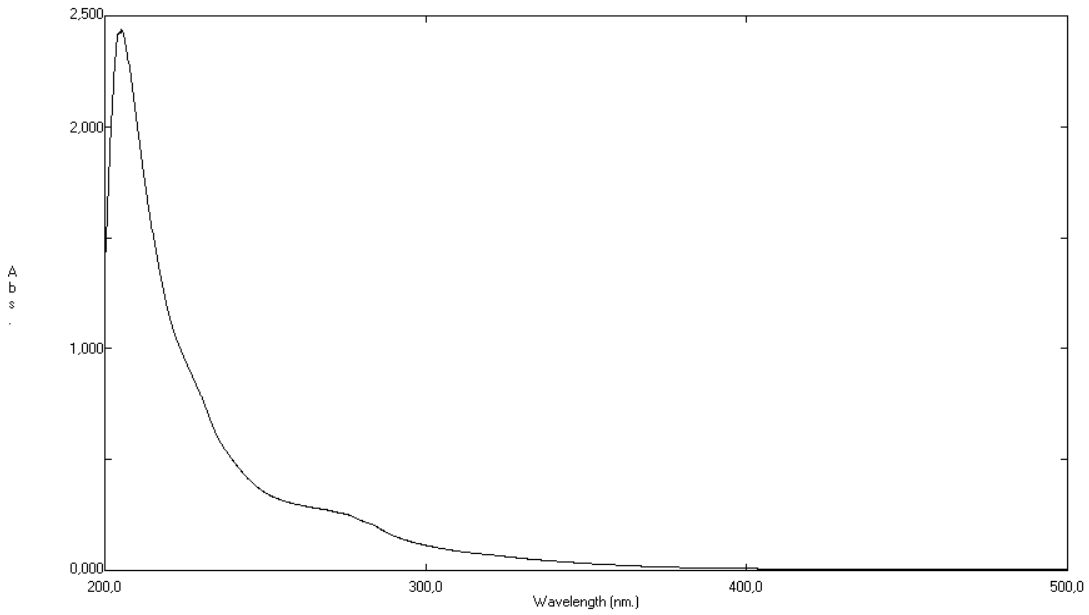


Beyaz renkli olan MLA-1 bileşiği amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında görülmeyen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) erguvan renk aldı.

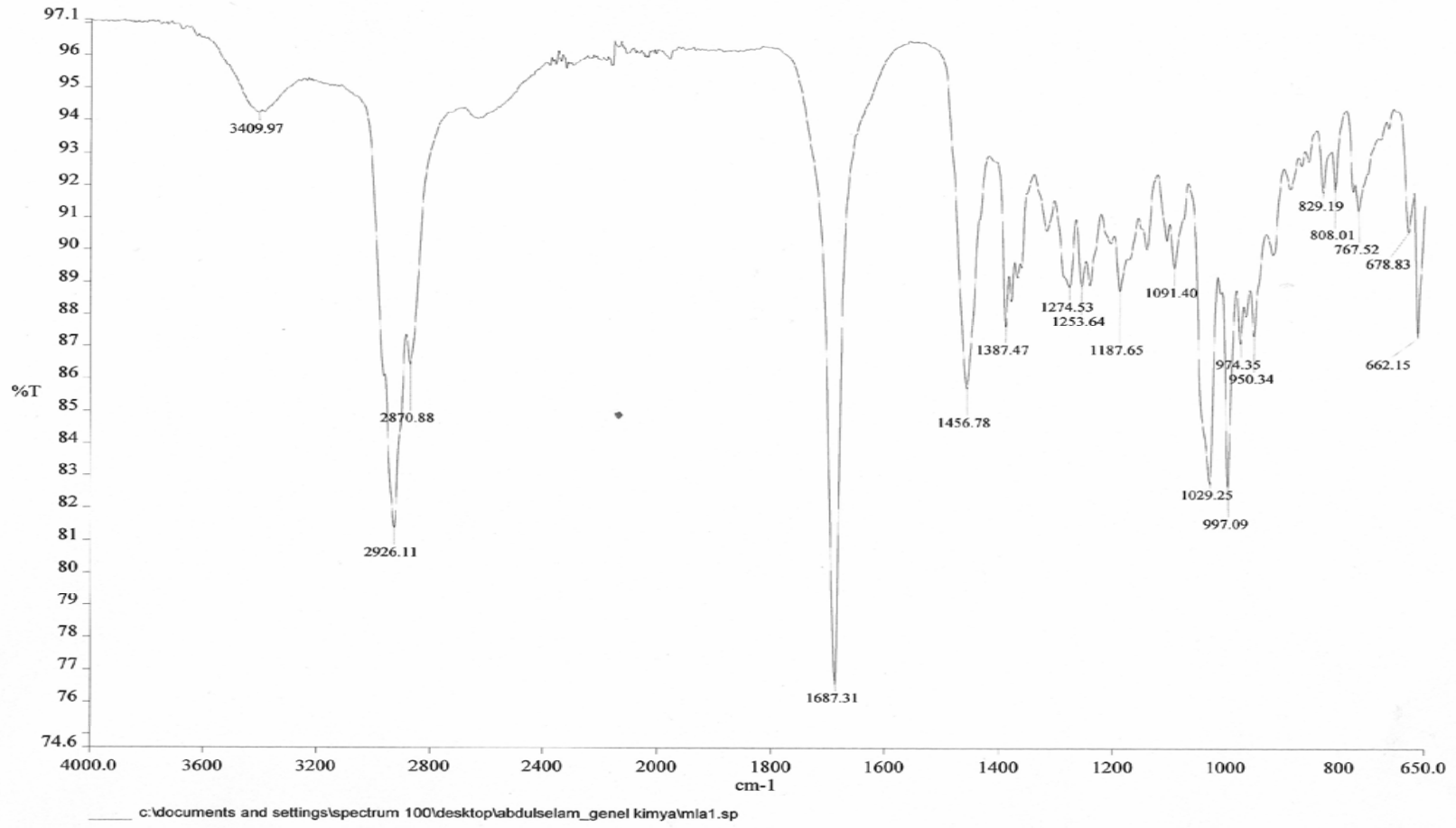
UV spektrumunda (MeOH) 211 nm'de absorpsiyon verdi (Şekil 4-20). IR spektrumunda (CHCl_3) 3409 (OH), 2926-2870 (C-H), 1687 (COOH) cm^{-1} 'de bantlar izlendi (Şekil 4-21).

^1H -NMR spektrumunda (CDCl_3 , 600 MHz) (Şekil 4-22); δ 0,70 (3H, *s*, Me-23), 0,72 (3H, *s*, Me-24), 0,96 (3H, *s*, Me-25), 0,85 (3H, *s*, Me-26), 1,05 (3H, *s*, Me-27) ve 0,87 (6H, *d*, $J = 7,00$ Hz, Me-29 ve Me-30)'de 7 metil piki izlendi. 3,15 ppm'de (1H, *dd*, $J = 5,00$; 10,00 Hz) hidroksil grubuna komşu proton (H-3 α), 5,18 ppm'de (1H, *t*, $J = 4,00$ Hz) vinilik proton (H-12) pikleri görüldü. ^{13}C -NMR (Şekil 4-23) (APT) (CDCl_3 , 125 MHz) δ 38,73 (C-20) ve 38,76'da (C-19) izlenen pikler triterpenin ursan tipi olduğunu gösterdi.

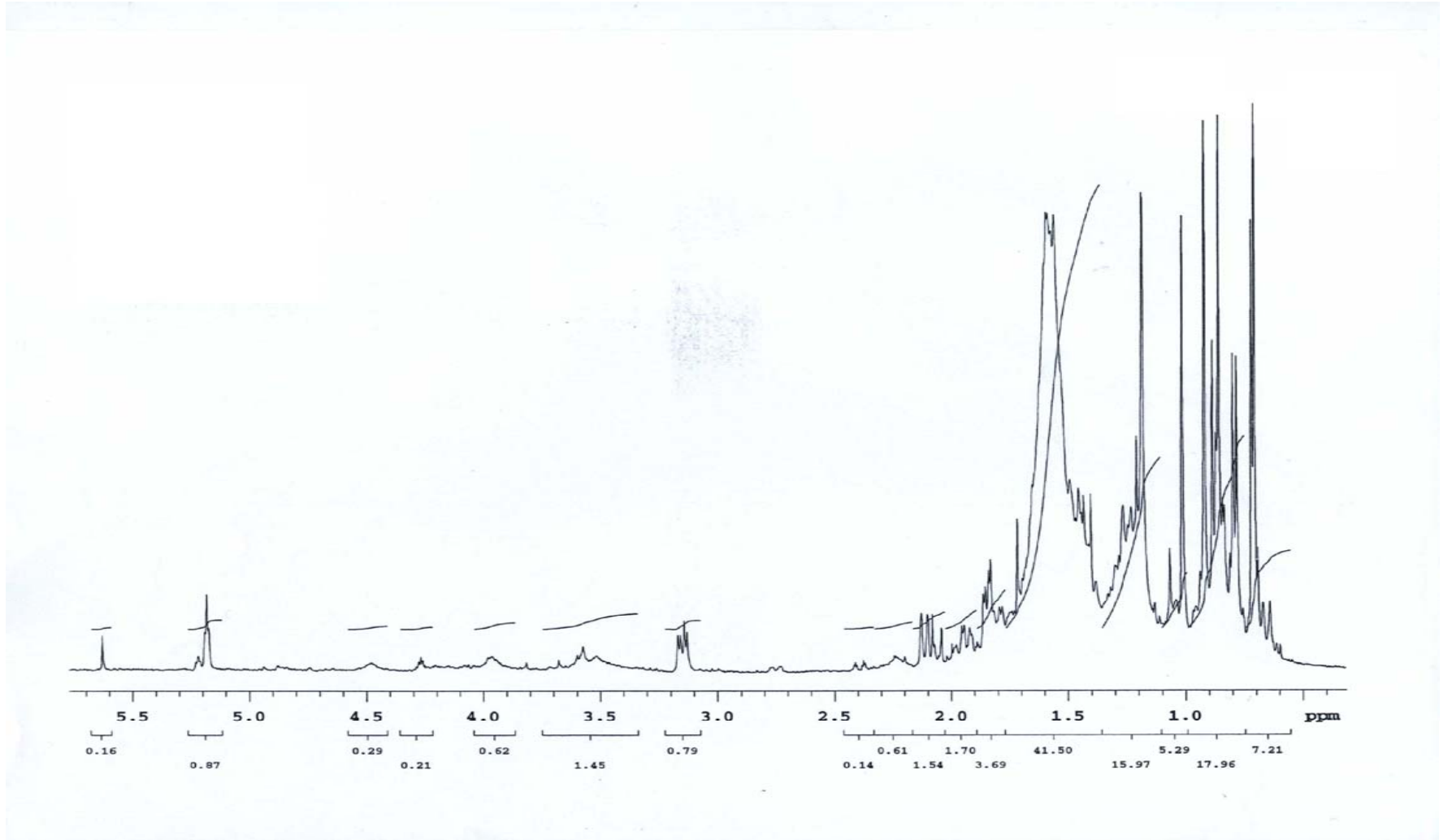
İTK'da standart madde ile ve literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında MLA-1 bileşiğinin ursolik asit (10 g) olduğu belirlendi (Öztürk ve ark. 2011)



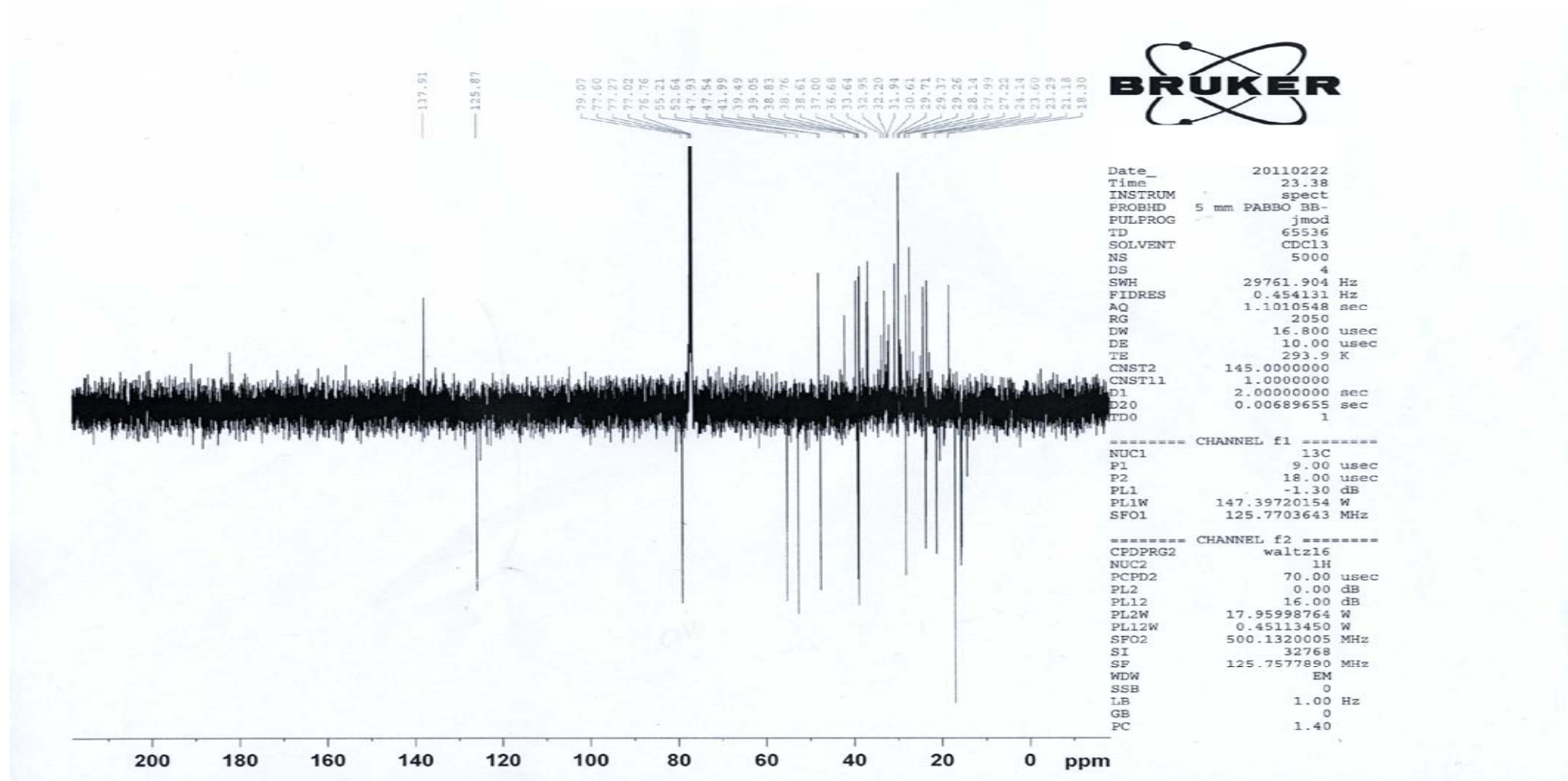
Şekil 4-20: Ursolik Asit'in UV Spektrumu



Şekil 4-21: Ursolik Asit'in IR Spektrumu

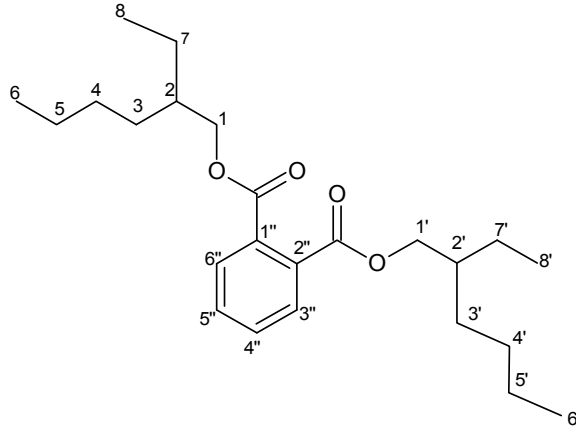


Şekil 4-22: Ursolik Asit'in ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



Şekil 4-23: Ursolik Asit'in ^{13}C -NMR (APT) Spektrumu (CDCl_3 , 125 MHz)

4.5.2.1.2. MLA-2: Bis(2-Etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat



Renksiz olan MLA-2 bileşiği amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında açık mor görülen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) önce sarı bekleyince mor renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 206, 225 ve 275 nm'de absorpsiyon verdi (Şekil 4-24). IR spektrumunda (CHCl_3) 2958-2860 (C-H), 1724 (C=O), 1600-1580 (doymamışlık) cm^{-1} 'de bantlar izlendi (Şekil 4-25)

^1H -NMR spektrumunda (CD_3COCD_3 , 500 MHz) (Şekil 4-26); δ 7,64 (2H, *dd*, $J = 3,42; 5,86$ Hz) H-3'' ve H-6'', 7,54 (2H, *dd*, $J = 3,42; 5,86$) H-4'' ve H-5'', 4,10 (4H, *pentet*, $J = 5,86$ Hz) H-1 ve H-1', 1,58 (2H, *m*) H-2 ve H-2', 1,32-1,22 (8 CH_2 , *m*), 0,82 (6H, *t*, $J = 5,00$ Hz) Me-6 ve Me-6', 0,78 (6H, *t*, $J = 5,00$ Hz) Me-8 ve Me-8' pikleri izlendi. ^{13}C -NMR (APT) (CD_3COCD_3 , 125 MHz), HMQC ve HMBC spektrumları (Şekil 4-27-4-29) (Tablo 4-5) değerlendirildiğinde ve literatürde verilen spektral değerler ile MLA-2'nin spektral değerleri karşılaştırıldığında MLA-2 bileşiğinin bis(2-etilhekzil) benzen-1,2-dikarboksilat (3 mg) olduğu belirlendi (Katade ve ark. 2006). MLA-2 bileşiği *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi.

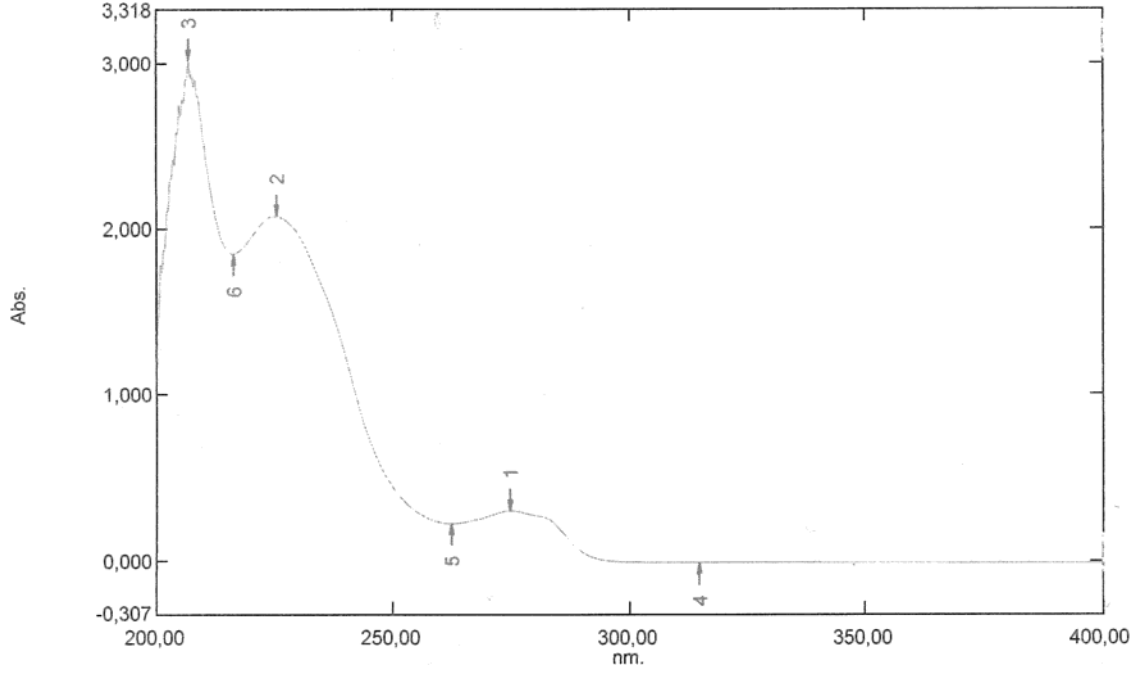
Tablo 4-5: MLA-2' nin ^{13}C -NMR, HMQC ve HMBC Değerleri

Pozisyon	^{13}C -NMR	HMQC	HMBC
1, 1'	67,70	4,10	H-2,H-2', H-3, H-3'
2, 2'	39,04	1,58	H-1, H-1', H-3, H-3', H-4, H-4'
3, 3'	30,53	1,32-1,22	
4, 4'	28,69	1,32-1,22	
5, 5'	22,96	1,22	
6, 6'	10,65	0,82	
7, 7'	23,86	1,34	
8, 8'	13,64	0,78	
1'', 2''	132,82	---	H-4'', H-5''
4'', 5''	131,35	7,54	H-3'', H-6''
3'', 6''	128,97	7,64	H-4'', H-5''
C=O	167,36	---	H-1, H-1', H-3'', H-6''

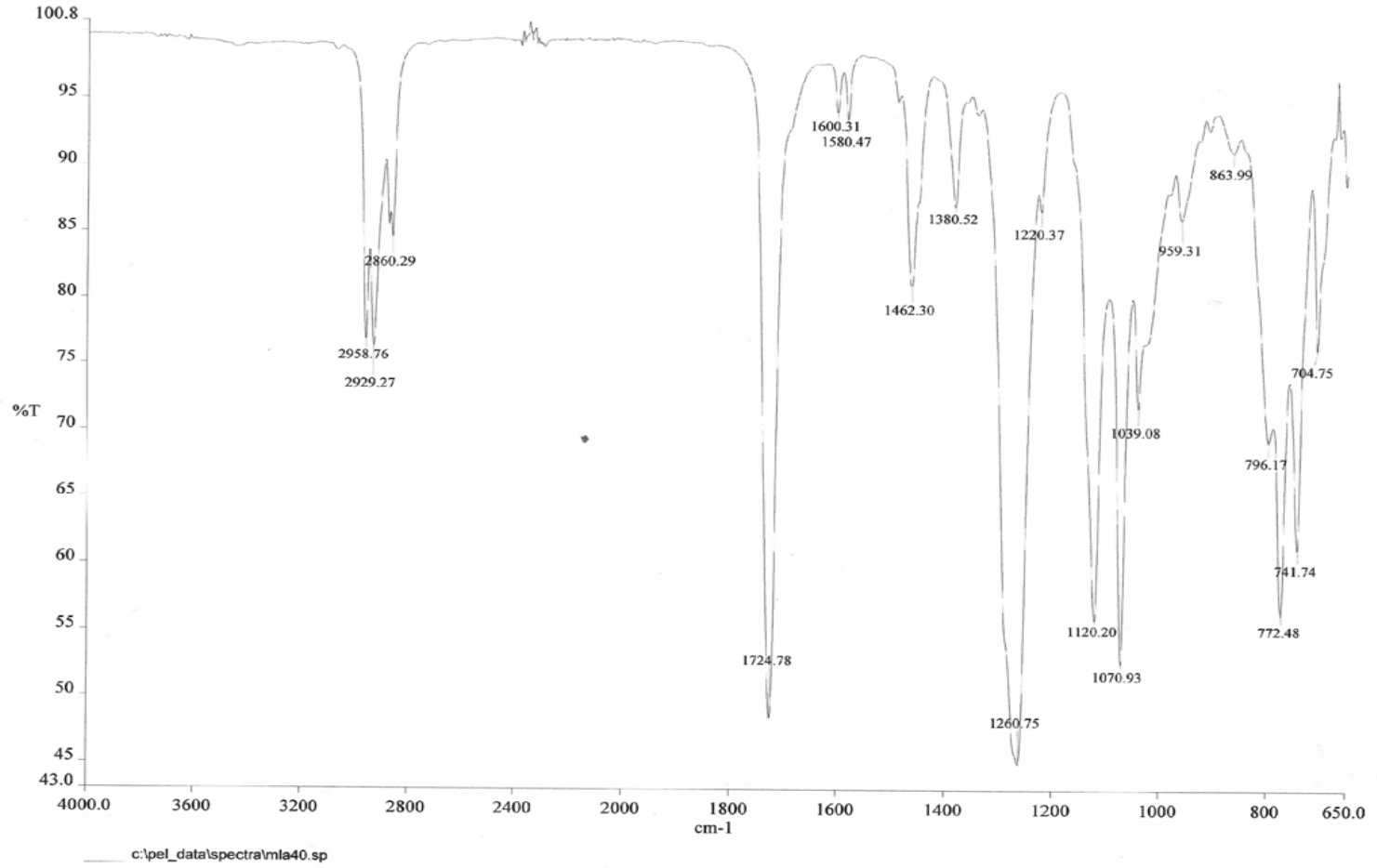
Spectrum Peak Pick Report

12.04.2011 10:08:51

Data Set: MLA40 - RawData - C:\Documents and Settings\pc\Desktop\MLA40.spc



Şekil 4-24: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın UV Spektrumu



Şekil 4-25: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın IR Spektrumu

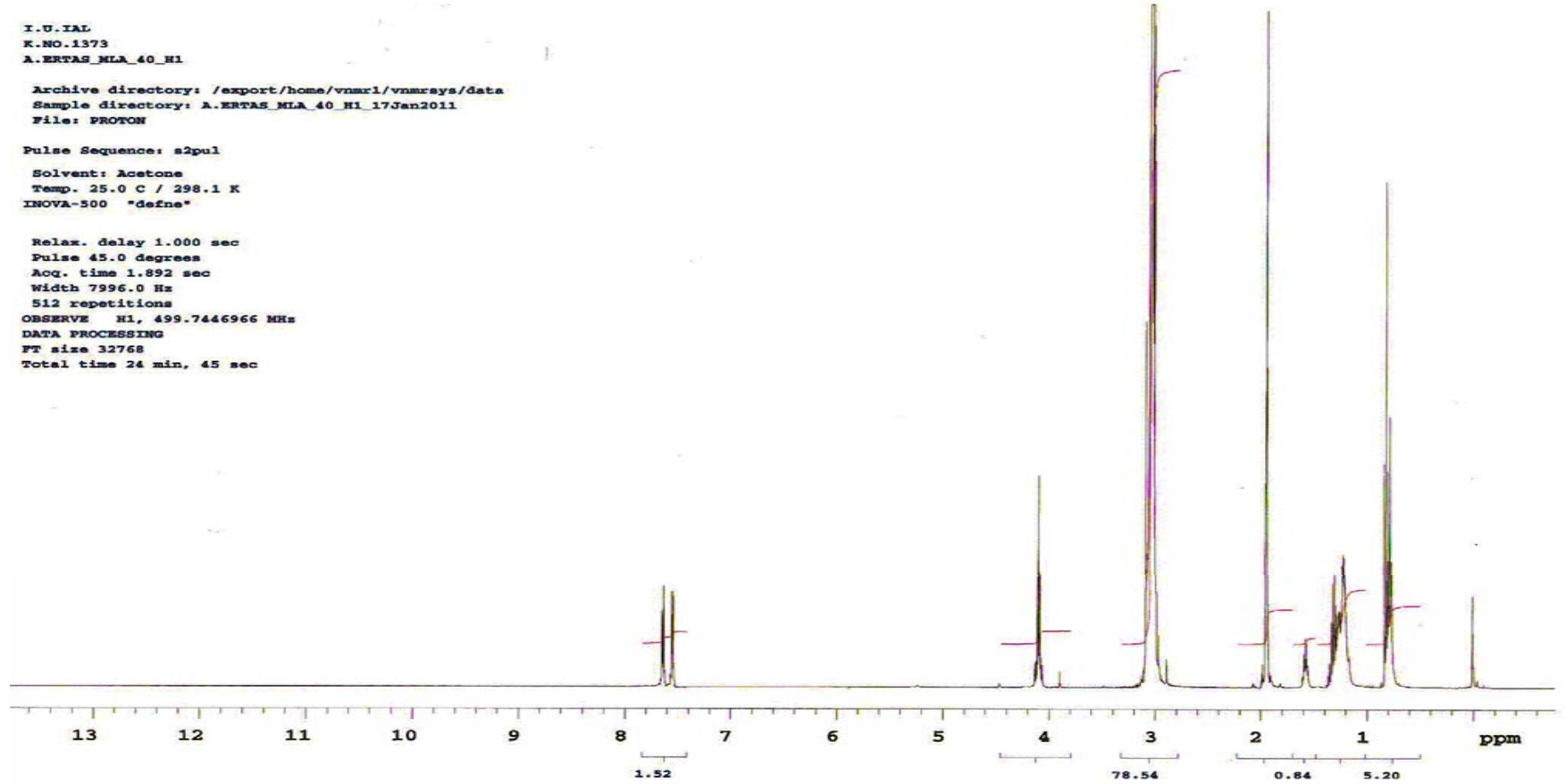
I.U.IAL
K.NO.1373
A.ERTAS_MLA_40_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLA_40_H1_17Jan2011
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: Acetone
Temp. 25.0 C / 298.1 K
INNOVA-500 "define"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
512 repetitions
OBSERVE H1, 499.7446966 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 24 min, 45 sec



Şekil 4-26: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın ¹H-NMR Spektrumu (CD₃COCD₃, 500 MHz)

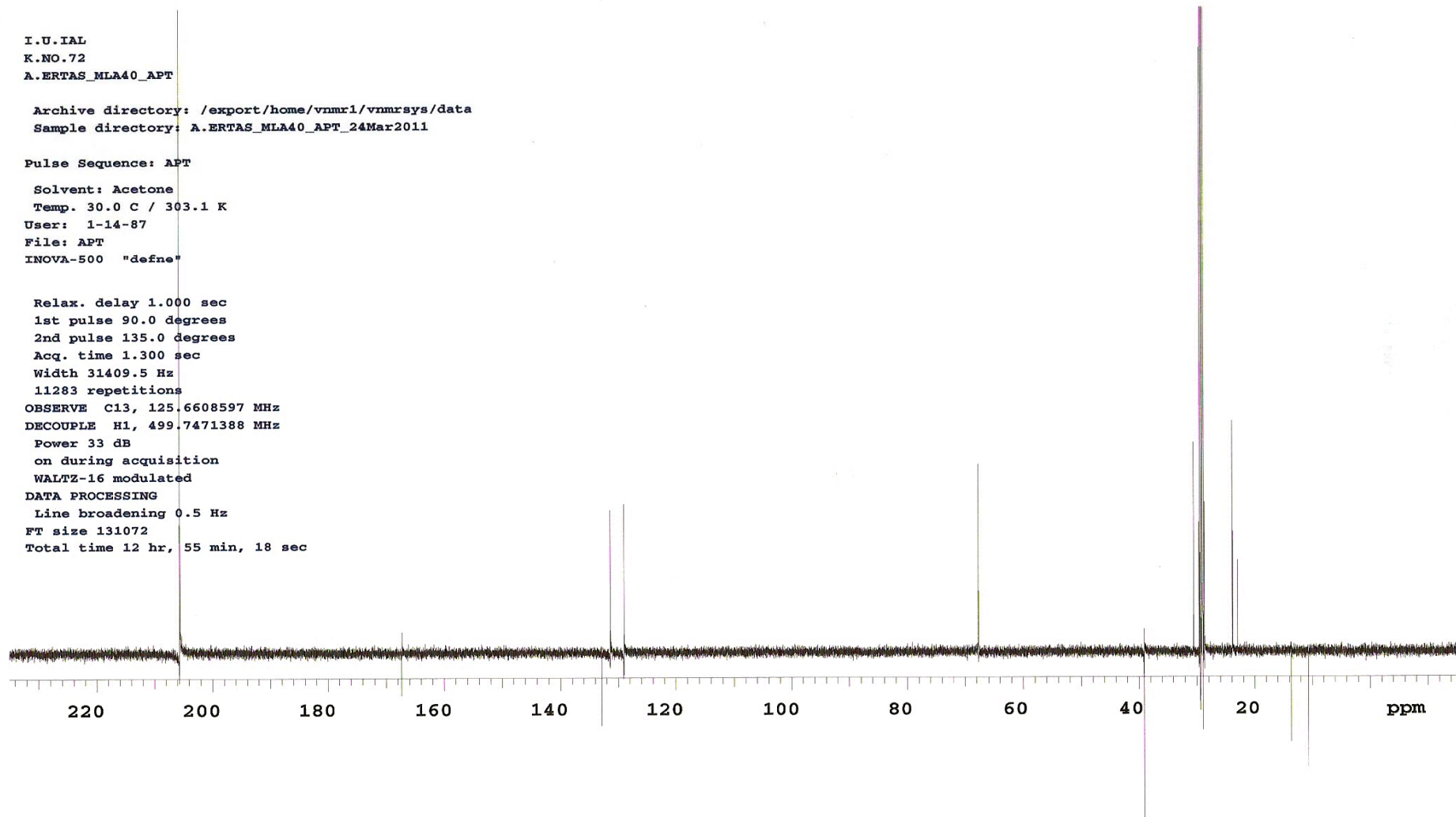
I.U.IAL
K.NO.72
A.ERTAS_MLA40_APT

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLA40_APT_24Mar2011

Pulse Sequence: APT

Solvent: Acetone
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
File: APT
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
1st pulse 90.0 degrees
2nd pulse 135.0 degrees
Acq. time 1.300 sec
Width 31409.5 Hz
11283 repetitions
OBSERVE C13, 125.6608597 MHz
DECOUPLE H1, 499.7471388 MHz
Power 33 dB
on during acquisition
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 131072
Total time 12 hr, 55 min, 18 sec



Şekil 4-27: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın ¹³C-NMR (APT) Spektrumu (CD₃COCD₃, 125 MHz)

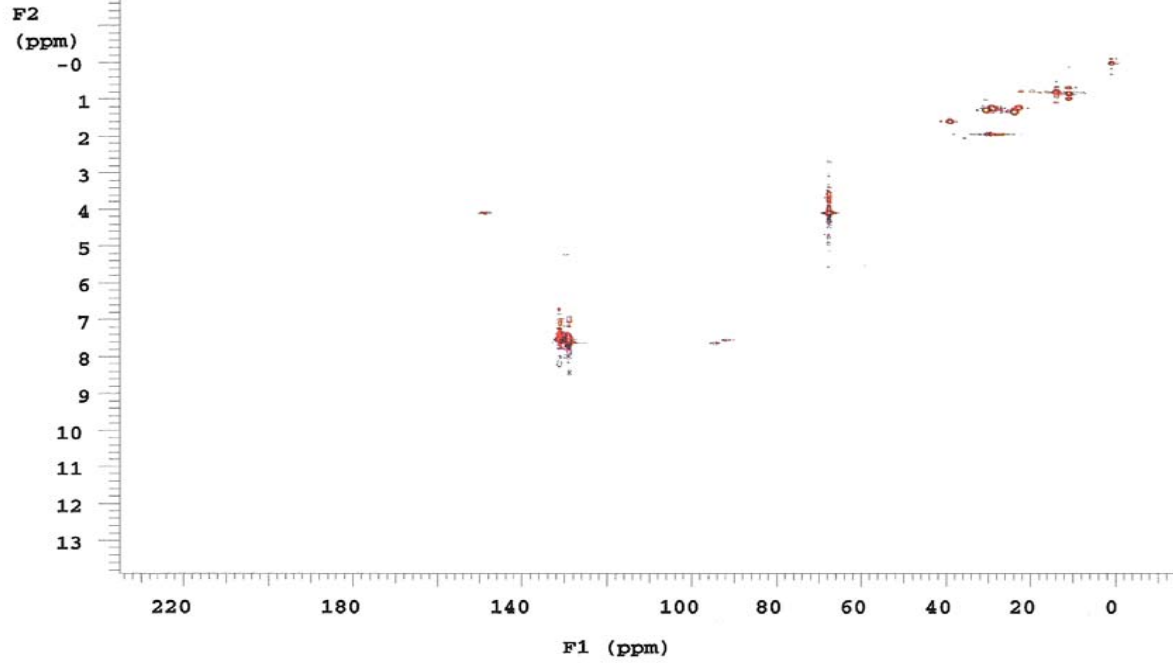
I.U.IAL
K.NO.172
A.ERTAS_MLA40_2D

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLA40_2D_23Mar2011

Pulse Sequence: gHMQC

Solvent: Acetone
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
File: gHMQC
INNOVA-500 "define"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.128 sec
Width 7996.0 Hz
2D Width 31409.5 Hz
128 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE H1, 499.7447034 MHz
DECOUPLE C13, 125.6746823 MHz
Power 44 dB
on during acquisition
off during delay
W40_ID_6435 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.059 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.011 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 10 hr, 45 min, 44 sec



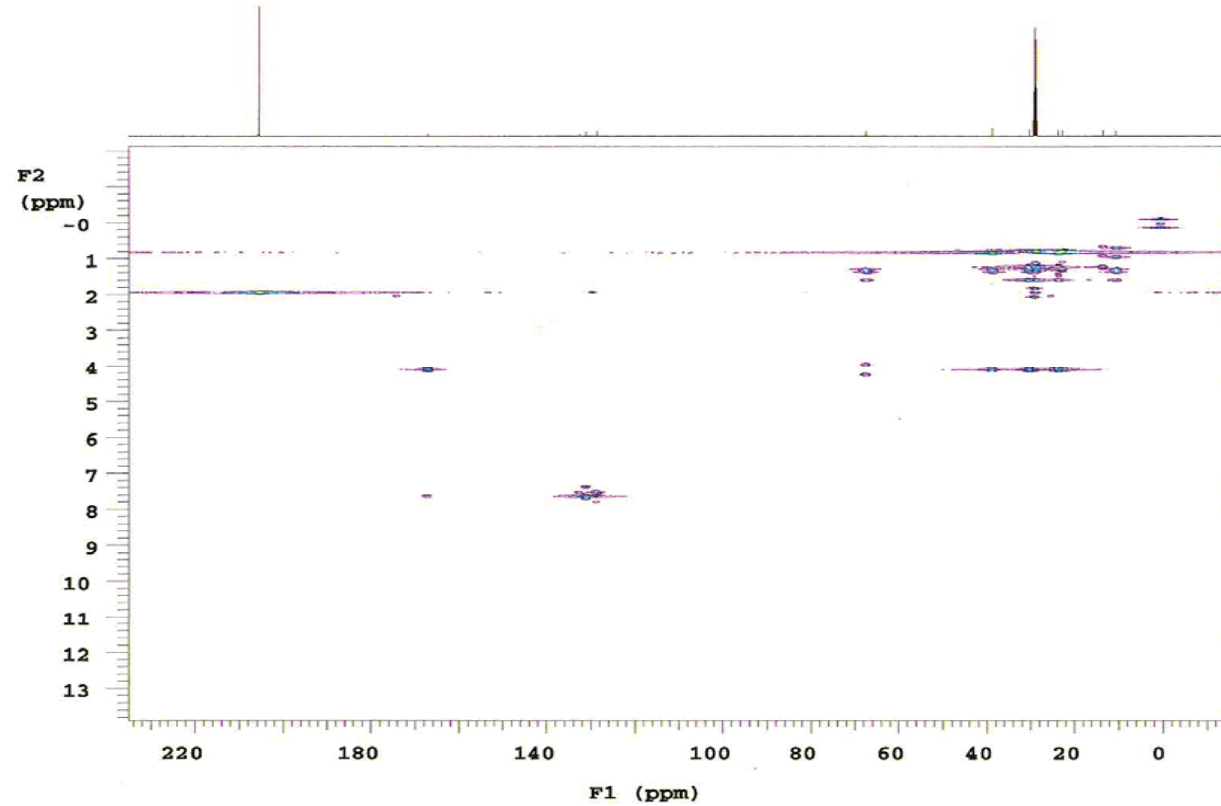
Şekil 4-28: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın HMQC Spektrumu (CD₃COCD₃)

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrdata
Sample directory: A.ERTAS_MLA40_2D_23Mar2011

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: Acetone
Temp. 30.0 C / 303.1 K
User: 1-14-87
File: gHMBC
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.128 sec
Width 7996.0 Hz
2D Width 31409.5 Hz
128 repetitions
250 increments
OBSERVE H1, 499.7447034 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.064 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.007 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 10 hr, 48 min, 0 sec



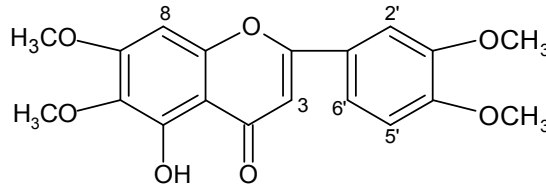
Şekil 4-29: Bis(2-etilhekzil) Benzen 1,2-Dikarboksilat'ın HMBC Spektrumu (CD₃COCD₃)

4.5.3. *M. longifolia* subps. *noeana* Bitkisinin Metanol Ekstresinin (MLM) Fraksiyonlandırılması

MLM silika jel içeren sütunda fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve elüsyona %5 çözücü polaritesi artırılarak sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile devam edildi, %100 metanole ulaşıncaya elüsyon tamamlandı. İTK ile benzer fraksiyonlar birleştirildi. Toplam 12 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlardan silika jel ve Sephadex LH-20 sütun, silika jel preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri kullanılarak 3 saf madde elde edildi. Saf bileşiklerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

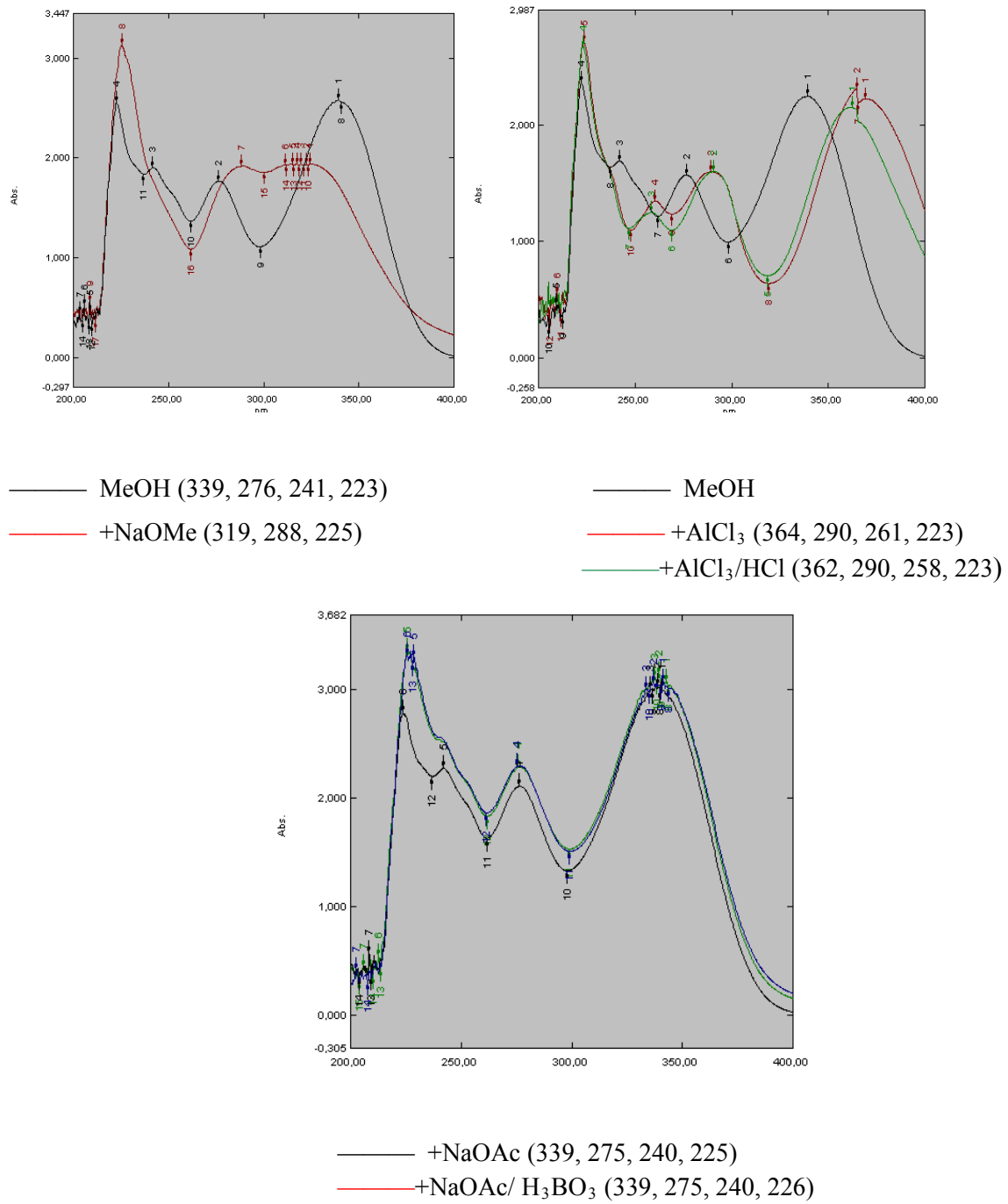
4.5.3.1. MLM'den Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri

4.5.3.1.1. MLM-1: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon

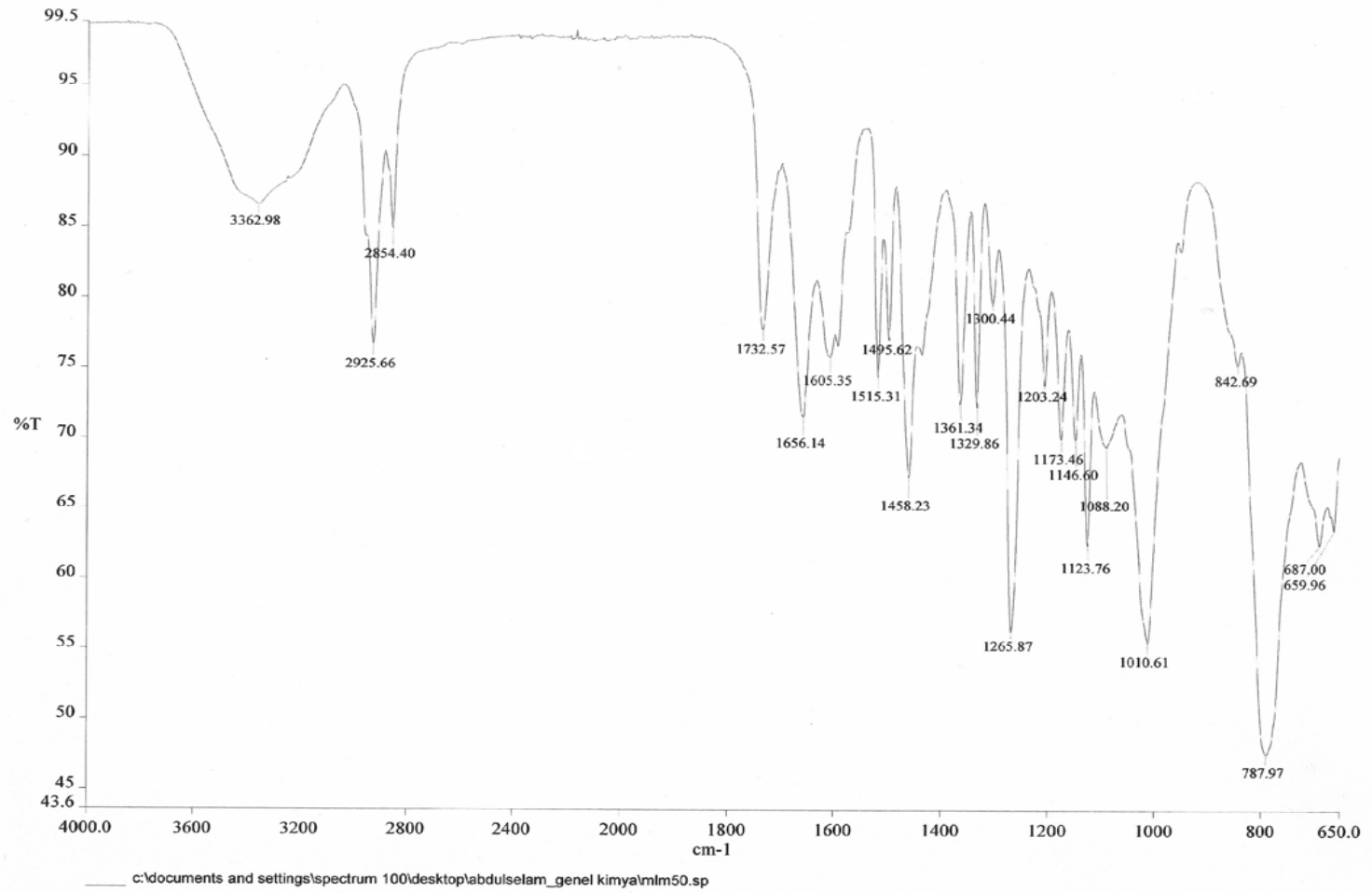


Sarı renkli olan MLM-1 bileşiği katı halde elde edildi (12 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110°C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) (Şekil 4-30) 223, 241 (omuz), 276 ve 339 nm'de absorpsiyon bantları izlendi. MLM-1'in metanoldeki çözeltisine NaOMe ilavesiyle alınan spektrumda 225, 288 ve 319 (omuz) nm'lerde izlenen bantlar B halkasında C-3' ve C-4' pozisyonlarının dolu olduğunu gösterdi. MeOH+AlCl₃+HCl spektrumunda Bant I'in (339 nm) MeOH'deki Bant I'e göre (362 nm) 23 nm batokromik kayma göstermesi 5-OH ve 6-OMe olduğunu gösterdi. MeOH+NaOAc+H₃BO₃ ile alınan spektrumdaki bantlar (226, 240, 275, 339 nm) MeOH ile alınan spektrumdaki bantlarla aynı



Şekil 4-31: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon'un Kayma Belirteçleri ile Alınan UV Spektrumları



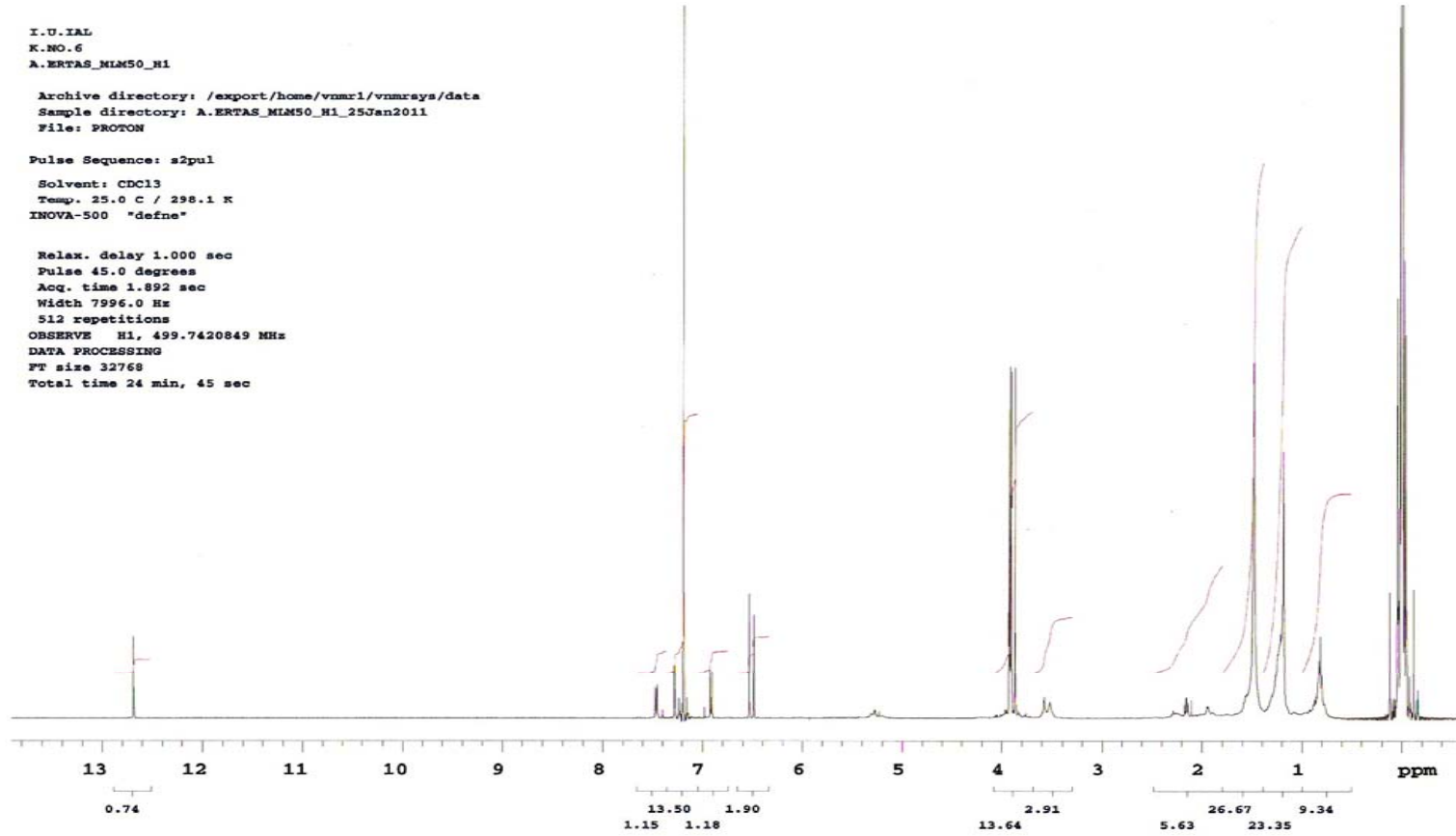
Şekil 4-32: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon'un IR Spektrumu

I.U.IAL
K.NO.6
A.ERTAS_MIM50_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MIM50_H1_25Jan2011
File: PROTON

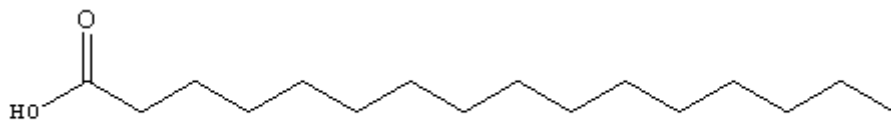
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDCl3
Temp. 25.0 C / 298.1 K
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
512 repetitions
OBSERVE H1, 499.7420849 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 24 min, 45 sec



Şekil 4-33: 5-Hidroksi-6,7,3',4'-Tetrametoksi Flavon'un ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 500 MHz)

4.5.3.1.2. MLM-2: Palmitik Asit



Renksiz olan MLM-2 bileşiği silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmedi, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110°C’de yakıldığında açık kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 202 nm’de absorpsiyon verdi (Şekil 4-34). IR spektrumunda (CHCl₃) 2917-2849 (C-H), 1703 (C=O) cm⁻¹’de bantlar izlendi (Şekil 4-35).

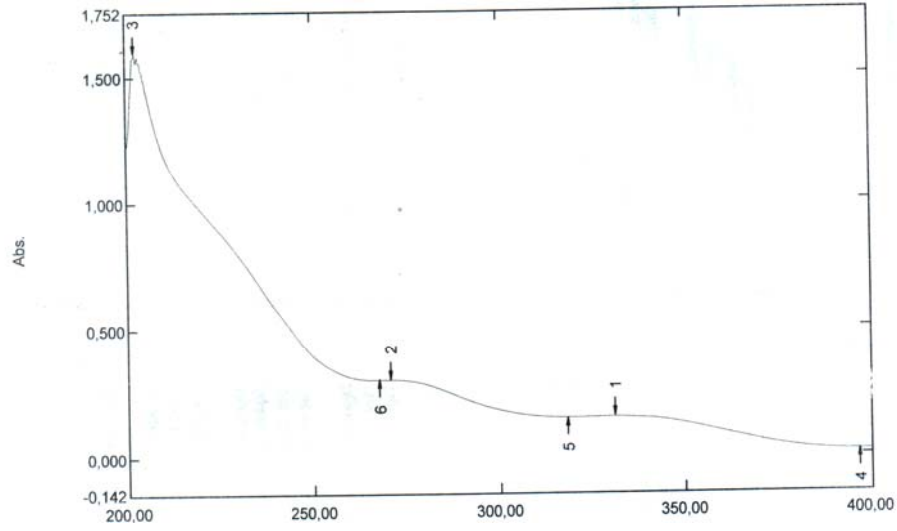
¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃, 500 MHz) (Şekil 4-36); δ 2,28’de (2H, *t*, *J* = 7,81 Hz) H-2, 1,56’da (2H, *pentet*, *J* = 7,83 Hz) H-3, 0,81’de (3H, *t*, *J* = 7,32 Hz) Me-16 ve 1,18-1,28’da (24H, *m*) metilen pikleri izlendi.

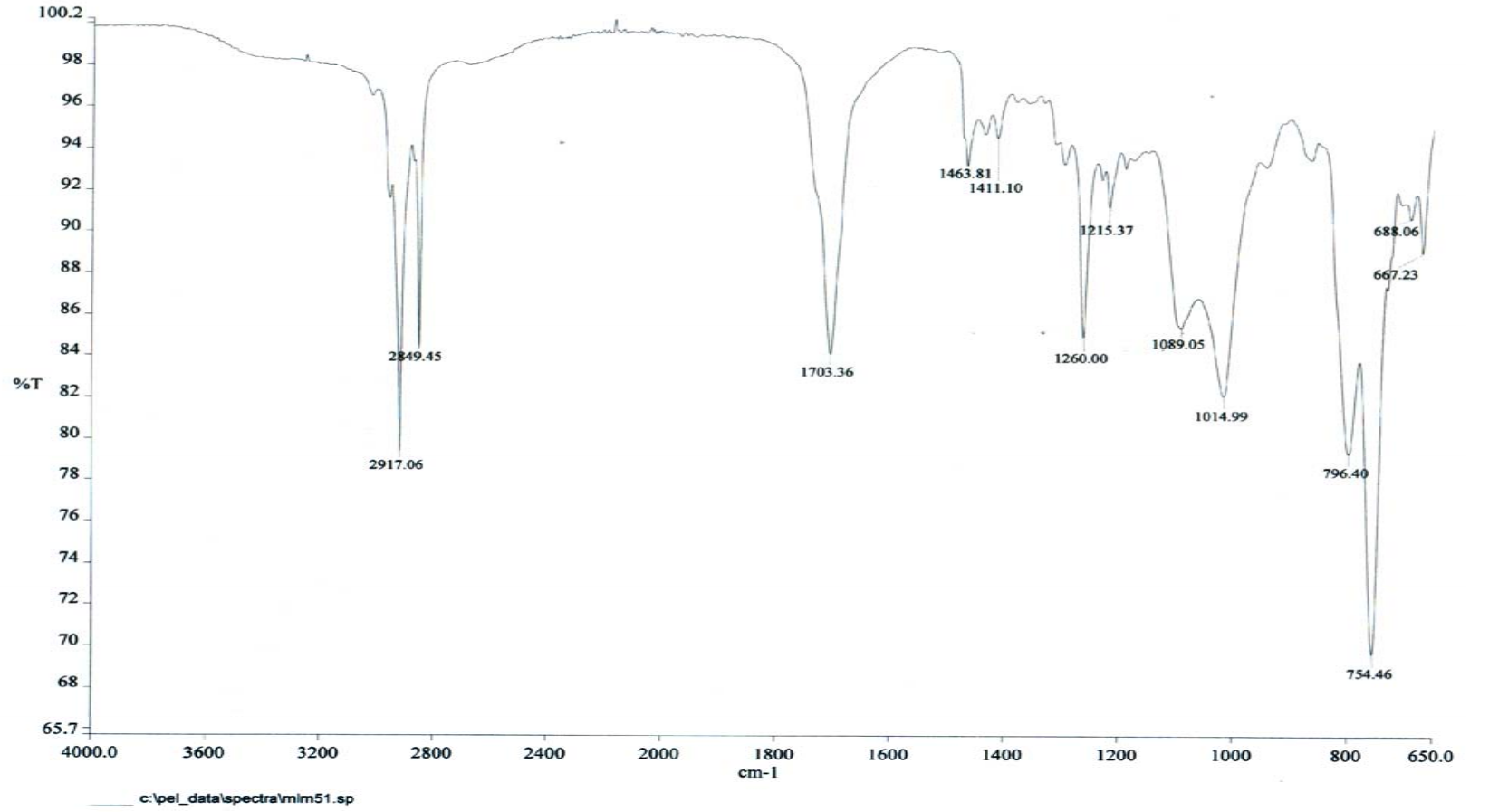
Literatürde verilen spektral değerler ile MLM-2’nin değerleri karşılaştırıldığında bileşiğin palmitik asit (hekzadekanoik asit) (4 mg) olduğu belirlendi (Aires-de-Sousa, M. ve ark. 2002).

Spectrum Peak Pick Report

16.05.2011 15:17:20

Data Set: Storage 110221 - RawData - E:\TEZ\Uv Spektrumlar\YENÝ\MLM51.spc

**Şekil 4-34: Palmitik Asit'in UV Spektrumu**



Şekil 4-35: Palmitik Asit'in IR Spektrumu

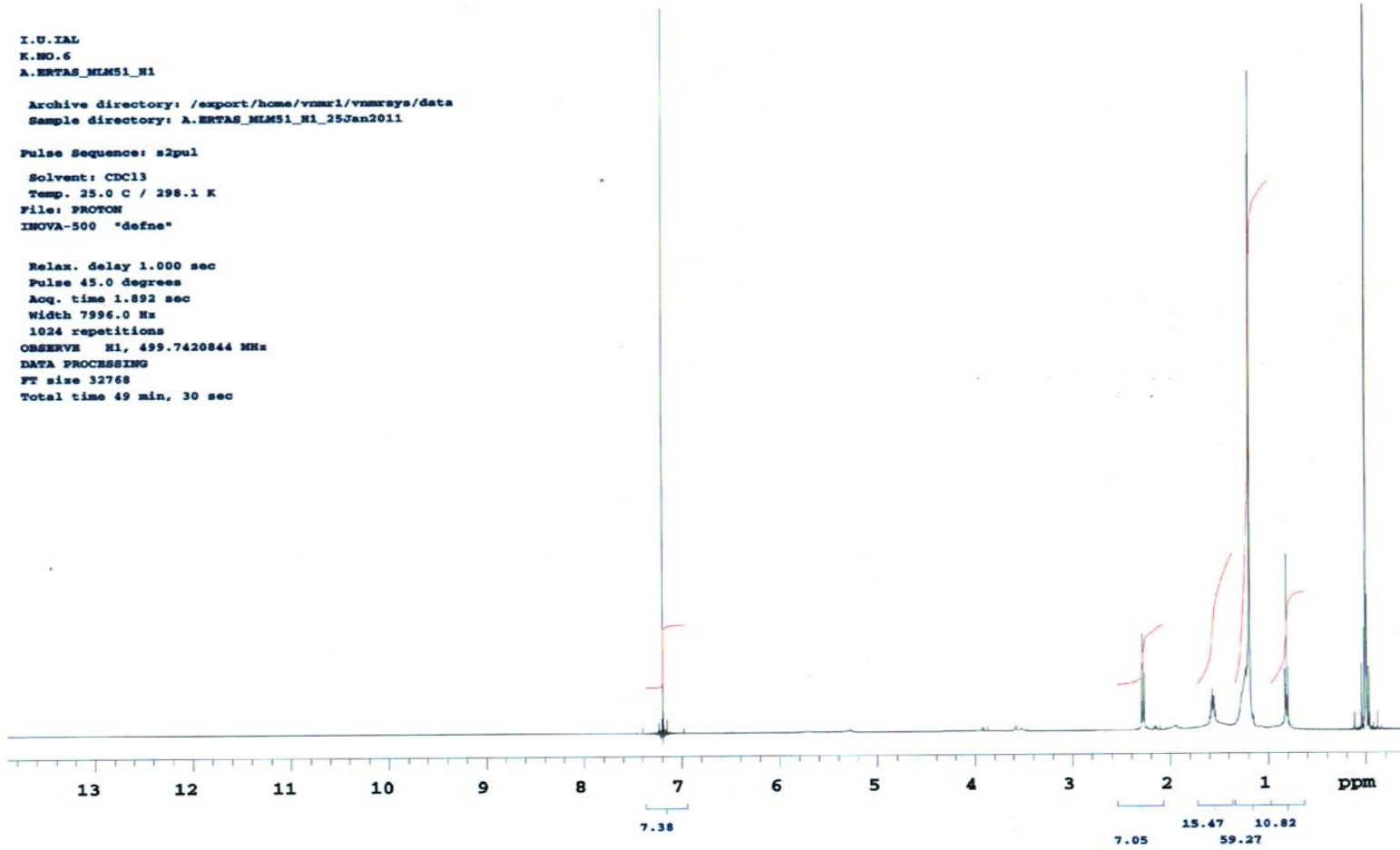
I.U.TAL
K.NO.6
A.ERTAS_MLM51_N1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLM51_N1_25Jan2011

Pulse Sequence: s2pul

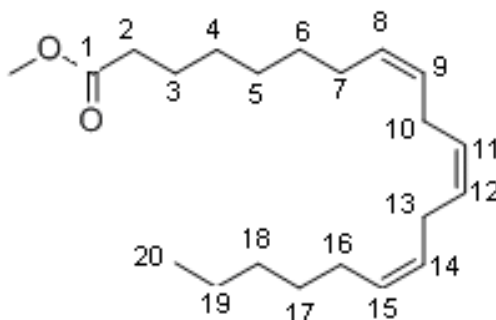
Solvent: CDCl₃
Temp. 25.0 C / 298.1 K
File: PROTON
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
1024 repetitions
OBSERVE H1, 499.7420844 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 49 min, 30 sec



Şekil 4-36: Palmitik Asit'in ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 500 MHz)

4.5.3.1.3. MLM-3: *cis*-8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri



Renksiz olan MLM-3 bileşiği silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmedi, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110°C’de yakıldığında açık kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 231 nm’de absorpsiyon verdi (Şekil 4-37). IR spektrumunda (CHCl₃) 2930-2857 (C-H), 1725 (C=O) cm⁻¹’de bantlar izlendi (Şekil 4-38).

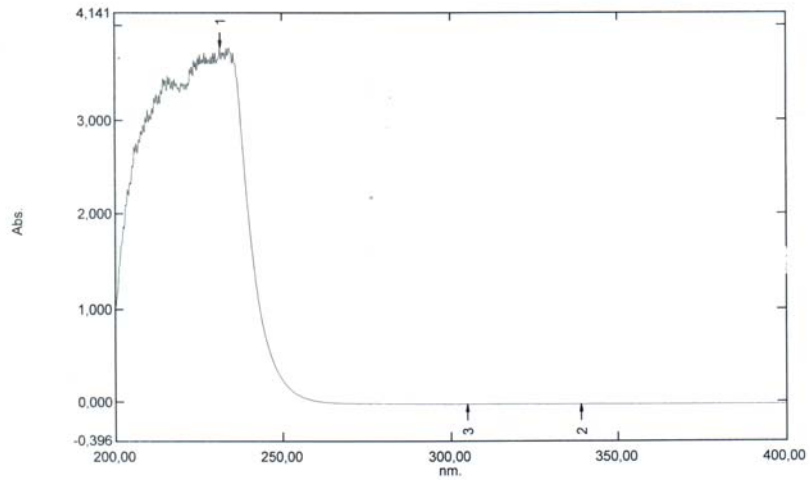
¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃, 500 MHz) (Şekil 4-39); δ 2,23’de (2H, *t*, *J* = 7,32 Hz) H-2, 1,98’de (4H, *m*) H-7 ve H-16, 5,22-5,36’da (6H, *dt*, *J* = 5,96; 6,34; 12,20 Hz) H-8, H-9, H-11, H-12, H-14 ve H-15, 2,74 (4H, *brt*, *J* = 1,95; 6,83 Hz) H-10 ve H-13, 1,55’de (2H, *pentet*, *J* = 7,32 Hz) H-3, 0,91’de (3H, *t*, *J* = 7,32 Hz) Me-20, 3,59 (*s*, OMe) ve 1,20-1,24’de (12H, *m*) metilen pikleri izlendi.

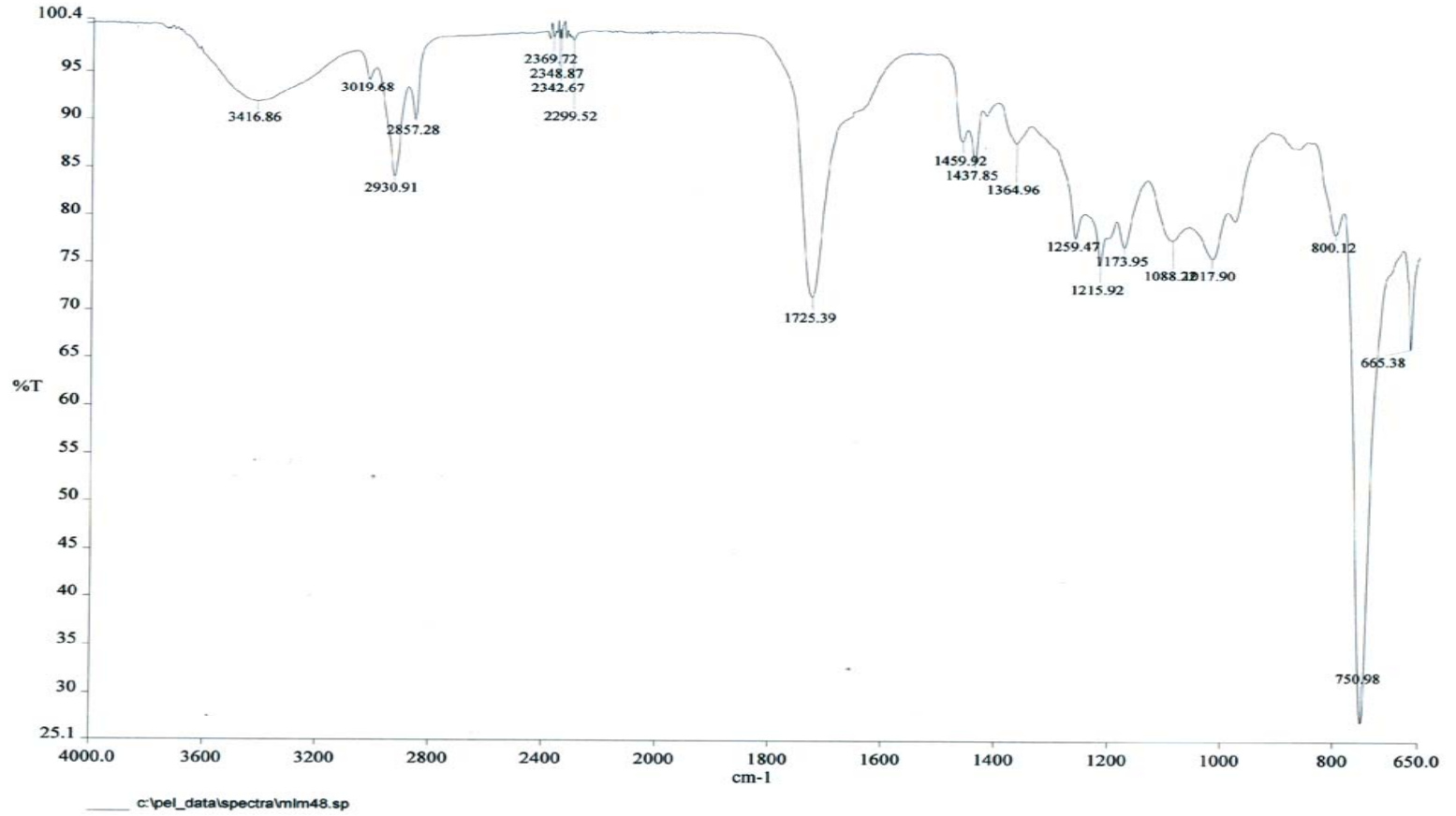
Literatürde verilen spektral değerler ile MLM-3’nin değerleri karşılaştırıldığında bileşiğin *cis*-eikosatrienoik asit metil ester (5 mg) olduğu belirlendi (Aires-de-Sousa ve ark. 2002). MLM-3 bileşiği *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi.

Spectrum Peak Pick Report

12.04.2011 11:42:39

Data Set: MLM48 - RawData - C:\Documents and Settings\pc\Desktop\File_110412_114223.spc

**Şekil 4-37: *cis*-8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri'nin UV Spektrumu**



Şekil 4-38: *cis*-8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri'nin IR Spektrumu

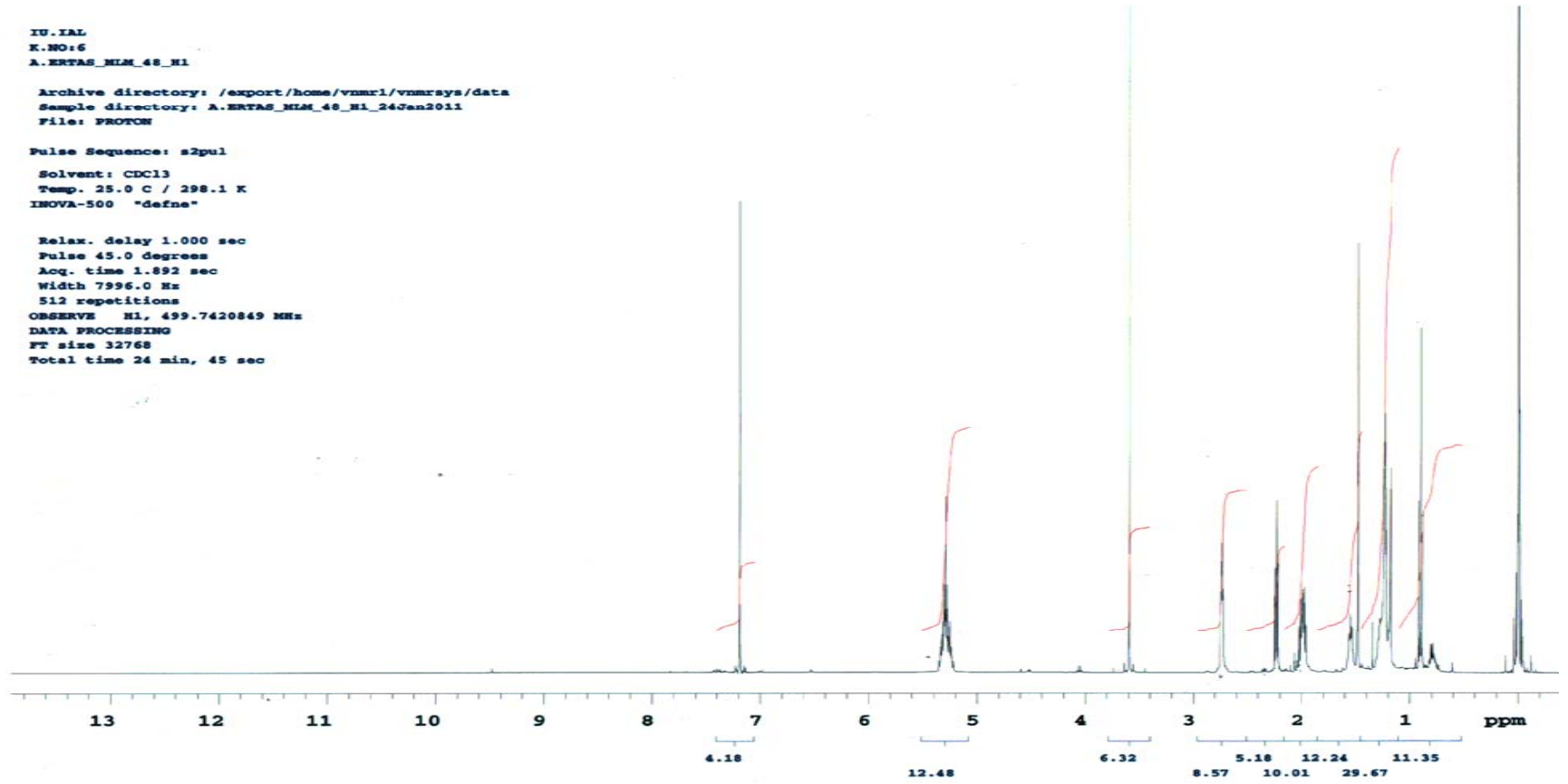
IU.XAL
K.NO:6
A.ERTAS_MLM_48_H1

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: A.ERTAS_MLM_48_H1_24Jan2011
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CDCl₃
Temp. 25.0 C / 298.1 K
INOVA-500 "defne"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 Degrees
Acq. time 1.892 sec
Width 7996.0 Hz
512 repetitions
OBSERVE H1, 499.7420849 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 24 min, 45 sec



Şekil 4-39: *cis*-8,11,14-Eikosatrienoik Asit Metil Esteri'nin ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 500 MHz)

4.5. Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Tayin Sonuçları

MLP, MLA ve MLM'den elde edilen saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri β -karoten renk açılım ve DPPH serbest radikal giderim yöntemlerine göre yapıldı, antikolinesteraz aktivite testi için Ellman yöntemi kullanıldı. Ancak ursolik asit ve β -sitosterol hariç saf maddelerin hiçbirisi antioksidan ve antikolinesteraz etki göstermedi ve bu nedenle sonuçlar grafiğe geçirilmedi. Antioksidan etkiye sahip olmayan ursolik asitin asetilkolinesteraz enzimini etmediği butirilkolinesteraz enzimini ise $55,53 \pm 0,23$ oranında inhibe ettiği saptandı. Antikolinesteraz etki göstermeyen β -sitosterol, β -karoten renk açılım yönteminde 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %42 inhibe edici etkiye sahip olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA

Bu doktora tez çalışmasında, Lamiaceae familyasının üyesi olan *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *noeana* (Boiss. Ex Briq.) Briq. bitkisinin kimyasal içeriği, uçucu yağ ve yağ asidi bileşimleri, antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri ilk kez belirlendi.

M. longifolia subsp. *noeana* bitkisinin toprak üstü kısımları sırasıyla petrol eteri, aseton ve metanol ile ekstre edildi. Ayrıca toprak üstü kısımlarından uçucu yağ elde edildi. Petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları tayin edildi, hem ekstraların hem de uçucu yağın β -karoten renk açılım ve DPPH serbest radikali giderim yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri ve Ellman yöntemi ile antikolinesteraz etkileri belirlendi. Petrol ekstresinden yağ asidi karışımı elde edildi. Uçucu yağ ve yağ asidi bileşimleri GC/MS ile tayin edildi. Hem antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri hem de toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları bakımından benzer olan petrol eteri, aseton ve metanol ekstralarından kromatografik yöntemler kullanılarak saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapıları spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldıktan sonra antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri tayin edildi.

GC/MS analizi sonucunda *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisinin uçucu yağında ana bileşenin pulegon (%32,3), yağ asidi karışımında ana bileşenin palmitik asit (%40,8) olduğu belirlendi.

Her üç ekstrenin toplam fenolik içerik bakımından flavonoit içeriğe göre daha zengin olduğu belirlendi.

Her üç ekstrenin β -karoten renk açılım yönteminde 100 μ g/mL konsantrasyonda yüksek antioksidan etki gösterirken aynı konsantrasyonda DPPH serbest radikali giderim yönteminde orta düzeyde etki gösterdiği saptandı. Uçucu yağ ise antioksidan etki göstermedi.

Uçucu yağ ve ekstraların hiç biri asetilkolinesteraz enzimini inhibe edici etki göstermedi. Buna karşılık standart olarak kullanılan galantaminle ($87,17 \pm 0,83$) karşılaştırıldığında uçucu yağın butirikolinesteraz enzimini yüksek düzeyde ($77,36 \pm 0,29$) inhibe ettiği tespit edildi. Petrol eteri ekstresinin butirikolinesteraz enzimini

inhibe etmediği aseton ve metanol ekstralarının ise birbirlerine yakın orta düzeyde etki gösterdiği belirlendi.

Petrol eteri ekstresinden (MLP) bilinen beş bileşik (uvaol, stigmast-5-en-3 β -il format, stigmast-5-en-3-on, β -sitosterol, nervonik asit) elde edildi. Bu maddelerden β -sitosterol hariç diğerleri *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi. Bu maddelerin hiç birinin antioksidan ve antikolinesteraz aktivitesinin olmadığı belirlendi.

Aseton ekstresinden (MLA) iki bilinen bileşik (ursolik asit, bis(2-etilhekzil) benzen-1,2-dikarboksilat) elde edildi. Bitkilerde yaygın olarak bulunan ve antikanser, antibakteriyal, tripanosidal gibi çeşitli aktivitelere sahip olan MLA-1 bileşiğinin (ursolik asit, 10 g) MLA'nın büyük bir kısmını oluşturduğu belirlendi (Qamar ve ark., 2010; Wolska ve ark., 2010; Ferreira ve ark., 2010). Bu nedenle, *M. longifolia* subsp. *noeana* bitkisi ursolik asit kaynağı olarak kabul edilebilir. Daha önce *Stoechospermum marginatum*, *Sargassum wightii*, *Euphorbia pulcherrima*, *Pterocarpus angolensis* ve *Sterculia guttata*'dan elde edilen ve antibakteriyal aktivitenin yanı sıra *Aedes aegypti* ve *Culex quinquefasciatus* larvalarına karşı kronik toksisitesi tespit edilen MLA-2 bileşiği, (bis(2-etilhekzil) benzen-1,2-dikarboksilat) *Mentha* türlerinden ilk kez elde edildi (Katadae ve ark. 2006). Bu çalışmada, MLA-1 bileşiğinin orta düzeyde butirilkinesteraz enzimini inhibe edici etkiye sahip olduğu ve MLA-2 bileşiğinin antioksidan ve antikolinesteraz aktivitesinin olmadığı belirlendi.

Metanol ekstresinden (MLM) üç bilinen bileşik (5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksi flavon, palmitik asit, *cis*-8,11,14-eikosatrienoik asit metil esteri) elde edildi. *Mentha* türlerinden ilk kez elde edilen *cis*-8,11,14-eikosatrienoik asit metil esteri'nin siklooksijenaz I ve II enzimlerini kuvvetli inhibe edici etkinin yanı sıra orta düzeyde antioksidan (lipozom oksidasyon modeli yöntemi) etkiye sahip olduğu Henry ve arkadaşları tarafından saptandı (2002).

Bu bileşiklerden uvaol, stigmast-5-en-3 β -il format, stigmast-5-en-3-on, bis(2-etilhekzil) benzen-1,2-dikarboksilat ve 5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksi flavon'un antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri, nervonik asit ve *cis*-8,11,14-eikosatrienoik asit metil esteri'nin antikolinesteraz aktiviteleri ilk kez bu tez çalışması ile belirlendi.

Sonuç olarak dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan *Mentha* türlerinin kimyasal içeriğinin ve çeşitli aktivitelerinin incelenmesi doğal aktif maddelerin bulunması açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Abu-Al-Futuh, I. M., Abdelmageed O. H., Jamil, R. M. ve Avato, P. (2000). A piperitenone oxide chemotype of *Mentha longifolia* (L.) Huds. growing wild in Jordan. *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 530-532.
2. Agnihotri, V. K., Agarwal, S. G., Dhar, P. L. Thappa, R. K., Kapahi, B. K., Saxena, R. K. ve Qazi, G. N. (2004). Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 607-610.
3. Aires-de-Sousa, M. ve Hemmer, J. (2002). "[Prediction of ¹H NMR Chemical Shifts Using Neural Networks](#)", most of the proton descriptors are explained. In that work they were used for the prediction of ¹H NMR chemical shifts by counterpropagation neural networks. *Analytical Chemistry*, **74**, 80-90. Erişim 7.04.2011, <http://www.chemexper.com/chemicals/supplier/cas/57-10-3.html>.
4. Akroum, S., Bendjeddou, D., Sata, D. ve Lalaoui, K. (2009). Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *Journal of Scientific Research*, **4**, 93-96.
5. Al-Bayati, F. A. (2009). Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **8**, 20.
6. Al-Hazimi, H. M .G. (1988). Chemical constituents of *Mentha longifolia*. *Oriental Journal of Chemistry*, **4**, 281-5.
7. Alho, H. ve Leinonen, J. (1999). Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Methods in Enzymology*, **299**, 3-14.

8. Ali, M. S., Ahmed, W., Saleem, M. ve Khan, T. (2006). Longifoamide-A and B: two new ceramides from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Natural Product Research*, Part A: Structure and Synthesis, **20**, 953-960.
9. Ali, M. S, Saleem, M., Ahmed, W., Parvez, M. ve Yamdagni, R. (2002). A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, **59**, 889-895.
10. Al-Mutabagani, L. A., Saleem, M. S. ve Al-Hazimi, H. M., (2001). A comparative study on the essential oil constituents of *Mentha longifolia* and *Origanum syriacum*. *Journal of Saudi Chemical Society*, **5**, 363-368.
11. Al-Mutabagani, L. A., Saleem, M. S. ve Al-Hazimi, H. M. (2004). Further highly oxygenated flavonoids from *Mentha longifolia*. *Journal of Saudi Chemical Society*, **8**, 541-546.
12. Amarowicz, R. ve Shahidi, F. (1996). A rapid chromatographic method for separation of individual catechins for green tea. *Food Research International*, **29**, 71-76.
13. Anggård, E. (1994). Nitric oxide: Mediator, murderer and medicine. *The Lancet*, **343**, 1199-1206.
14. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, SE. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7970–7981.
15. Aruoma, O. I. ve Cuppett, S. L. (1997). Antioxidant methodology in vivo and in vitro Concept. *Champaign, Illinois, AOCS Press*, 241.
16. Aruoma, O. I., Halliwell, B. ve Dizdaroğlu, M. (1989). Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system

- hypoxanthine/xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 13024-13028.
17. Babior, B. M. ve Woodman, R. C. (1990). Chronic granulomatous disease. *Seminars in Hematology*, **27**, 247-259.
 18. Baytop A. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, 4.Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 3637; 1996.
 19. Baytop, T. (1984). Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, Yayın No:3255, 337-339.
 20. Benzie, I.F.F. ve Strain, J. J. (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”; the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
 21. Blois, MS. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199–1200.
 22. Boiteau, P. ve Pasich, B. (1964). Ratsimamanga AR. Les Triterpenoids. *Gauthier-Villards*, 3, 32, 184, 469.
 23. Bourwieg , D. P .R. (1973). Flavonoids from *Mentha longifolia*. *Planta Medica*, **24**, 304-14.
 24. Bourwieg D., Janistyn, B., Stocker, M. ve Pohl, R. (1974). Detection of 5-hydroxychromone 7-rutinoside in *Mentha longifolia*. *Archiv der Pharmazie*, **307**, 131-136.
 25. Buchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P.T. ve Lozano, R.M. (1994). Perspectives in biochemistry and biophysics: thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in tecnology and medicine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **314**, 257-260.

26. Calvarano, I. ve Codignola, A. (1974). Chemical research on *Mentha longifolia* var. *mollissima*, gathered from Stura di Demonte Valley in the Cuneo region. *Derivati Agrumari*, **44**, 236-40.
27. Cao, G., Alessio, H. M. ve Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, **14**, 303-311.
28. Cao, G. ve Prior, R. L. (1999). In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**, 1173-1181.
29. Chen, Y., Zheng, R., Zhongjian, J. ve Yong, J. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radicals Biology and Medicine*, **9**, 19-21.
30. Chumkaew, P., Kato, S. ve Chantrapromma, K. (2010). New cytotoxic steroids from the fruits of *Syzygium siamense*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **12**, 424-428.
31. Cook, N. C ve Saman, S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **7**, 66-76.
32. Cram, D. J. ve Hammond, G. S. (1964). Organic Chemistry. New York: *McGraw-Hill Book Company*, 671-673.
33. Davis, P. H. (1982). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburg: *Edinburgh University Press*, **7**, 36.
34. Devon, T. K. ve Scott, A. I. (1972). Terpenes. İçinde: Handbook of Naturally Occurring Compounds. New York and London: *Academic Press*, 5-200.
35. Dukic N. M., Husain S. Z., Jancic R., Gasic O., Loukis A. ve Khan M. B. (1991). Composition and variation of essential oil constituents in three *Mentha longifolia* (Labiatae) species in Yugoslavia. *Pakistan Journal of Botany*, **23**, 243-248.

36. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. ve Featherston, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**, 88–95.
37. Fakhari, A. R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S. N. ve Haddad, P. R. (2005). Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new Method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A*, **1098**, 14-18.
38. Ferreira, D. D., Esperandim, V. R., Toldo, M. P. A., Saraiva, J., Cunha, W. R. ve de Albuquerque, S. (2010). Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. *Parasitology Research*, **106**, 985-989.
39. Fleisher, A. ve Fleisher, Z. (1991). The essential oils from *Mentha longifolia* growing in Sinai and Israel. Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. *Journal of Essential Oil Research*, **3**, 57-8.
40. Fleisher, Z. ve Fleisher, A. (1998). Volatile extract of *Mentha longifolia* growing in Israel. Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. *Journal of Essential Oil Research*, **10**, 647-648.
41. Floyd, R. A., Watson, J. J., Haris, J., West, M. ve Wong, P. K. (1986). Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **137**, 841-846.
42. Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Methods in Enzymology*, **58**, 61-97.
43. Geissman, T. A. ve Crout, D.H.G. (1969). Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. California: Freeman. *Cooper and Company*, 4, 217, 241, 291, 293, 300, 305, 309.

44. Getahun, Z., Asres, K. ve Mazumder, A. (2007). Essential oil composition, antibacterial and antioxidant activities of four *Mentha* species growing in Ethiopia. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, **25**, 91-102.
45. Ghouлами, S., Idrissi, A. ve Fkih-Tetouani, S. (2001). Phytochemical study of *Mentha longifolia* of Morocco. *Fitoterapia*, **72**, 596-598.
46. Gora, J., Druri M., Kaminska J. ve Kalembe, D. (1975). Chemical composition of essential oil from *Mentha spicata* L. subsp. *longifolia* (L) Tacik. *Herba Polonica*, **21**, 357-65.
47. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. ve Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, **103**, 1449-1456.
48. Guyton, K. Z. ve Kensler, T. W. (1993). Oxidative mechanism in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, **49**, 523-544
49. Hajlaoui, H., Snoussi, M., Ben, J. H., Mighri, Z. ve Bakhrouf, A. (2008). Comparison of chemical composition and antimicrobial activities of *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia* essential oil from two Tunisian localities (Gabes and Sidi Bouzid). *Annals of Microbiology*, **58**, 513-520.
50. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*; **52**, 253–265.
51. Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 543
52. Harborne, J. B., Mabry, T. J. ve Mabry, H. (1975). The Flavonoids. *Chapman and Hall*, 35-37, 865-867.

53. Harley, R. M. (1982). İçinde Davis, P. H. (Ed), *Mentha* L. in Flora of Turkey and The East Aegean Islands, 384-385.
54. Henry, G. E., Momin, R. A., Nair, M. G. ve Dewitt, D. L. (2002). Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. *Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2231-2234.
55. Henry, J. P. ve Stephens-Larson, P. (1984). Reduction of chronic psychosocial hypertension in mice by decaffeinated tea. *Hypertension*, **6**, 437-444.
56. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. ve Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet*, **342**, 1007-1011.
57. Ho, C. T., Chen, Q., Shi-Zhang, K. Q. ve Rosen, R. T. (1992). Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Preventive Medicine*, **21**, 520-525.
58. Ho, C-T., Chen, C-W., Wanasundara, U. N. ve Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants from tea. Natural Antioxidants: *Chemistry, Health Effects and Applications*, 213-223.
59. Howes, M. J. R., Perry, N. S. L. ve Houghton, P. J. (2003). Plants with traditional uses activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and cognitive disorders. *Phytotherapy Research*, **17**, 1-18.
60. Huang, D., Ou, B. ve Prior, RL. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856
61. Hudson, B. J. F. (1990). Food Antioxidants. London and New York, *Elsevier Applied Science*, 1-316
62. Husain, S. R., Cillard, J. ve Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, **26**, 2489-2491.

63. Jahan, N., Malik, A. ve Muhammad, P. (2001). New flavonoid from *Mentha longifolia*. *Heterocycles*, **55**, 1951-1955.
64. Jaimand, K. ve Rezaee, M. B. (2002). Chemical constituents of essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Hudson var. *asiatica* (Boriss.) Rech. f. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **14**, 107-108.
65. Jian, Z., Guang-Tong, C., Hui-Yuan, G., Bin, W. ve Li-Jun, W. (2007). Two new lignans from *Mentha spicata* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, **9**, 445-449.
66. Kakhky, A. M., Rustaiyan, A., Masoudi, S., Tabatabaei-Anaraki, M. ve Salehi, H. R. (2009). Composition of the essential oil of *Perovskia abrotanoides* Karel. and *Mentha longifolia* L. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **12**, 205-212.
67. Karousou, R., Lanaras, T. ve Kokkini, S. (1998). Piperitone oxide-rich essential oils from *Mentha longifolia* subsp. *petiolata* and *M. x villosa-nervata* grown wild on the island of Crete (S. Greece). *Journal of Essential Oil Research*, **10**, 375-379.
68. Katade, S. R., Pawar, P. V., Tungikar, V. B., Tambe, A. S., Kalal, K. M., Wakharkar, R. D. ve Deshpande, N.R. (2006). Larvicidal activity of bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate from *Sterculia guttata* seeds against two mosquito species. *Chemistry & Biodiversity*, **3**, 49-53
69. Khan, R. A., Singh, A. K. ve Agrawal, P. K. (1997). Sitosterol sucroside from the suckers of *Mentha arvensis*. *Phytochemistry*, **45**, 1295-6
70. Khattak, S., Rehman, S. U., Khan, T., Shah, H. U., Shad, A. A. ve Ahmad, M. (2004). Invitro screening for biological and pharmacological effects of indigenous medicinal plants, *Mentha longifolia* and *Aloe vera*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **26**, 248-251.

71. Kohen, R., Yannai, E., Berry, E. M. ve Tirosh, O. (1999). Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissue by cyclic voltammetry. *Method Enzymology*, **300**, 285-296.
72. Kolak, U., Topçu, G., Birteksöz, S., Ötük, G. ve Ulubelen, A. (2005). Terpenoids and steroids from the roots of *Salvia blepharochlaena*. *Turkish Journal of Chemistry*, **29**, 177–186
73. Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**, 969-978.
74. Lin, H. Q., Ho, M. T., Lau, L. S., Wong, K. K., Shaw, P. C. ve Wan, D. C. C. (2008). Anti-acetylcholinesterase activities of traditional Chinese medicine for treating Alzheimer's disease. *Chemico-Biological Interactions*, **175**, 352–354.
75. Liu, F., Ooi, V. E. C. ve Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, **60**, 763–771.
76. Luo, M., Kannar, K., Wahlqvist, M. L. ve O'Brien, R. C. (1997). Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *The Lancet*, **349**, 360–361.
77. Mabry, T.J., Markham, K.R. ve Thomas, M.B. (1970) *The systematic Identification of Flavonoids*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag; pp. 258-273.
78. Maffei, M. (1988). A chemotype of *Mentha longifolia* (L.) Hudson particularly rich in piperitenone oxide. *Flavour and Fragrance Journal*, **3**, 23-6.
79. Martinez, V., Barbera, O., Sanchez-Parareda, J. ve Marco, J.A. (1987). Phenolic and acetylenic metabolites from *Artemisia assoana*. *Phytochemistry*, **26**, 2619-2624.

80. Mathela, C. S., Padalia, R. C., Chanotiya, C. S. ve Tiwari, A. (2005). Carvone rich *Mentha longifolia*: chemical variation and commercial potential. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **8**, 130-133.
81. Matovc, M. M. ve Lavadinovic, V. (1999). Essential oil composition of *Mentha longifolia* (L.) Huds. from the mountain Zlatar in Yugoslavia. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, **2**, 78-81.
82. Melkani, A. B., Shah, G. C., Parihar, R. E., Bhattacharyya, S. C., Sen, N. ve Sethi, K. L. (1989). *Mentha longifolia* subsp. *himalaiensis*: a new species as a source of aroma chemicals. *International Congress Essential Oils, Fragrances Flavours*, 11th (4), 177-80.
83. Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **48**, 9
84. Mimica, D. N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B. ve Matavulij, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils *Planta Medica*, **69**, 413-419.
85. Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennaïar, Monia L., Mathieu, F. ve Romdhane, M. (2009). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha longifolia* and *M. viridis* essential oils. *Journal of Food Science*, **74**, 358-363.
86. Moncada, S., Palmer, R. ve Higgs, E. (1991). Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, **43**, 109-142.
87. Monfared, A., Nabid, M. R. ve Rustaiyan, A. (2002). Composition of a carvone chemotype of *Mentha longifolia* (L.) Huds. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **14**, 51-52.
88. Monte, F. J. Q., Kintzinger, J. P. ve Braz-Filho, R. (1998). Total assignment of ¹H and ¹³C spectra of the chlorinated triterpenoid (methyl -olide) by NMRβ-

- chloro-28,13 α ,24-tri-O-acetylolean-12 β ,3 α 2 spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **36**, 381-384.
89. Monte, J. Q., Kintzinger, J. P., Trendel, J. M. ve Poinot, J. (1997). Mixture of closely related isomeric triterpenoid derivatives: separation and purification by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **46**, 251-255
 90. Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R. ve Vattuena, M. A. (2000). Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 109-114.
 91. Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. ve Houghton, P.J. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, **14**, 289-300.
 92. Murray, M. J. ve Lincoln, D. E. (1972). Oil composition of *Mentha aquatica*-*Mentha longifolia* F1 hybrids and *Mentha dumetorum*. *Euphytica*, **21**, 337-43.
 93. Nasrin, A., Yadollah, Y. ve Abbas, H. (2004). Seied Mahdi Pourmortazavi,. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. Essential oil. *Talanta*, **62**, 407-411.
 94. Nori-Shargh, D., Norouzi-Arasi, H., Mohammadi, S., Mirza, M. ve Jaimand, K. (2000). Volatile components of *Mentha longifolia* (L.) Huds. Iran. *Journal of Essential Oil Research*, **12**, 111-112.
 95. Oinonen, P. P., Jokela, J., Hatakka, A. I. ve Vuorela, P. M., (2006). Linarin, a selective acetylcholinesterase inhibitor from *Mentha arvensis*. *Fitoterapia*, **77**, 429-434.
 96. Olsen, G. I., Stafford, J., van Staden, S. B. ve Christensen, A. K. (2008). Isolation of the MAO-inhibitor naringenin from *Mentha aquatica* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **117**, 500-502.

97. Onar, H. C., Yasa, H., Yusufoglu, A. ve Tanyolac, S. (2007). Essential oil composition of *Mentha longifolia* (L.) Hudson from the middle region of Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, **19**, 3991-3996.
98. Orhan İ. (2002) Türkiye’de Yetişen Bazı Bitkilerin Asetilkolinestereaz İnhibitörü Aktiviteleri Yönünden İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bil. Enst. Ankara, 165
99. Oumzil, H., Ghouami, S., Rhajaoui, M., Ildrissi, A., Fkih, T. S., Faid, M. ve Benjouad, A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytotherapy Research*, **16**, 727-731.
100. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, **44**, 307-315.
101. Oyedeji, A.O. ve Afolayan, A.J. (2006). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from South African *Mentha longifolia* (L.) L. subsp. *capensis* (Thunb.) Briq. *Journal of Essential Oil Research*, **18**, 57-59.
102. Öztürk, M., Kolak, U., Topçu, G., Öksüz, S. ve Choudhary, M. I. (2011). Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. *Food Chemistry*, **126**, 31-38.
103. Packer, L. ve Cadenas, E. (2002). Oxidative stress and disease. Handbook of Antioxidants. (2nd Edn). New York: *Marcel Dekker Inc.*, 5-8
104. Papas, A. M. (1996). Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, **31**, 77-82.
105. Perez, R. M. D., Utrilla, M. P., Navarro, M. C. ve Jimenez, J. (1990). CNS activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in mice and rats. *Phytotherapy Research*, **4**, 232-4.

106. Qamar, K. A., Dar, A., Siddiqui, B. S., Kabir, N., Alsam, H., Ahmed, S., Erum, S., Habib, S. ve Begum, S. (2010). Anticancer activity of *Ocimum basilicum* and the effect of ursolic acid on the cytoskeleton of MCF-7 human breast cancer cells. *Letters in Drug Design and Discovery*, **7**, 726-736.
107. Rasooli, I. ve Rezaei, M. B. (2002). Bioactivity and chemical properties of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha longifolia* (L.) Huds. *Journal of Essesntial Oil Research*, **14**, 141-146.
108. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237
109. Reische, D. W., Lillard, D. A. ve Eitenmiller, R. R. (2002). Oxidation. Food Lipids Chemistry, *Nutrition and Biotechnology*, New York: *Marcel Dekker Inc*, 335-542.
110. Saaid, A., Saaid, B., Abdulkader, İ., Souad, F. ve Abdelaziz, B. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 inhibitory activity of *Mentha longifolia*. *Therapie*, **58**, 531-4
111. Sarac, N. ve Ugur, A. (2009). The in vitro antimicrobial activities of the essential oils of some Lamiaceae species from Turkey. *Journal of Medicinal Food*, **12**, 902-907.
112. Savelev, S. U., Okello, E. J. ve Perry, E. K. (2004). Butyryl- and acetylcholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytotherapy Research*, **18**, 315-324.
113. Shahverdi, A. R., Bagheri, M. ve Tavassoli, F. (2002). A novel in vitro nitrofurantoin resistance breaker activity of *Mentha longifolia* L. essential oil. *Faslnamah-i Giyahan-i Daruyi*, **1**, 35-40, 79.

114. Sharaf, M., El-Ansari, M. A. ve Saleh, N. A. M. (1999). Flavone glycosides from *Mentha longifolia*. *Fitoterapia*, **70**, 478-483
115. She, G.M., Xu, C., Liu, B. ve Shi R.B. (2010). Polyphenolic acids from mint (the aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity. *Journal of Food Science*, **75**, 359-362.
116. Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S. ve Siddiqui, B. S. (1986). Kaneric acid, a new triterpene from the leaves of *Nerium oleander*. *Journal of Natural Products*, **49**, 1086-1090.
117. Singleton, V. L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Method Enzimology*, **299**, 152–178.
118. Slinkard, K. ve Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, **28**, 49–55.
119. Soliman, F. M., El-Sohly, M. A., Fathy, M. M. ve El-Sakhawy, F. S. (1998). A comparative study of the essential oils from certain *Mentha* and *Salvia* species grown in Egypt. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **38**, 553-564.
120. Souleles, C. ve Argyriadou, N. (1988). Constituents of the essential oil of *Mentha longifolia*. *Fitoterapia*, **59**, 239-40.
121. Sönmez, U. (1995). *Salvia napifolia* Jacq. bitkisinden elde edilen yeni diterpenoit bileşiklerinin yapı araştırması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
122. Stampfer, M. J., Henneekens, C.H., Manson, J. E., Colditz, G. A., Rosner, B. ve Willet, W.C. (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *Journal of Medicine*, **328**, 1444-1449.

123. Sutour, S., Bradesi, P., Casanova, J. ve Tom, F. (2010). Composition and chemical variability of *Mentha suaveolens* ssp. *suaveolens* and *M. suaveolens* ssp. *insularis* from Corsica. *Chemistry & Biodiversity*, **7**, 1002-1008.
124. Şahin, H. A. (2002). Asetilkolin, kolinesterazlar ve Alzheimer hastalığı, *Demans Dergisi*, **2**, 69-73.
125. Takeuchi, T., Nakajima, M. ve Morimoto, K. (1994). Establishment of a human system that generates $O_2^{\bullet}$ and induces 8-hydroxydeoxyguanosine, typical of oxidative DNA damage, by a tumor promoter. *Cancer Research*, **54**, 5837-5840.
126. Taylor, M. J. ve Richardson, T. (1980). Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *Journal of Food Science*, **45**, 1223-1227.
127. Tedder, J. M., Nechvatal, A., Murray, A. W. ve Carnduff, J. (1972). *Basic Organic Chemistry*. Belfast: *University Press*, 219.
128. Telci, D. (2001). Farklı nane (*Mentha* spp) klonlarının bazı morfolojik, tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma. Doktora Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü.
129. Tepe, B., Eminağaoğlu, O., Akpulat, H. A. ve Aydın, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Frey & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, **100**, 985-989.
130. Tokhsyrova, T. M. ve Popova, O. I. (2009). Determination of phenolic compounds in horse mint (*Mentha longifolia*). *Farmatsiya*, **1**, 24-25.
131. Venskutonis, P. R. (1996). A chemotype of *Mentha longifolia* L. from Lithuania rich in piperitenone oxide. *Journal of Essential Oil Research*, **8**, 91-5.

132. Viljoen, A. M., Petkar, S., van Vuuren, S. F., Figueiredo, A. C., Pedro, L. G. ve Barroso, J. G. (2006). The chemo-geographical variation in essential oil composition and the antimicrobial properties of wild mint - *Mentha longifolia* subsp. *polyadena* (Lamiaceae) in Southern Africa. *Journal of Essential Oil Research*, **18**, 60-65.
133. Voirin, B., Bayet, C., Faure, O. ve Jullien, F. (1999). Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. × piperita*. *Phytochemistry*, **50**, 1189-1193
134. Von-Sonntag, C. (1987). The chemical basis of radiation biology. London: *Taylor & Francis*, 15-49
135. Valkonen, M. ve Kuusi, T. (1997). Spectrophotometric assay for total radical trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research*, **38**, 823-833.
136. Wang, Z Y., Huang, M. T., Lou, Y. R., Xie, J. G. ve Reuhl, K. R. (1994). Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated SKH-1 mice. *Cancer Research*, **54**, 3428-3435.
137. Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. ve Locke, U. S. (1985). Qualitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, **187**, 33-37.
138. Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. ve Locke, U. S. (1986). The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent. *Biochimica et Biophysica Acta*, **884**, 119-123.

139. Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G. ve Maxwell, S. R. J. (1992). Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, **266**, 265-277
140. Wolska, K. I., Grudniak A. M., Fiecek B., Kraczkiewicz-Dowjat, A. ve Kurek, A. (2010). Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Central European Journal of Biology*, **5**, 543-553.
141. Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O. ve Inoue, T. (2007). Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*) fruit. *Food Chemistry*, **100**, 171-177.
142. Yermilov, V., Rubio, J. ve Ohshima, H. (1995). Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Letters*, **376**, 207-210.
143. Yigit, D., Yigit, N. ve Ozgen, U. (2009). An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses*, **52**, 135-40.
144. Younis, Y. M. H. ve Beshir, S. M. (2004). Carvone-rich essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *schimperi* Briq. and *Mentha spicata* L. grown in Sudan. *Journal of Essential Oil Research*, **16**, 539-541.
145. Zaidi, F., Voirin, B., Jay, M. ve Viricel, M. R. (1998). Free flavonoid aglycones from leaves of *Mentha pulegium* and *Mentha suaveolens* (Labiatae). *Phytochemistry*, **48**, 991- 994.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Abdulselam	Soyadı	Ertaş
Doğ.Yeri	Kızıltepe/ Mardin	Doğ.Tar.	10.03.1979
Uyruğu	T. C.	TC Kim No	31208170530
Email	abdulselamertas@hotmail.com	Tel	+905056283447 - +905333794226

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakülte Genel Kimya Programı	2005
Lisans	Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2001
Lise	Kızıltepe Lisesi	1997

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayım)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Kimya Öğretmeni	Hüseyin Bürge Lisesi	2002-2005
2.	Kimya Öğretmeni	Pianalitik Dersaneleri, Damla Dersaneleri	2006
3.	Kimya Öğretmeni	Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi	2006-....

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	67 (2001)	

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	63,043	57,234	56,657
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office (Tüm Programlarını)	İyi
ChemOffice	İyi

Uluslar Arası Hakemli SCI'ye giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Topçu, G., Ertas, A., Kolak, U., Öztürk, M. ve Ulubelen, A. (2007). Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. *Arkivoc* (vii), 195 – 208.

2. Ertas, A., Öztürk, M., Boğa, M. ve Topçu, G. (2009). Antioxidant and anticholinesterase activity evaluation of *ent*-kaurane diterpenoids from *Sideritis arguta*. *Journal of Natural Products*, **72**, 500–502.

3. Halfon, B., Gören, A.C., Ertas, A. ve Topçu, G. (2011). Complete ¹³C NMR assignments for *ent*-kaurane diterpenoids from *Sideritis* species *Magnetic Resonance in Chemistry*, **49**, 291-294.

4. Topçu, G., **Ertas, A.**, Öztürk, M., Dinçel, D., Kılıç, T. ve Halfon, B. (2011). *Ent*-Kaurane diterpenoids isolated from *Sideritis congesta*. *Phytochemistry Letters* (Baskıda).

Uluslar Arası ve Ulusal Kongreler

1. **Ertas, A.**, Boğa, M., Öztürk, M., Dirmenci, T. ve Topçu, G. (2010). Bioactive *Ent*-Kauranes from *Sideritis congesta*. 3rd International Meeting On Pharmacy&Pharmaceutical Sciences 9-12 June 2010 Istanbul (Poster).

2. Boğa, M., Kolak, U., **Ertas, A.**, Hacibekiroğlu, I. ve Toplu C. (2010). Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Kahvesinin Antioksidan Etkisinin Tayini 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi 21-25 Haziran 2010 Erzurum (Poster).

3. **Ertas, A.**, Boğa, M., Öztürk, M., Dirmenci, T. ve Topçu, G. (2010). *Sideritis arguta* Bitkisinden Elde Edilen Diterpenlerin Yapı Tayini, Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin Belirlenmesi 5. Ulusal Analitik Kimya Kongresi 21-25 Haziran 2010 Erzurum (Poster).

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik dinlemek, Kitap okumak, seyahat etmek, Gelişen teknoloji.