

TC

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Mentha piperita* BİTKİSİNDEN MENTOL BİLEŞİĞİNİN İZOLASYONU  
UÇUCU YAĞ VE ÖZÜTLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

CÜNEYT COŞKAN

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Organik Kimya

MANİSA 2013

TC

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Mentha piperita* BİTKİSİNDEN MENTOL BİLEŞİĞİNİN İZOLASYONU  
UÇUCU YAĞ VE ÖZÜTLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

CÜNEYT COŞKAN

Anabilim Dalı: Kimya

Programı :Organik Kimya

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :02.Eylül.2013

Tezin Savunulduğu Tarih :19.Eylül.2013

Tez Danışmanı: Doç.Dr.M.Sabih ÖZER

Diğer Jüri Üyeleri :Doç.Dr Cengiz SARIKÜRKÇÜ (NEÜ)

Yrd.Doç.Dr. Mustafa ESKİCİ (CBÜ)

MANİSA 2013

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ŞEKİL LİSTESİ.....	III
ÇİZELGE LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR LİSTESİ.....	V
TEŞEKKÜRLER.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1.GİRİŞ .....	1
1.1. Uçucu Yağların Tanımı .....	2
1.2. Uçucu Yağların Sınıflandırılması.....	5
1.2.1. Kimyasal Bileşimlerine Göre Uçucu Yağlar.....	5
1.2.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri.....	8
1.2.3. Destilasyon Yöntemi .....	8
1.2.3.1. Su Destilasyonu Yöntemi.....	9
1.2.3.2. Buhar Destilasyonu Yöntemi.....	9
1.2.3.3. Su-Buhar Destilasyonu Yöntemi.....	10
1.2.3.4. Kuru destilasyon.....	10
1.2.3.5. Hidrofüzyon.....	10
1.2.3.6. Maserasyon ile destilasyon .....	11
1.2.3.7. Soğuk yağ ile özütleme .....	11
1.2.3.8. Sıcak yağ ile özütleme .....	11
1.2.3.9. Organik çözücülerle özütleme.....	11
1.2.3.10. Sıkma ile yapılan mekanik özütleme .....	11
1.2.3.11. Çizerek özütleme .....	12
1.3. Mentolün Özellikleri .....	12
1.3.1. Mentolün Biyolojik Özelliği .....	13
1.3.2. Mentol Üretimi.....	14

1.3.2.1. Sitralden Mentol Sentezi .....	14
1.3.2.2. Symrise Prosesi ile Mentol Sentezi.....	16
1.3.2.3. Mirsen ile Mentol Sentezi.....	17
1.3.2.4. Timol'ün Katalitik Hidrojenasyonu .....	18
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	19
2.1. Uçucu Yağların Elde Edilmesi ve Bileşimleri.....	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	22
3.1. Bitkisel Materyal.....	22
3.2. Kimyasal Materyaller .....	22
3.3. Kromatografik Çalışmada Kullanılan Adsorbanlar.....	22
3.4. Kromatografi Çalışmalarında Kullanılan Belirteçler.....	22
3.5. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Çözücü Sistemleri .....	23
3.6. Yöntemler.....	23
3.6.1. Uçucu yağın Elde Edilmesi .....	23
3.6.2. Çözücü Özütleme.....	24
3.6.3. Uçucu yağ analiz yöntemleri.....	25
3.6.3.1. Uçucu yağın ince tabaka kromatografisi ile analizi.....	25
3.6.3.2. Uçucu yağın Kolon Kromatografisi ile analizi .....	25
3.6.3.3. Uçucu yağın gaz kromatografisi (GC) ile analizi .....	26
3.6.3.4. Uçucu yağın gaz kromatografisi (GC) / Kütle spektrometresi (MS) ile analizi .....	26
3.6.3.5. Antioksidan Aktivite Analiz Yöntemleri .....	26
3.6.3.5.1. Toplam Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi .....	26
3.6.3.5.2. Serbest radikal giderim aktivitesinin belirlenmesi .....	27
3.6.3.5.3. İndirgenme gücü kapasitesinin belirlenmesi.....	27
3.6.3.5.4. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi.....	27
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	29
4.1 Özüt Verimleri ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Analizi .....	29
4.2 Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları .....	33
KAYNAKLAR.....	38
EKLER .....	43

## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1.** *Mentha* türlerinin yapraklarının alt yüzeilerindeki stomalar ve yağ hazneleri.

**Şekil 2.** Mentolün sekiz farklı konformasyonu.

**Şekil 3.** Sitralden mentol eldesi.

**Şekil 4.** Ryoji Noyori mentol sentezi.

**Şekil 5.** Timol'ün katalitik hidrojenlenmesiyle elde edilen mentol.

**Şekil 6 .**Uçucu yağın clevenger aparatı ile elde edilmesi.

**Şekil 7.** *Mentha piperita* uçucu yağ ve çözücü özüt verimleri.

**Şekil 8.** *Mentha piperita* bitkisinin total iyon kromatogramı.

**Şekil 9.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağının IR spektrumu.

**Şekil 10.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağ, çözücü özütlerin ve standartların  $\beta$ -karoten-lineloik asit model sistemdeki toplam antioksidan aktiviteleri .

**Şekil 11.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağ, çözücü özütlerin ve standartların DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri.

**Şekil 12.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağ, çözücü özütlerin (2 mg/mL) ve standartların (0.2 mg/mL) indirgeme gücü kapasiteleri.

**Şekil 13.** Standart gallik asit grafiği.

**Şekil 14.** *Mentha piperita* bitkisi çözücü özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları.

## **ÇİZELGE LİSTESİ**

**Çizelge 1** Terpenlerin Sınıflandırılması

**Çizelge 2** *Mentha piperita* uçucu yağ ve çözücü özüt verimleri

## KISALTMALAR LİSTESİ

GC	Gaz Kromatografisi
MS	Kütle Spektroskopisi
RI	Alıkonma İndeksi
RT	Alıkonma Zamanı
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidraliz
QEs	Kuersetin Eşdeğer
GAEs	Gallik Asit Eşdeğeri
TCA	Trikloroasetik Asit
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
dk	Dakika
in vitro	Hücre dışı(Laboratuvar Ortamı)
in vivo	Hücre içi
Me	Metil
Ph	Fenil
Et	Etil
But	<i>tert</i> -Butil
DMAP	Dimetilaminopiridin
THF	Tetrahidrofur
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
g	Gram
m	Metre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
p	Para
%	Yüzde

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren tez danışmanım Doç.Dr.M.Sabih ÖZER'e

Laboratuvar çalıőmalarımda yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Cengiz SARIKÜRKÇÜ, Yrd.Doç.Dr.Mustafa ESKİCİ ve Doktora öğrencisi Abdullah KARANFİL'e

Bu çalıőmam süresince benim yanımda olup her zaman hoşgörüsünü ve sevgisini gördüğüm sevgili eşim Derya'ya ve küçük oğlum Yusuf'a

Ve bütün emeđi geçen herkese candan teşekkür ederim

**Cüneyt COŞKAN**

MANİSA 2013

## ÖZET

### ***Mentha piperita* BİTKİSİNDEN MENTOL BİLEŞİĞİNİN İZOLASYONU UÇUCU YAĞ VE ÖZÜTLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Bu çalışmada, *Mentha piperita* bitkisi üzerinden hidrodestilasyon ile elde edilen uçucu yağın kimyasal içeriklerinin belirlenmesi ve hem uçucu yağın hem de farklı çözücü özütlerinin *in vitro* antioksidan aktiviteleri belirlenmeye çalışıldı. Sırasıyla hekzan, etil asetat, metanol ve su kullanılarak takip eden özütleme yapıldı.

*Mentha piperita* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri GC/MS kullanılarak belirlendi. Mentol (%74,54), isomentilasetat (%6,63), menton (%6,47) ana bileşen olarak tesbit edildi. Özütlerin antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten/linolik asit model sistem, DPPH serbest radikal giderim, indirgenme gücünü kapsayan test sistemi belirlendi.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** *Lamiatae*, *Mentha piperita*, mentol, uçucu yağ

## ABSTRACT

### DETERMINATION ESSENTIAL OIL AND EXTRACT OF ANTIOXIDANT ACTIVITY TO MENTHOL COMPOSED OF INSULATION FOR *Mentha piperita*

This study aimed to determine chemical composition of hydrodistilled essential oil from *Mentha piperita* plant and in vitro antioxidant activities of the essential oil and different solvent. By using four different solvents: hexan, ethyl acetate, methanol and water, soluble compounds has been extracted the from the plant.

Essential oil composition of the *Mentha piperita* was analyzed by GC/MS. Basic components in the oil were found to be (%74,54) menthol, (%6,63) isomenthol, (%6,47) menton. Antioxidant activities of the samples were determined by three the different test systems:  $\beta$ -carotene/linoleic acid, DPPH, reduction power.

**KEY WORDS:** Lamiatae, *Mentha piperita*, menthol, essential oil

## 1.GİRİŞ

İnsanlık tarihi kadar eski dönemlerden bu yana kullanılan nane (*Mentha*); biberiye (*Rosmarinus officinalis*), adaçayı (*Salvia officinalis*), lavanta (*Lavandula angustifolia*), kekik (*Thymus vulgaris*), mercanköşk/ kekik (*Origanum hirtum*), oğulotu (*Melisa officinalis*) gibi bazı bilinen diğer kokulu ve aromalı bitki ile aynı familya içerisinde yer almaktadır. Bu familya, *Labiatae* familyasıdır. *Labiatae* familyası 200 cins ve 3000'in üzerindeki tür sayısı ile zengin bir familyadır. Dünyanın sadece birçok bölgesinde yayılışı olmayan familyanın tüm habitat ve yüksekliklerde yetişmekte olup, kuzey kutbundan Himalayalara kadar Güneydoğu Asya'dan Hawaii'ye kadar ayrıca Avustralya'da tüm Afrika'da ve Amerika'nın kuzeyi ve güneyi boyunca yayılış göstermektedir [1].

Anavatanı Orta Avrupa ve Asya olarak bilinen *Mentha Labiatae* familyasının üyesidir. Tarih boyunca yaygın şekilde antiseptik, spazmolitik, korrigen ve karminatif olarak kullanım bulmuş bir takson olan *Mentha*'nın bir türü 1696'da Ray tarafından tedavi amaçlı kullanılabileceği belirtilerek *Mentha palustris* olarak adlandırılmıştır. Özellikle 1705'de Dale ve 1721'de London *Pharmacoeia*'de tanımlanmıştır. Daha sonra 1753'de Linne aynı türü *Mentha piperita* L. şeklinde tanımlamıştır. Avrupa ve Asya'da yayılış gösteren *Mentha piperita* 20.yy başlarında Alman göçmenler tarafından Amerika kıtasına taşınmış ve burada geniş yayılış alanları bulmuştur [3].

Anadolu'da 7 çeşit *Mentha* türü olduğu bilinmekle beraber çok polimorfik bir yapıya sahip olmasından ve melezleşmeye yatkın olmasından dolayı kemovaryabilitesi oldukça fazla olan bir taksondur [6]. Kromozom sayıları oldukça farklılık gösteren *Mentaha'nın* vegetatif üreme yeteneğinde katkısıyla dünyada 30 kadar subgenusunun bulunduğu bilinmektedir. Subgenuslar arası melezleşme nadir dahi olsa aynı subgenus içinde çok sayıda melezlerin olduğu belirlenmiştir [5]. Ekolojik koşullardan da oldukça etkilendiği bilinen *Mentha* taksonlarının ıslah edilmiş tohumları ile ilgili sitotaksonomik kemotaksonomik çalışmalar mevcuttur [7]. *Mentha* cinsinin sistematığı form zenginliğinden dolayı tamamlanamamıştır. Doğal taksonları içermeyen, kültür formları üzerinde, menton içerenler ve karvon içerenler olarak genel tasnifler yapılmıştır [5]. Melezleşme yatkınlığa bir örnek olarak farmakopelerde kayıtlı *Mentha piperita* verilebilir. Bu tür *M. longifolia* ve *M. rotundifolia*'nın melezi olan *M. spicata* ile *M. aquatica*'nın melezidir [5,6,7,8].

Ülkemizde ise bu familya 45 cinsi, 546 türü ve 730 taksonu var olup, bunlar kayıtlıdır. Bunlardan 28 tür yaygın, 247 tür endemik olup endemizm oranı %42.2'dir. Özellikle Akdeniz ve

Ege bölgesinde yetişen aromatik *Labiatae* üyeleri olup deniz seviyesinden 4400 m'ye kadar çeşitli yüksekliklerde bulunmaktadır [1,2].

Nane'nin (*Mentha*) anavatanı Akdeniz bölgesi özellikle Anadolu ve Mısır'dır. Nane, dünya üzerinde çok geniş alanlara yayılmış, ekonomik öneme sahip bir bitkidir. Taze sürgün ve yaprakları, bazı türleri de yemeklere çeşni veren baharat olarak kullanılmakta; Akdeniz ülkelerinde salatalara ilave edilmekte ya da geleneksel türk mutfağında bir bölümü taze şekliyle sebze olarak kullanılır ve salatalarda yerini alırken, üretilen miktarın önemli bir bölümü kurutularak toz haline getirilmekte ve çeşitli firmalar tarafından ambalajlanarak satışa sunulmakta veya üreten kişilerin bizzat kendileri tarafından kurutulup kullanılmaktadır.

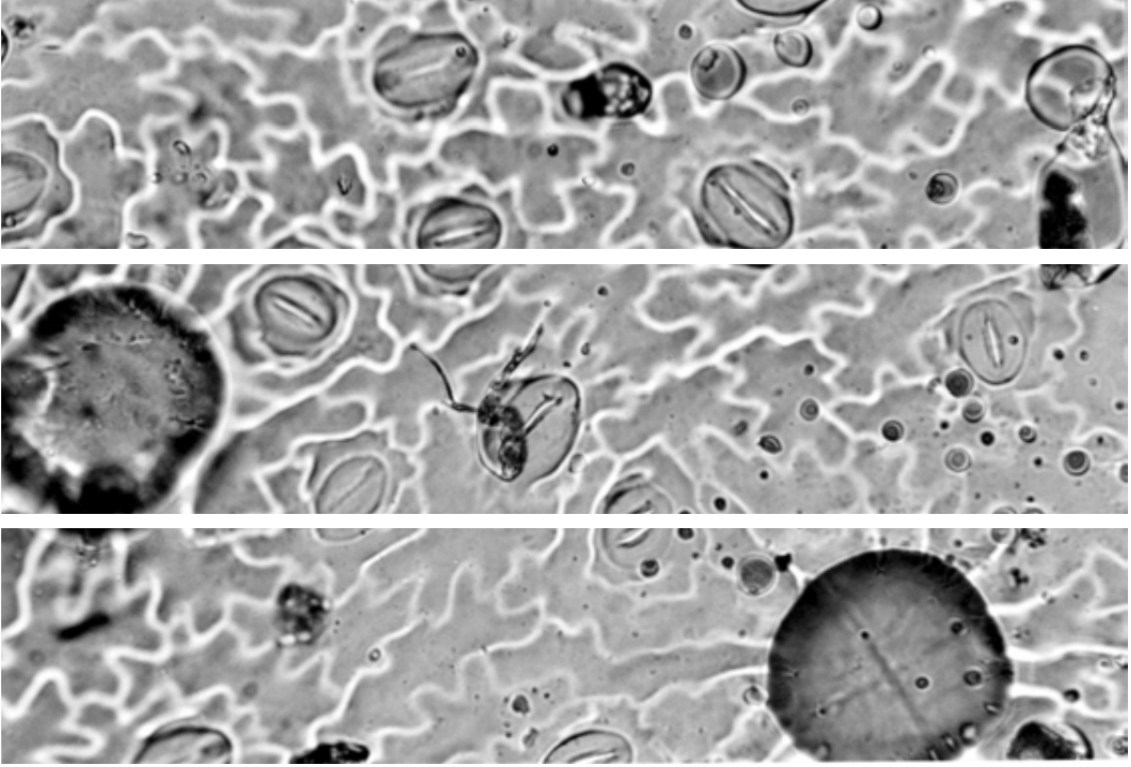
Nane yağı, dünya piyasalarında önemli bir ticaret alanına sahiptir. Nane yağı, dünya uçucu yağ ticaretinde narenciye uçucu yağından sonra ikinci sırada gelmektedir [2]. En çok nane yağı üreten ülkeler ABD, Fransa, Brezilya, Arjantin, Batı Avrupa Ülkeleri, Çin, Peru, Tayland, Kore'dir [3].

Ülkemiz florası uçucu yağ taşıyan bitkilerin çokluğu ve çeşitliliği yönünden önem taşımaktadır. Türkiye'nin coğrafik konumu ve iklim çeşitliliği yanında 3 önemli floristik bölgenin kesişme noktasında bulunması, diğer cins ve türlerde olduğu gibi aromatik bitkilerde de çeşitliliğin artmasına sebep olmuştur. Türkiye florasına kayıtlı 10.000'e yakın türün 1/3'ünü aromatik bitkilerin oluşturduğu belirlenmiştir [4].

Değişik nane türleri, antimikrobiyal, antispazmodik, koleretik, karminatif gibi insanlarda çeşitli fizyolojik etkilere sahip olmaları nedeniyle eski çağlardan beri halk ilacı olarak, gerek ilaç, gıda, parfümeri ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Nane türlerinin çeşitli etken maddeleri arasında, bu türlerin endüstriyel kullanımına neden olan etken madde grubu uçucu yağlarıdır. Şekil 1'de nane yapraklarında bulunan yağ hazneleri gösterilmiştir.

### 1.1. Uçucu Yağların Tanımı

Uçucu yağlar, bitkilerden veya bitkisel droglardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, kolaylıkla kristalleşebilen uçucu, kuvvetli kokulu, su buharı ile sürüklenebilen yağimsı karışımlardır. Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan, kendisine has koku, tat, renk ve görünümleri ile uçucu özelliğe sahip olan bu maddeler uçucu yağ diye adlandırılmaktadır. Halk arasında uçan yağ, eterik yağ da denilen bu yağlarda terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevlerinin yanı sıra organik asitler, alkoller, fenoller ve ketonlar da bulunabilmektedir [9,10,11].



**Şekil 1.** *Mentha* türlerinin yapraklarının alt yüzeylerindeki stomalar ve yağ hazneleri

Bitkilerdeki uçucu yağlar, bitkilerin salgı sistemleri olan salgı tüyleri, salgı hücreleri, salgı kanalları ve salgı ceplerinde oluşmaktadır. Bitkinin bu salgıyı hangi amaçla yaptığı tam olarak bilinmemekle birlikte, bunu yaralanmalar karşı oluşan reçineyi çözebildiği, böceklerle karşı koruyucu veya cezbedici olduğu ve dolaylı olarak da tozlaşmaya yardımcı olduğu düşünülmektedir [12]. Ayrıca uçucu yağ taşıyan bitkilerin genellikle Akdeniz ve step iklimleri gibi sıcak iklimleri fazla miktarda olması sebebiyle bitkinin uçucu yağı üzerindeki havayı bağlayarak fazla su kaybını önlemek amacıyla da salgıladığı belirtilmiştir [12].

Birçok bitkinin karakteristik kokuları içerdikleri uçucu yağdan kaynaklanmaktadır. Uçucu yağlar açıkta bırakıldıklarında oda sıcaklığında bile buharlaşabilirler. Uçucu yağların pek azı hariç güzel kokuludurlar. Bu nedenle bunlara esans da denilmektedir. Bunlar ayrıca su ile karışmadığından ve su yüzeyinde tabaka oluşturduğunda yağ olarak da anılırlar. Ancak bunların sabit yağlarla önemli farklılıkları bulunmaktadır. Uçucu yağlar su buharında sürüklenmekte, süzgeç kağıdı üzerinde leke bırakmamaktadırlar. Halbuki sabit yağlar suda sürüklenmezler ve süzgeç kağıdı üzerinde leke bırakırlar. Uçucu yağlar yağ asidi, trigliserit, yapısında değildirler. Ancak ışık ve hava karşısında zamanla oksitlenir ve reçineleşirler. Yine sulu etenolde çözünebilme özelliği bu yağları sabit yağlardan ayıran bir özelliktir [13].

Doğada yetişen 300'e yakın bitki familyasından yaklaşık 1/3'ü uçucu yağ içermektedir. Uçucu yağ taşıyan bitkiler daha çok sıcak iklim bölgelerinde yetişmektedirler. Tropik ve subtropik bölgelerde ılıman iklim kuşağının sıcak yörelerinde bu kokulu bitkiler bulunmaktadır. Ülkemizde ise Akdeniz bölgesi uçucu yağ taşıyan bitkiler bakımından en zengin bölgelerden biridir. Günümüzde ticari amaçlı üretim yapılan uçucu yağ bitkilerinin sayısı 40'ı geçmektedir. Özellikle bazı familyalar uçucu yağ taşıyan bitkiler nedeni ile önem kazanmıştır. *Labiatae* familyasında bulunan ve birçok Akdeniz ve Avrupa ülkelerinde yapılan *Thymus* türleri, *Lavandula* türleri, *Mentha* türleri, *Melissa officinalis* türü ve diğer bazı bitkiler değerli uçucu yağ kaynaklarıdır. Aynı bölgelerde yetişen *Umbelliferae* familyasından birçok bitki de uçucu yağ olarak tanınmaktadır. *Pimpinella anisum*, *Pipinella anisetum*, *Foeniculum vulgare*, *Carum carvi*, *Coriandrum sativum* gibi bitkiler bu familyanın en çok bilinen örnekleridir. Bunlar gibi *Myrtaceae*, *Compositae*, *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Iridaceae*, *Umbelliferae*, *Lauraceae*, *Zingiberaceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Pinaceae* gibi familyalarda da çok sayıda uçucu yağ taşıyan bitkiler bulunmaktadır [10,13].

*Pinaceae*, *Cupressaceae* gibi bazı familyalarda uçucu yağ reçine ile beraber bulunur ve bitkiden elde edilen Olerezinin su buharı destilasyonu ile karışımından ayrılır [14,15].

Dünyada uçucu yağ üretimi birçok ülkede yapılmaktadır. Uçucu yağ üreten ülkeler arasında gelişmekte olanların yanında gelişmiş ülkeler de bulunmaktadır. Bu durum uçucu yağ bitkilerinin üretiminin gelişmiş ülkelerde karlı olması nedeni ile yapıldığını göstermektedir. Ayrıca fazla bir yatırıma gerek duymadan uçucu yağın elde edilebileceği, uçucu yağın gelişmiş ülkeler yanında az gelişmiş ülkelerde de elde edilmesinden anlaşılmaktadır [13].

Uçucu yağlar çok konsantre ürünler olduklarından yükte hafif ucuz ürün niteliğine sahiptirler. Üretimleri genel olarak teknik açıdan güç değildir ve uzun mesafelere, deniz aşırı ülkelere taşınmaları kolaydır.

Türkiye özellikle uçucu yağ içeren bitkiler bakımından çok zengin bir floraya sahip bulunmaktadır. Ancak gül dışında hemen hemen hiçbir uçucu yağ bitkisinin büyük bir üretim alanı bulunmamaktadır. Sadece uçucu yağ bitkileri bakımından zengin bir floraya sahip olmamız nedeni ile floradan toplanan bitkilerin bir kısmından yağ elde edilmektedir [10,13].

Uçucu yağlar genellikle oda sıcaklığında sıvıdırlar; ancak gül yağı, anason yağı gibi sıvı olmayan bazı uçucu yağlarda vardır. Buharlaştıklarında geride herhangi bir kalıntı bırakmazlar. Fiziksel özellikleri yönünden uçucu yağlar birbirine genellikle benzerler. Genel olarak kırılma indisleri yüksektir ve optikçe aktifirler. Tüm lipofil çözücülerde (petrol eteri, kloroform, benzen, eter vs.) iyi çözünürler. Buna karşın suda çok azı çözünür (1/200 oranında). Ancak bu çözünme kokularının suya geçmelerine yeter. Uçucu yağlar genel olarak renksiz veya açık sarı renklidir.

Ancak karanfil yağı gibi sarıdan kahverengiye veya papatya yağı gibi yeşilden maviye kadar değişik renkte olanları da vardır. Ayrıca uzun süre açıkta kalacak olurlarsa renkleri koyulaşır. Uzun süre saklamada, ışık veya oksijenin etkisi ile uçucu yağların bazıları reçineleşir. Bu durumda genellikle bir koku değişimi ve yağın kalitesinin azalışı söz konusu olur [10].

## 1.2. Uçucu Yağların Sınıflandırılması

Uçucu yağlar değişik özelliklerine göre gruplara ayrılabilir. Bunlar kimyasal bileşimleri aromatik özellikleri farmakolojik ve terapik etkileri göz önünde bulundurularak gruplandırılabilirler [13].

### 1.2.1. Kimyasal Bileşimlerine Göre Uçucu Yağlar

Kimyasal bileşimleri yönünden değişik drogların uçucu yağları çok farklılıklar gösterir. Uçucu yağlardaki çeşitli maddeleri 4 grup altında toplayabiliriz.

1. Terpenik maddeler
2. Aromatik maddeler
3. Düz zincirli hidrokarbonlar
4. Azot ve kükürt taşıyan bileşikler

Uçucu yağların büyük çoğunluğu terpenik maddelerden oluşmuştur. Terpenleri yapılarına göre şu şekilde gruplandırılabilir.

**Çizelge 1.** Terpenlerin Sınıflandırılması

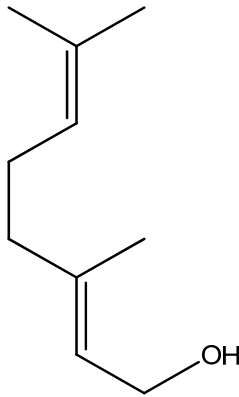
İzopren Sayısı	Karbon Sayısı	Sınıfı
1	5	Hemiterpen
2	10	Monoterpen
3	15	Seskiterpen
4	20	Diterpen
5	25	Sesterpen
6	30	Triterpen
7	40	Tetraterpen
n	(5C)n	Politerpen

### 1.2.1.1. Monoterpenler(C<sub>10</sub>)

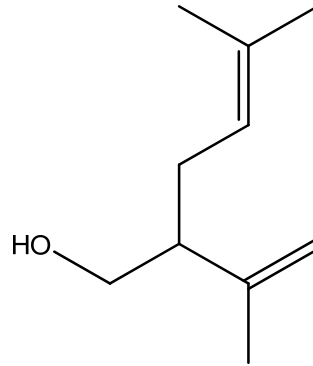
Bugün uçucu yağlarda 150'den fazla monoterpen bulunmuştur. Monoterpenler başlıca üç grup altında toplanabilir:

- Etken maddeleri asiklik monoterpen türevi olanlara örnek olarak Osimen, Sitral, Sitronellal, Geraniol gösterilebilir.
- Etken maddesi monosiklik monoterpen türevi olanlara örnek olarak Terpinen, Mentol, Menton, Kırminal gösterilebilir.
- Etken maddesi bisiklik monoterpen türevi olanlara örnek olarak Sabinen, Tujon, Kamfen gösterilebilir.

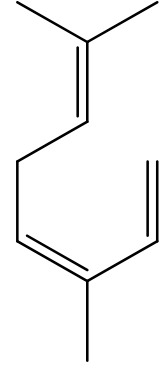
Monoterpenler birçok uçucu yağın ana bileşenidir. Tatlandırıcı ve parfüm olarak öneme sahiptirler. Alifatik yapıda örnekler; mirsen, geraniol ve lavandulol olarak verilebilir. Açık zincirli yapılar pek çok iyi tanınan bileşiği ihtiva eder. Bunlar arasında mentol, kanifor, pinen ve limonen sayılabilir. Mirsen şerbetçiotu (*Humulus lupulus*) yapraklarında olduğu gibi defne yapraklarının uçucu yağında da bulunur. Bu madde parfüm üretiminde ara ürün olarak kullanılır. Linalol ile izomer olan geraniol gül yağının ana yapısını oluşturur. Aynı zamanda limon otu ve diğer bazı bitkilerin uçucu yağında ve bu türün ait olduğu familyanın diğer türlerinde bulunur. Karvon kimyon tohumunun ana koku verici bileşenlerinden biri olan monoterpendir. Linalol genel bir baharat olan kişniş (*Coriandrum sativum*)'in bileşenlerinden biridir. Safranöl, safran (*Crocus sativus*)'nın karakteristik kokusundan sorumludur. Ökalyptol, ökalyptus yaprağının uçucu yağının ana bileşenidir [11].



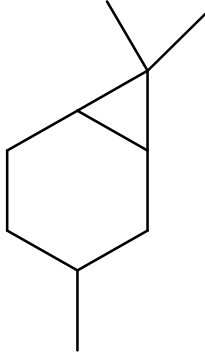
Geraniol



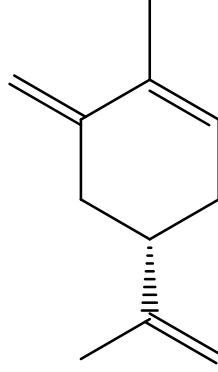
Lavandulol



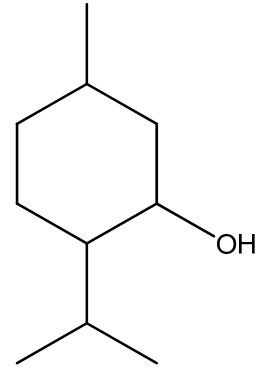
Mirsen



Karan



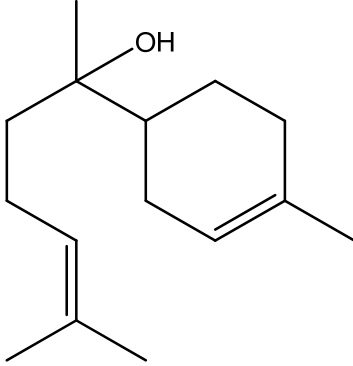
Karvon



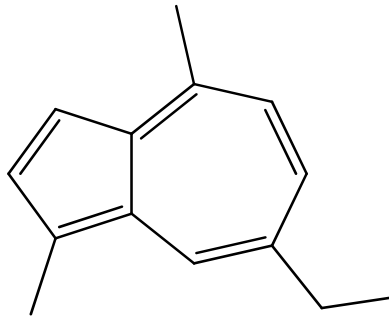
Mentol

### 1.2.1.2. Seskiterpen(C<sub>15</sub>)

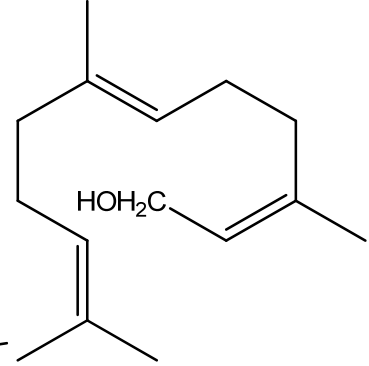
Bunlarda asiklik, monosiklik bisiklik ve trisiklik seskiterpenler olarak alt gruplara ayrılır. Bugün uçucu yağlarda 1000 kadar seskiterpen bağlantılı türevler bulunmaktadır. Seskiterpenlere örnek olarak Bisabolol, Kamazulen, Farnesol verilebilir.



Bisabolol



Kamazulen



Farnesol

### 1.2.1.3. Diterpenler (C<sub>20</sub>) ve Triterpenler (C<sub>30</sub>)

Terpenik ve aromatik maddelerin oksijensiz ya da oksijenli türevlerinden bir çoğu bir uçucu yağda karışım halinde bulunmaktadır. Oksijensiz olanlar çoğunlukla kolay uçucudurlar. Uçucu yağlar düşük sıcaklıklarda bile sıvı halde kalabilirler. Oksijenli türevler ise daha az uçucudurlar ve uçucu yağ soğutulduğunda bir çoğu çökerek oksijensiz bileşiklerden az veya çok

ayrılırlar. Bazı uçucu yağlarda çöken kısımda doymuş hidrokarbonlar bulunabilir. Uçucu yağ soğutulunca çöken kısmına stearopten, bu koşullarda sıvı halde kalan kısmına da elaopten adı verilir. Uçucu yağlara fraksiyonlu destilasyon uygulandığı zamanda ilk ele geçen fraksiyonlar elaoptenden oluşan oksijensiz bileşiklerdir. Terpenlerin oksitlenmesi ile meydana gelen oksijenli türevler uçucu yağın kendine özgü kokusunu, tadını ve terapik özelliğini verirler. Uçucu yağlarda asıl önemli olan bileşikler oksitlenmiş türevleridir. Bu nedenle droglar sınıflandırılırken uçucu yağlardaki bulunan oksijenli bileşikler esas alınır.

#### **1.2.1.4. Aromatik Özelliklerine Göre**

Uçucu yağlar koku ve tat özelliklerine göre de gruplandırılabilirler. Buna göre uçucu yağlar Aromatika (çok kokulu ve tadı iyi olanlar), Aromatika-aroma (kokulu ve tadı acı olanlar) ve aromatika-acria (kokulu ve tadı keskin olanlar) olmak üzere üçe ayrılırlar.

#### **1.2.1.5. Farmakolojik ve Terapik Etkilerine Göre**

Uçucu yağlar farmaside farmakolojik ve terapik etkilerine göre de gruplandırılırlar. Farmakolojik etkilerine göre de uçucu yağlar antiromatizmal, öksürük kesici, idrar söktürücü, iltihap azaltan, dezenfektan vs. gibi gruplandırmaya tabi tutulurlar.

#### **1.2.2. Uçucu Yağların Elde Edilme Yöntemleri**

Uçucu yağlar bitkilerden miktar, kararlılık ve bileşenlerine bağlı olarak değişik şekillerde elde edilebilir. Yapılan bu çalışmada bu yöntemlerden sadece su destilasyonu ve su-buhar destilasyonu yöntemleri kullanılmıştır.

Uçucu yağ elde etmede uygulanan yöntemler başlıca 3 grupta toplanır:

1. Destilasyon Yöntemi
2. Mekanik Yöntem (Presleme Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)
3. Anfloranj Yöntemi (Ekstraksiyon Yoluyla Uçucu Yağ Elde Edilmesi)

#### **1.2.3. Destilasyon Yöntemi**

Destilasyon yöntemi ile uçucu yağ eldesinde şu yöntemler uygulanır

- Su Destilasyonu
- Buhar Destilasyonu
- Su-Buhar Destilasyonu
- Kuru Destilasyon

- Hidrofüzyon
- Maserasyon ile destilasyon
- Soğuk yağ ile özütleme
- Sıcak yağ ile özütleme
- Organik çözücülerle özütleme
- Sıkma ile yapılan mekanik özütleme
- Çizerek özütleme

### **1.2.3.1. Su Destilasyonu Yöntemi**

Su ile temasta iken kaynatıldığında üründe bozunmanın olmadığı hallerde uygulanan yöntemdir. Bu yöntemle bitkilerden uçucu yağ elde edilebildiği gibi aromatik suda elde edilebilmektedir [16].

Uçucu yağların çoğunun kaynama noktası suyun kaynama noktasından yüksek olmasına rağmen uçucu yağların su buharıyla sürüklenebilme özelliğinden ve su buharının kısmi basıncının da etkisiyle normal kaynama noktalarının altındaki sıcaklıklarda buharlaştırılabilmektedirler [17,16].

Bu işlem için kullanılacak olan su miktarı bitkisel drogu neredeyse örtecek kadardır. Sistem daha sonra dışarıdan bir su banyosu ya da mantolu ısıtıcı yardımıyla ısıtılır. Buharlaşan su ve beraberindeki yağ soğutucuda yoğunlaştırılır ve buradan ayırma kabına gelir. Ayırma kabında yağ ve su yoğunluk farkı esasına dayanılarak ayrılır.

Su destilasyonu ile uçucu yağ elde edilmesi sırasında uçucu yağ bitki membranlarından sıcak su ile difüzyonlanmaktadır. Kaynar su dokulara nüfuz ederek öncelikle kuvvetli polar maddeleri çözer. Karışım hücre cidarlarından difüzyona uğrar ve ısı etkisiyle hemen buharlaşır. Düşük polariteye sahip ve apolar maddeler ise daha sonra destillenir. Ancak bu işlem sırasında uçucu yağdaki bazı bileşenlerin hidroliz olması gibi veya ısı etkisiyle yağda bozunma ve parçalanması gibi bazı istenmeyen etkiler de ortaya çıkmaktadır [17,19].

### **1.2.3.2. Buhar Destilasyonu Yöntemi**

Doygun buharla taze bitkilere uygulanan bir yöntemdir. Atmosferik basınçta yapılabildiği gibi nispeten atmosferik basınçtan yüksek basınçta da uygulanabilmektedir. Su destilasyonunda olduğu gibi bu yöntemde ısıdan bozunmayan yağlar için uygulanır [18]. Buhar bitkinin bulunduğu kaba alttan gönderilir. Beraberinde uçucu yağı da sürükleyen buhar soğutucuda yoğunlaştırıldıktan sonra ayırma kabına gönderilerek yağ ve su birbirinden ayrılır [17,18,20].

### 1.2.3.3. Su-Buhar Destilasyonu Yöntemi

Su-buhar destilasyonunda, bitkisel materyal kazanın altında bulunan ısı kaynağı ile doğrudan temas edemez. Bununla beraber kazanın cidarları ısıyı iyi iletir ve kazanın kenarına değen bitkisel materyalde sıcaklık nedeniyle bozunma meydana gelebilir. Bu işlemin dezavantajı kullanılan buhar ıslak olduğu için kullanılan materyal tamamen ıslanır ve bu durum destilasyon hızının yavaşlamasına neden olur. Ayrıca kazanın alt kısmında suyun toplanması geriye döngüye neden olur. Rifleks (geri çevirme) kontrolünü sağlayan bir cihaz yerleştirilirse bunun önüne geçmek mümkündür [21].

Su-buhar destilasyonunun su destilasyonuna olan avantajlarını aşağıdaki gibi sıralamıştır [21].

- Yağ verimi daha yüksektir.
- Yağın bileşikleri hidroliz ve polimerizasyona daha az maruz kalırlar.
- Rifleks kontrol edilirse polar bileşiklerin kaybı en aza iner.
- Su-buhar destilasyonu ile üretilen yağın kalitesinin yeniden üretilebilirliği daha yüksektir.
- Su destilasyonuna göre daha hızlı bir işlemdir.

### 1.2.3.4. Kuru destilasyon

Kuru destilasyonda (parçalayıcı destilasyon) bitkinin çeşitli kısımları doğrudan kuru bir şekilde ısıya maruz bırakıldığında bitki içinde bulunan uçucu maddeler kısmen oldukları şekilde, kısmense parçalanarak destile olurlar. Hiç uçucu olmayan maddelerde parçalanarak uçucu maddeler haline gelip destile olurlar. Kuru destilasyon işlemi özel destilasyon aparatlarında yapılır. Ağaç, odun ve dallar kurumaya bırakılır, parçalara bölündükten sonra kazanlara doldurulup destile edilir. Destilasyonla geçen kısımlar su ile soğutulan kondansatörlerde yoğunlaşırlar. Çeşitli kodekslerde bu şekilde elde edilmiş preparatlar vardır. Bunlara katran adı verilir, kayın ağacı katranı ve ardıç katranı örnek olarak verilebilir [22].

### 1.2.3.5. Hidrofüzyon

Bu yöntemle elde edilen yağ verimi buhar destilasyonu ile elde edilenden daha yüksektir. Destilasyon süresi kısa ve daha az buhar harcadığı için daha az masraflıdır. Bu yöntemin dezavantajı buhar ve kondanse olan su aşağı doğru hareket ederken uçucu olmayan veya uçuculuğu az olan lipitler, klorofil, yağ asitleri ve kumarinler gibi suda çözünen bazı maddeler yağa geçebilirler [21].

### 1.2.3.6. Maserasyon ile destilasyon

Glikozit yapısında uçucu bileşik içeren bitkiler, içerdikleri uçucu yağın açığa çıkması için sıcak suyun içinde maserasyona bırakılır. Badem çekirdekleri, soğan, sarımsak, hardal tohumu gibi droglar bu özelliğe sahiptir [21].

### 1.2.3.7. Soğuk yağ ile özütleme

Hasat edildikten sonra bir gün veya daha uzun süre fizyolojik aktivitelerini devam ettiren çiçekler (yasemin gibi) soğuk yağ ile özütlenirler. Yöntem için genellikle saflaştırılmış domuz yağı ve iç yağı karışımı gibi kokusuz ve uygun kıvamda bir yağ seçilir ve kenarları tahta çerçeve ile kaplanmış bir cam plak üzerine yayılır ve yağ kaplı bir plak bunun üzerine kapatılır. Taze olarak toplanmış çiçekler yağın üzerine serpilir, bir gün bekletilir ve yerine yenileri konur. Bu işleme yağ tamamen doyuncaya kadar devam edilir ve elde edilen ürüne 'pomat' denir. Pomat alkol ile özütlenir, alkolde çözülmüş durumdaki yağ süzülür ve alkol düşük basınçta destilasyonla uzaklaştırılır, ürüne 'absolü' adı verilir [23,24].

### 1.2.3.8. Sıcak yağ ile özütleme

Yöntemin soğuk yağ ile özütlemeden belirgin farkı, koparma sonucu fizyolojik aktiviteleri hemen duran gül, mimoza, akasya, portakal çiçeği gibi çiçeklerin 60-70 °C sıcaklıktaki yağa daldırılarak özütlenmesidir. Doygun yağ süzülerek 'pomat' elde edilir, soğuk yağla özütlemeye benzer yolla pomattan alkol özütü ve 'absolü' hazırlanır [23,24].

### 1.2.3.9. Organik çözücülerle özütleme

Taze bitkisel materyaller petrol eteri, heksan, diklormetan, benzen, aseton gibi saf çözücülerle, bazı özel durumlarda iki çözücü karışımı ile özütlenebilirler. Özüt, düşük basınçta konsantre yağ veya konkret olarak elde edilir [24,25]. Özellikle ısıya karşı hassas ve buhar destilasyonu ile elde edilemeyecek kadar küçük miktarda bulunan yağlar bu yöntemle elde edilir. Ancak uçucu yağlarla birlikte kullanılan çözücüde çözünebilir diğer maddeler de özütlenirler. Kullanılacak olan çözücü inert düşük kaynama noktalı, seçici bir etkiye sahip, ucuz, kolay bulunur ve su ile karışmayan bir çözücü olmalıdır [24,26,27]. Çözücü ile özütlemenin başlıca sakıncası özütte çözücü artığının kalması ve bu nedenle toksit risk oluşturmasıdır. Ayrıca verimli bir özütleme için uzun bir süre gerekmektedir.

### 1.2.3.10. Sıkma ile yapılan mekanik özütleme

Uçucu yağların bazıları kimyasal kompozisyonları ve doğaları gereği ısıdan etkilendiklerinden destilasyon işlemine tabi tutulmazlar. Örneğin, narenciye meyvelerinden uçucu yağların elde edilmesi için mekanik özütleme uygulanır.

#### **1.2.3.11. Çizerek özütleme**

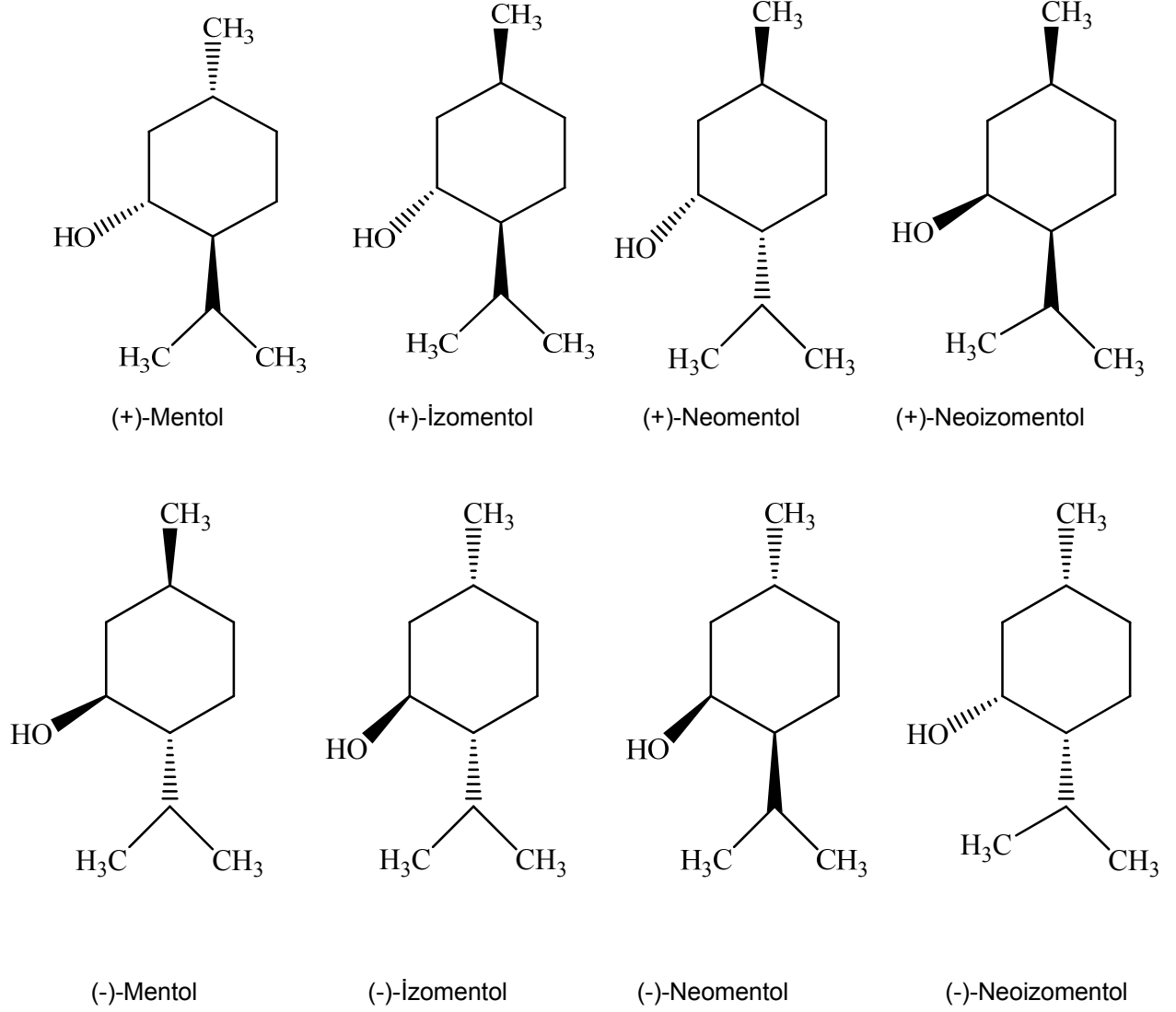
Canlı çam ağaçlarında reçinenin ağaç bünyesinden alınmasında 'yaralama tekniği' ve uyarıcılarla 'tahrik tekniği' kullanılır. Yaralama tekniğinin çeşitli yöntemlerinden bir olan oluklu çizgi yöntemi ülkemizde 1950'li yıllardan günümüze kadar uygulanmıştır. 1980'li yıllarda ise asit-pasta tahrik tekniği deneme maliyetinde uygulanmaya başlamış, daha sonra yaralama tekniği tamamen terk edilerek, bu teknik yaygınlaştırılmıştır [28].

### **1.3. Mentolün Özellikleri**

Terpen alkollerden (-)- mentol vanilya ve turunçgillerden sonra en önemli tatlandırıcı maddedir ve diş macunlarında, losyonlarda ve diğer bir çok kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır. (-)-Mentolün eşsiz bir rahatlatıcı ve lezzeti vardır. Mentol lezzetinin yanı sıra eczanede ve tıpta iyileştirici özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Başka bir alan da yaklaşık % 25 mentol üretiminin kullanıldığı tütün endüstrisidir [30].

Mentolün temel yapısı, bir metil, bir hidroksil ve bir izopropil gruplarına sahip düzlemsel olmayan sikloheksan halkasıdır. Sikloheksanın iki yaygın konformasyon şekli (sandalye ve kayak formu) termodinamik olarak sandalye formu tercih edilir. Yer değiştiren gruplar aksiyel veya ekvatoryel konumda kalabilirler. Mentol üç tane kiral merkeze sahiptir, böylece sekiz farklı konformasyonu Şekil 2 'de görüldüğü gibi mümkündür.

Mentol molekülü 4 çift görsel izomerden oluşmaktadır. Bunlar ( $\pm$ )- mentol, ( $\pm$ )-izomentol, ( $\pm$ )-neomentol( $\pm$ ), ( $\pm$ )-neo-izomentol'dur. Bu 8 görsel aktif izomerden sadece (-)-mentol karakteristik nane kokusunu ihtiva eder, deri ve burunda eşsiz bir ferahlama hissi oluşmasını sağlar [29]. Tüm yer değiştiren grupları ekvatoryal konumda olan (-)-mentol izomeri en çok istenen üründür [30].



**Şekil 2.** Mentolün sekiz farklı konformasyonu

### 1.3.1. Mentolün Biyolojik Özelliği

Mentol soğuk hassas tetik yeteneğine sahip kimyasal TRPMS deri reseptörleri cilt için kullanılır, ya da uygulanan zamandan sorumlu bilinen soğutma hissini kışkırtır [31]. Benzer anlamda kapsaisin, sıcak müstehcenlik ve sorumlu biber olan kimyasallardandır. Mentol cildin sahip olduğu analzenik özelliklerini  $\kappa$  aktivasyonu yoluyla opioid reseptörler ile seçici bir aracılık yapar [32]. Mentolde etkinliğini artıran ibuprofen ile topikal uygulamalarda vazodilatasyon fonksiyonu ile mümkündür [33]. Uçucu yağların patojenler üzerine olan antimikrobiyal etkilerinin petri kabı ve sterilize süt ortamında incelendiği araştırmaya göre; nane uçucu yağının

antimikrobiyal aktivitesi, petri kabı ortamında 30 mikrolitrede elde edilmiştir. Laktik asit bakterileri üzerine ise gelişimi teşvik edici bir etki düşük düzeyde elde edilmiştir [35].

### 1.3.2. Mentol Üretimi

Dünya çapında yılda yaklaşık 18000 ton mentol üretilmektedir. Çoğunluğu Japon nanesinden (*mentha arvensis*) ya da İngiliz nanesinden (*mentha piperita*) ve yaklaşık  $\frac{1}{4}$  ü sentetik olarak üretilmektedir [30]. Mentolün büyük bir kısmı donmuş nane ve yabancı nane yağlarından elde ediliyor olsa da suni yollarla da elde edilebilir. 1998'de dünyadaki mevcut üretimin %20'sini oluşturan 2500 ton mentol suni yollarla üretilmekteydi. Dünyada suni mentol hali hazırda Haarmann & Reimer ve Takasago International Corporation adlı iki şirket tarafından üretilmektedir. Haarmann & Reimer sürecinde rasemik mentol stereospesifik bir ham madde olup m-cresol'ün propillenmesinden üretilen timolün hidrojenlenmesinden elde edilir. Mentol ayrıca rasemik mentolün kristallendirme ile ayrıştırılmasından da elde edilebilir. Bu, suni mentol üretiminde başvurulan ilk ticari yöntemdir. 1980'lerin başında Takasago, mircenden (-)-mentol üretmek için asimetrik bir sentez teknolojisi geliştirdi [29].

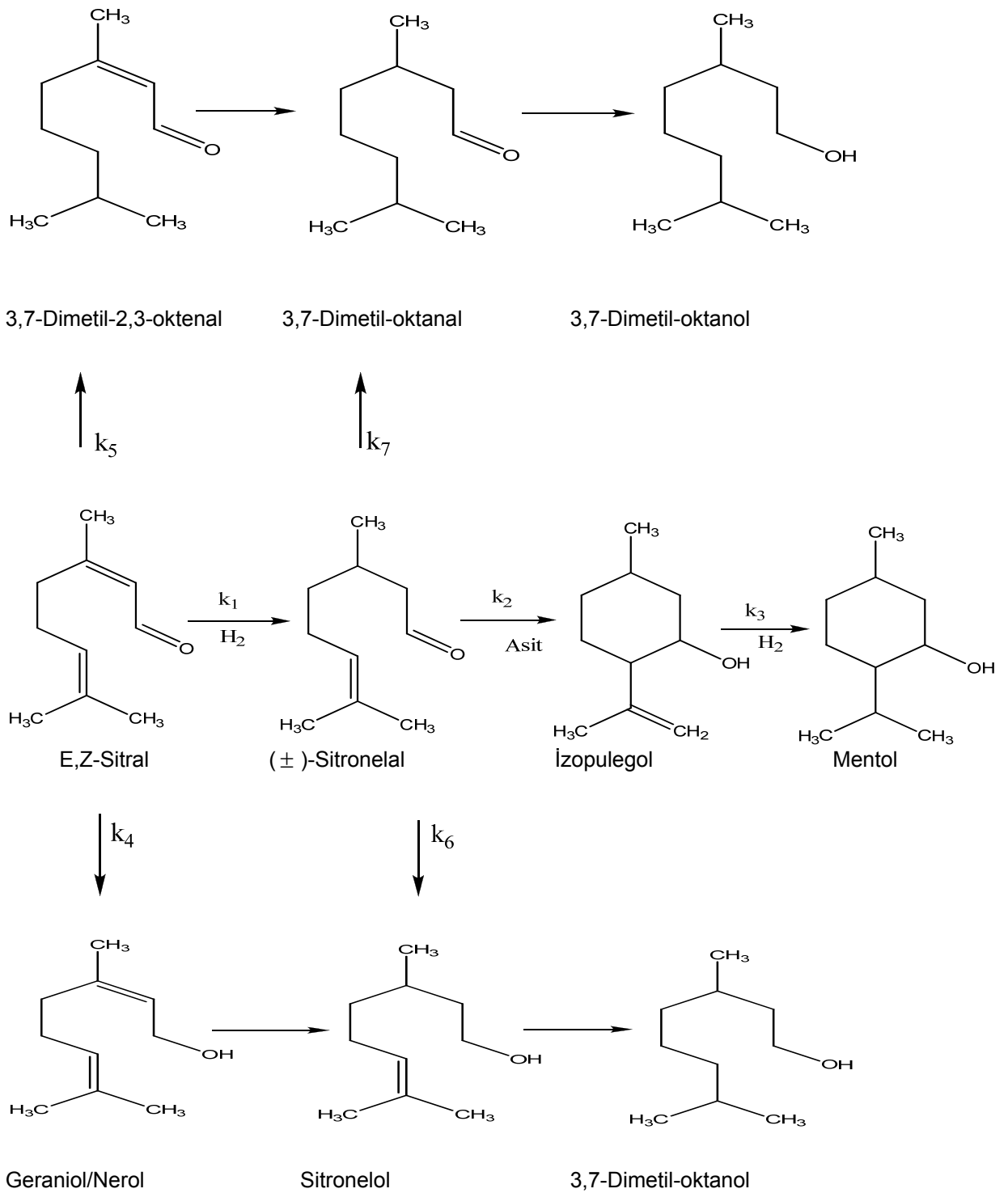
Genellikle, mentolün endüstriyel sentezi için iki yöntem kullanılmaktadır. Birinci yöntem, proste hemen bir kiral işaretlemesi elde etmek ve proses sonunda yalnız (-)-mentol geri kazanmak için proses boyunca kiral bilgisini göz önünde bulundurmaktadır. Bu Japonya'da Takasago proses içinde yapılır. İkinci yöntem olarak, bir ( $\pm$ )-mentol rasemik karışımı timolün heterojen katalizli hidrojenasyonu tarafından sentezlenebilir, damıtma ve kristallendirme ile hedef molekül (-)-mentol kazanılır. Bu Symrise prosesi içinde yapılır [30].

#### 1.3.2.1. Sitralden Mentol Sentezi

Hali hazırda dayanıklı ham materyallerden suni veya yarı suni mentol elde etmek için hatırı sayılır ölçüde uğraş verildi. Başlangıç olarak sitralin sitronelale hidrojenlenmesi, devamında sitronelalin izopulegole izomerlenmesi ve son olarak izopulegolün mentole hidrojenlenmesi süreçlerinden oluşan, tek adımlı yöntemde yüksek seçicilikte sitralden mentol sentezi çalışmaları yapılmaktadır [29].

Suni yolla sitralden mentol elde etme ilgi çekici bir yöntemdir, çünkü sitral, %70–80 oranında sitral içeren limon yağı gibi yağların damıtılmasından elde edilen yenilenebilir ham materyaldir [29].

Sitralden mentole doğru olan tepkime yolu 3 adımdan ibarettir: a) Sitralin sitronelale hidrojenlenmesi, b) Sitronelalin izopulegole izomerlenmesi/zincir reaksiyonu, c) İzopulegolün mentole hidrojenlenmesi



**Şekil 3.** Sitralden mentol eldesi

Şekil 3'te görülüyor ki; sitralin mentole seçici dönüşümü sadece sitralden mentole dönüşümün çiftlenmiş hidrojenlenme / izomerleşme tepkimelerinin yükseltgeme değil, sitralin nerol/geraniol veya 3,7-dimetil-2,3 oktenale ve sitronelalin sitronelole veya 3,7-dimetiloktanale paralel hidrojenlenme tepkimelerini minimize etme yeteneği olan iki işlevli katalizörler gerektirir. Başka bir deyişle, kinetik açıdan bakılırsa sitralden mentolün seçici dönüşümü  $k_1 \gg (k_4 + k_5)$  ve  $k_2 \gg (k_6 + k_7)$  şartlarını gerektirir [29].

Sitralin sıvı fazda hidrojenlenmesi, çözücü olarak izopropanol veya toluen kullanılarak 343 ve 393 K sıcaklıktaki Parr 4843 reaktöründe gerçekleştirilir. Basıncılı kap 150 ml çözücü, 10 ml sitral ve 0,2–1 g katalizör ile doldurulur. Katalitik testlere bağlı olarak örnekler eski yerlerinde 473 K sıcaklıkta 1 saat boyunca akıcı hidrojen (30ml/dk) içinde aktive edilir. Tepkime sistemi 2 K/dk sıcaklığına ısıtılır ve basınç  $H_2$  ile aniden 506,5 veya 1013 kPa'ya çıkarılır. Sitronelalin sıvı faza dönüşümü, sitral hidrojenlenmesi için kullanılan reaktör içinde gerçekleştirilir. Reaktör 150 ml toluen, 2 ml sitronelal ve 0,200 g katalizör ile doldurulur. Tepkime 343K sıcaklıkta ve 560 kPa nitrojen basınçta gerçekleştirilir. Ürün konsantrasyonları tepkime boyunca Agilent 6850 GC kromatograf yanında alev iyonizasyonu dedektörü sıcaklık programlayıcısı ve 30-m Supelco  $\alpha$ -DEX ince çubuğuyla birlikte 30-m Innowax çubuğu kullanılarak gaz kromatografisi tarafından takip edilir. 500 dakika boyunca her 15-30 dakikada bir bilgi toplanır. Seçicilikler:

$$S_j (\%) = \frac{C_j}{\sum C_j} \times 100 \quad \text{formülü ile hesaplanır.}$$

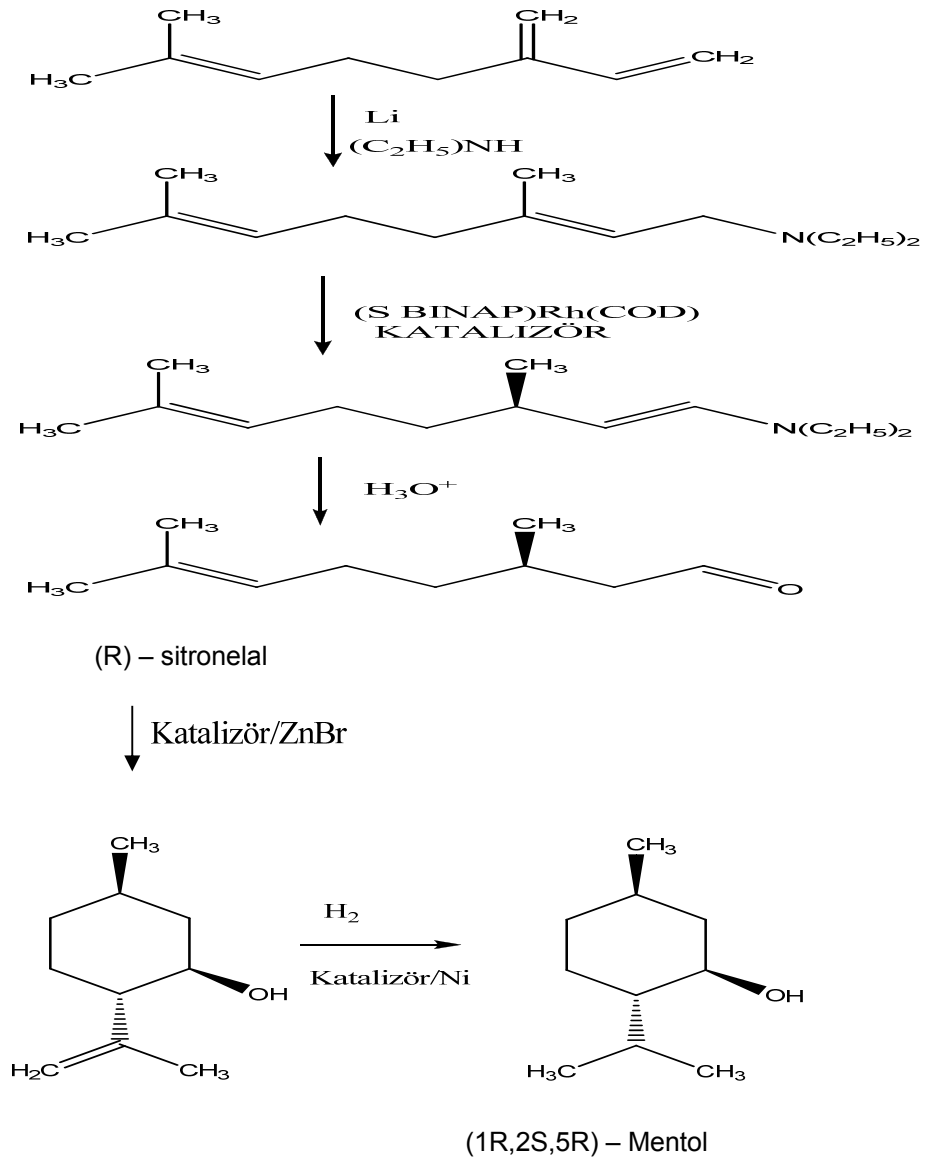
Burada  $C_j$  = ürününün konsantrasyonudur. [29]

### 1.3.2.2. Symrise Prosesi ile Mentol Sentezi

Bir ( $\pm$ )-mentol rasemik karışımı timolün heterojen katalizli hidrojenasyonu tarafından sentezlenebilir. Timolün hidrojenasyonu, % 60 ( $\pm$ )-mentol , %30 ( $\pm$ )-neomentol ve %10 ( $\pm$ )-izomentol ile ilgili olan rasemik karışımların dengesine dayanır neoizomentol önemsiz miktarda oluşur. Böylece istenmeyen stereo izomerlerin %40'ı damıtma ile ayrılması gerekir ve sonradan katalitik olarak nikel katalizörü ile epimerlerine dönüştürülür. Elde edilen mentolce zengin karışım damıtma ile geri kazanılır. Bu çalışma da prosesin merkez parçası olan mentol stereoizomerlerinin epimerizasyonu çalışılır. Epimerizasyon, çok uzun dinlenme süreleri olan bir damla yatak reaktörde 150-250 °C sıcaklıkta hidrojen basıncı (5-10mPa) altında nikel katalizörü ile gerçekleştirilir [30].

### 1.3.2.3. Mirsen ile Mentol Sentezi

Mentha arvensis birincil türüdür, nane doğal mentol yapmak için kullanılan kristaller ve doğal mentol gevreğidir. Bu türler öncelikle Uttar pradesh Bölgesinde Hindistan'da yetiştirilir. Mentol (1R, 2S, 5R) formlardan meydana gelen yağ nane doğal olarak menton estermenthyl asetat ve diğer bileşiklerden elde edilen, Menthyl piperita'dır. Mentol de yüzde birlik küçük bir kısım Japon Epimerneomenthol içerir. Mentol biyosentezi araştırılmıştır *M. piperita* ve biyosentezi yer alan tüm enzimler tespit edilmiş ve karakterize edilmiştir. Asimetrik sentez liderliğindeki bir ekip tarafından geliştirilen Ryoji Noyori şekil 4 deki gibidir

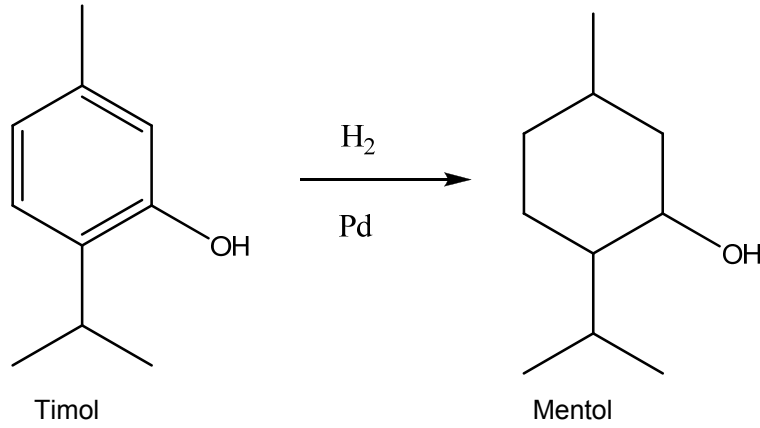


Şekil 4. Ryoji Noyori mentol sentezi

Süreci oluşturarak başta allil den amin myrcene uğrar, asimetric izomerizasyon varlığı ile BINAP rodyum kompleksi vererek ve sonra hidroliz edilerek enantiomerically saf *R*-sitronelal elde edilir. Bu bir tarafından cyclised olan karbonil-ene-reaksiyon tarafından başlatılan çinko bromür saf vermek için izopulegol hidrojen katılır ve (*1R*, *2S*, *5R*)-mentol elde edilir. Rasemik mentol hidrojenizasyonu tarafından timol ve mentol hidrojenasyonu sonucu birde pulegone oluşur.

#### 1.3.2.4. Timol'ün Katalitik Hidrojenasyonu

Timol'ün katalitik hidrojenlenmesiyle elde edilen mentol, rasem şeklinde olup bunun ftalesteri, brusinle antipodlarına ayrılır. Birbirinden farklı kristal şekillerinde billurlaşan bu mentol cinsleri kararsız olup sadece 42.5 °C'de eriyen d ve l-mentol ile -22 °C'de eriyen d,l-neo mentol kararlıdır. Diğer izomerleri saf halde elde etmek mümkün olmamıştır. Reaksiyon Şekil 5'de gibidir [34].



**Şekil 5.** Timol'ün katalitik hidrojenlenmesiyle elde edilen mentol

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Tedavi amacı ile kullanılan bitkilerin sayısı antik çağlardan beri devamlı artış göstermektedir [38]. Baharatlar başlangıçta daha çok hastalıkların tedavisinde, dini törenlerde ve koku maddeleri üretmede kullanılmıştır. Gıdaları koruma, lezzet vererek iştah açıcı hale getirme özelliği ise diğer kullanımlarla birlikte gelişmiştir [36].

Tıbbi bitkiler ile tedavi, bitkilerin yumuşak etkileri nedeniyle bilhassa uzun süren hastalıklarda başarılı sonuçlar vermektedir [38]. Bitkisel drogların vücutta meydana getirdiği etkilerden bünyelerinde taşıdıkları kimyasal bileşikler sorumludur [40]. Droglarda selüloz, nişasta, pektin, protein, şeker vs. gibi tedavi yönünden etkisiz maddeler yanında çok az miktarlarda bile farmakolojik etkilere sahip bileşikler de bulunmaktadır. Bu bileşiklere “etkili madde” (müessir madde) ismi verilmektedir. Droglara tedavi özelliğini veren bu maddeler kimyasal yapılarına göre glikozitler, organik asitler, tanenler, alkaloidler, sabit yağlar, uçucu yağlar, reçineli bileşikler, vitaminler ve antibiyotiklerdir [38].

Ülkemizde *Mentha* cinsinin 7 türü bulunmaktadır [39]. *Mentha piperita* halk tarafından en çok kullanılan ve en iyi bilinen baharatlar arasındadır. Nane yağındaki mentol antiseptik özelliğine sahiptir. Ayrıca bulantı kesici, gaz ve safra söktürücü, midevi ağrıları giderici, terletici, ağrı kesici, yatıştırıcı, nefes açıcı, hazmettirici, spazm çözücü, solunum antiseptiği ve kasıntı giderici etkileri de bilinmektedir [36, 38].

Gherman ve ark. (2000), *Mentha pulegium*, *M. piperita*, *M. crispa* ve bitkilerinden buhar destilasyonu ile elde edilen uçucu yağı GC ve GC/MS ile analiz etmişlerdir. *M. piperita* bitkisine ait uçucu yağda başlıca bileşen mentol (%35) ve menton (%28) olmak üzere izomenton, mentil asetat,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, kafur, limonen, linalol ve piperiton olarak belirlenmiştir. *M. crispa* bitkisinin uçucu yağında da tüm bu bileşiklerin yanı sıra bulunan en önemli bileşeni karvon (%74); *M. pulegium* uçucu yağında ise belirlenen başlıca bileşenin pulegon (%74.7) olduğu bildirilmiştir [42].

Tassou ve ark.(2000), *M. piperita*'dan elde edilen uçucu yağın *Salmonella enteritidis* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Uçucu yağın belli oranlarda eklenmesinden sonra bakterilerde azalmalar görülmüştür. Ayrıca bu azalmaların sadece konsantrasyona değil sıcaklığa da bağlı olduğu çeşitli sıcaklık değerlerinde de denenerak belirlenmiştir [41].

Marino ve ark.(2001), *Lamiaceae* familyasına ait *S. officinalis*, *M. piperita* ve *O. vulgare* bitkilerinden buhar destilasyonu ile elde edilen uçucu yağları gaz kromatografisi ile analiz edilmiştir. Antimikrobiyal etkileri bakteriler üzerinde araştırılmıştır. Analiz sonucunda *S. officinalis*'in ana bileşenlerinin  $\alpha$ -thujon (%20.16), 1,8-sineol (%14.04) ve  $\beta$ -pinen (%10.09); *M. piperita*'nın mentol (%40.55), izomenton (%18.42) ve 1,8-sineol (%5.26); *O. vulgare*'nin ise timol (%46.84),  $\gamma$ -terpinen (%12.88) ve *p*-simen (%6.64) olduğu tespit edilmiştir [43].

Sartoratto ve ark. (2004), *Lamiaceae* familyasına ait olan *Mentha spicata*, *M. piperita*, *Origanum applii*, *O. vulgare* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından buhar destilasyonu ile uçucu yağ elde etmişlerdir. Uçucu yağların GC ve GC/MS ile yapılan analizi sonucu başlıca bileşenlerin; *O. vulgare* (%38.0) ve *O. applii* (%64.5) uçucu yağları için timol, *M. piperita* uçucu yağı için linalol (%51.0) ve karvon (%23.42), *M. spicata* uçucu yağı için piperitenon oksit (%94.8) olduğu belirtilmiştir [45].

Yadegarinia ve ark. (2006), iki bitkiden elde edilen uçucu yağları GC ve GC/MS ile analiz etmişlerdir. Bitkilerden biri olan nane uçucu yağında 26 bileşik belirlemişler olup ve ana bileşenlerin  $\alpha$ -terpinen (%19.7), izomenton (%10.3), transkarveol (%14.5), piperiton oksit (%19.3) ve  $\beta$ -karyofillen (%7.6) olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan antimikrobiyal testlerde ise nane uçucu yağının daha etkili olduğu bildirilmiştir [46].

## 2.1. Uçucu Yağların Elde Edilmesi ve Bileşimleri

Tıbbi ve aromatik bitkilerin etkileri eski çağlardan beri bilinmekte ve bu bitkiler bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bilim ve teknolojiye paralel olarak, bu bitkilerin içerdikleri bileşikler tespit edilmiş, insan, hayvan ve bitkilerde zararlı olan etmenlere karşı etki mekanizmaları belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun nedeni ise, pestisitlere alternatif olabilecek daha etkili ve güvenle kullanılacak, zararsız bileşiklerin arayışıdır. "Tıbbi ve Aromatik Bitkiler" olarak bilinen bu bitkilerin, yapılan kimyasal ve fiziksel analizleri sonucu bazı özellikleriyle ilgili veriler elde edilmiştir.

Uçucu yağlar (*essential oils*); bitkilerde oluşan, su buharıyla uçabilen, oda sıcaklığında çoğunlukla sıvı, ekstraksiyon veya su buharı destilasyonu ile elde edilebilen, genellikle renksiz veya açık sarı renkli, bulunduğu bitkiye özgü kuvvetli kokulu ve yakıcı lezzetli, çok sayıda bileşenden oluşmuş doğal ürünlerdir. Bitkinin bütününde (çam), taç yaprakta (gül), ağaç kabuğunda (tarçın), çiçek tomurcuğunda (karanfil), stigmada (safran), meyve kabuğunda (portakal), yaprakta (defne), meyvede (yenibahar), tohumda (hardal), kökte (melekotu), rizomda (zencefil), soğanda (sarımsak) bulunabilmektedir. Bazı bitkilerde ise, birden fazla organ uçucu

yağ taşımaktadır (yabankerevizi, rezene, turunç vb.). Bitkilerde uçucu yağın oluştuğu özel salgı cebi, kanalı, hücresi veya tüyü ya da parankima hücreleri bulunmaktadır. Bu da bitkinin familyasına, çeşidine ve organına göre değişmektedir. Bitkisel materyalin özelliğine göre uçucu yağlar değişik yöntemlerle (destilasyon, çözücüyle ekstraksiyon, presyon gibi) elde edilmektedir. Baharatlardan, su, su buharı veya buhar destilasyonu ile elde edilmektedir [47].

Güney Doğu Akdeniz Bölgesinde yapılan bir çalışma ile *Lamiaceae* familyasının 23 cinsine ait 70 tür farklı lokasyonlardan toplanarak teşhis edilmiş ve bu türlerin % yağ verimleri belirlenmiştir. Buna göre yağ verimi % 2 den büyük ise zengin, % 0,5-2 arasında ise orta zengin, % 0,5 den küçük ise fakir olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamaya göre, çalışılan türler arasında, *Thymus* ve *Thymbra* L. cinsleri zengin sınıfına *Origanum*, *Satureja*, *Salvia*, *Mentha* L., *Micromeria* Benth. L. ve *Nepeta* L. cinslerinin orta zengin sınıfına, *Sideritis*, *Melissa* L., *Prunella* L., *Lamium* L., *Wiedemanniana* Fisch & Mey L., *Ajuga* L. gibi cinslerin ise fakir sınıfına girdikleri belirlenmiştir [48].

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyal

*Mentha piperita* bitkisi 2010 bahar mevsiminde İzmir-Kemalpaşa bölgesinde yaşı olarak 5 kg toplandı. Bitki Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü tarafından bitkinin botanik tanımı yapıldı. Bitkinin toprak üstü kısımları gölgede kurutularak çözücü özütlerinin ve uçucu yağ elde edilmesinde, bitki öğütülerek belli bir tanecik boyutu haline getirildi.

#### 3.2. Kimyasal Materyaller

Kolon kromatografisi için silikajel 60G (Kieselgel 60G 0.063-0.200,Merck). İTK ve Preparatif İTK için silikajel kaplı Alüminyum plaklar (DC alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck) ve plaklar için Silikajel 60G kullanıldı.

Saflaştırma ve ayırma işlemlerinde; n-Hekzan, Eter, Kloroform, Etil Asetat, Aseton, KMnO<sub>4</sub> çözeltisi kullanıldı.

#### 3.3. Kromatografik Çalışmada Kullanılan Adsorbanlar

No	Yöntem	Adsorban
1	İnce Tabaka Kromatografisi	Silikajel DC alufolien Kieselgel 60 F <sub>254</sub> , Merck)
2	Kolon Kromatografisi	Silikajel (Kieselgel 60G 0.063-0.200,Merck

#### 3.4. Kromatografi Çalışmalarında Kullanılan Belirteçler

- UV Lambası ( $\lambda=254:\lambda=366$ )
- KMnO<sub>4</sub> çözeltisi

### 3.5. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Çözücü Sistemleri

No	Çözücü Sistemleri	Yöntem	Çözücü Miktarı (mL)
1	n-Hekzan	İTK	10
2	n-Hekzan:Dietil Eter	İTK	9:1
3	n-Hekzan:Dietil Eter	İTK	8:2
4	n-Hekzan:Dietil Eter	İTK	7:3
5	n-Hekzan:Dietil Eter	İTK	6:4
6	n-Hekzan:Dietil Eter	İTK	5:5
7	n-Hekzan:Dietil Eter:DCM	İTK	8:1:1
8	n-Hekzan:Dietil Eter:DCM	İTK	7:1:2
9	n-Hekzan:Dietil Eter:DCM	İTK	7:2:1
10	n-Hekzan:Dietil Eter:DCM	İTK	6:1:3
11	n-Hekzan:Dietil Eter:DCM	İTK	5:1:4
12	Dietil Eter:DCM	İTK	9:1
13	Dietil Eter:DCM	İTK	8:2
14	Dietil Eter:DCM	İTK	7:3
15	n-Hekzan:Dietil Eter:Etilasetat	İTK	8:1:1
16	n-Hekzan:DCM:Etilasetat	İTK	8:1:1

### 3.6. Yöntemler

#### 3.6.1. Uçucu yağın Elde Edilmesi

Gölgede kurutulmuş ve belli boyuta parçalanmış 2.8 kg *Mentha piperita* bitkisinin toprak üstü kısımları Clevenger tipi aparat kullanarak yaklaşık 5 saat hidrodestilasyona tabi tutuldu. Elde edilen uçucu yağ susuz sodyum sülfat üzerinde kurutulup süzüldü ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.



**Şekil 6.** Uçucu yağın cleveger aparatı ile elde edilmesi

### 3.6.2. Çözücü Özütlemesi

Bitkinin çözücü özütlerinin elde edilmesinde artan çözücü polaritesine bağlı olarak takip eden aşağıdaki özütleme sistemi kullanıldı:

1. n-hekzan özütlemesi: Kurutulmuş ve belli bir tane boyutuna getirilmiş bitkinin 25 gramı sohxlet haznesine yerleştirildi ve n-hekzan ile 5 saat özütleme yapıldı. Özüt beyaz bant süzgeç kağıdı ile süzildükten sonra çözücü vakum altında rotary evaporatörde 40 °C'de buharlaştırıldı +4 °C'de saklandı.
2. Etil asetat özütlemesi: n-hekzan özütlemesinden kalan bitkisel materyale bu kez etil asetat ile 5 saat sohxlet özütlemesine tabi tutuldu. Özüt beyaz bant süzgeç kağıdından süzildükten sonra çözücü vakum altında rotary evaporatörde 40 °C'de buharlaştırıldı ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.
3. Metanol özütlemesi: Etil asetat özütlemesinden kalan bitkisel materyale bu kez metanol ile 5 saat sohxlet özütlemesi uygulandı. Özüt beyaz bant süzgeç kağıdından süzildükten sonra çözücü vakum altında rotary evaporatörde 40 °C'de buharlaştırıldı ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.

4. Su özütlemesi: Metanol özütlemesinden arta kalan bitkisel materyale 500 mL kaynar su ile 15 dakika muamele edildi. Özütler beyaz bant süzgeç kağıdından süzöldükten sonra -18 °C'de donduruldu. Daha sonra -50 °C'de 5 mbar basınçta liyofilize (suyu uzaklaştırıldı) edildi ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.

n-heksan, etil asetat ve metanol özütleri tekrar metanol de çözöndüröldü ve beyaz bant süzgeç kağıdından süzölerek 2 mg/mL derişimde çözelti hazırlandı. Su özütü ise saf suda çözöndüröldü ve bu özütten de 2 mg/mL derişimde stok çözelti hazırlandı. Tüm testlerde hazırlanan bu çözeltiler kullanıldı.

### **3.6.3. Uçucu yağ analiz yöntemleri**

#### **3.6.3.1. Uçucu yağın ince tabaka kromatografisi ile analizi**

Preparatif amaçla kullanılacak kolon kromatografisi için önceden ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemiyle çözöcü sistemleri belirlendi. Ayrıca Kolon Kromatografisi ile ayırlamayacak kadar az olan maddelerin saflaştırılmasında İTK yöntemi kullanıldı.

#### **3.6.3.2. Uçucu yağın Kolon Kromatografisi ile analizi**

Preparatif amaçla kullanılmak üzere kolon kromatografisi ile ayırım yapıldı ve toplanan fraksiyonlar İTK yöntemleriyle kontrol edildi.

##### **Kolon SK Şartları**

Kolon boyutları : 40x2 cm

Adsorban : Silika jel

Çözöcü sistemi : n-Hekzan:Dietileter, DCM

Akış hızı : 2-2.5 mL/dk

Fraksiyon hacmi : 25 mL

Materyal : Hidrodestilasyon ile elde edilen uçucu yağ (1,75 g)

**Kolonun hazırlanması:** 200 g Silikajel, yeterli miktarda n-hekzan ile homojen karışım olacak şekilde karıştırıldı. Bir süre silikajel n-hekzan içerisinde bekletildi ve silikajel çözöcü yardımıyla kolona dolduruldu. 2 mL numune kolonun üzerinden çözöcünün içine homojen dağılacak biçimde bir pipet yardımıyla tatbik edildi. Fraksiyonlar 25'er mL olarak toplandı. Toplam 30

fraksiyon elde edildi. 14 ile 22 arasındaki fraksiyon tüpleri tekrar kolondan geçirilerek bileşenlerin iyice ayrılması sağlandı. TLC de kontrol edildi.

### **3.6.3.3. Uçucu yağın gaz kromatografisi (GC) ile analizi**

Uçucu yağ analizleri HP Agilent 7890A Gaz Kromatografisinde Agilent 5975C MS dedektörü ve HP Innowax (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kolonu kullanılarak yapıldı. Analizlerde taşıyıcı gaz olarak He kullanıldı ve akış hızı 1.2 mL/dk olarak ayarlandı. Kolonun başlangıç sıcaklığı 60 °C olarak belirlendi ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekletildi. Daha sonra dakikada 4 °C artırılarak 220 °C'ye ulaşıldı. Bu sıcaklıkta 10 dakika bekletildikten sonra dakikada 1 °C artırılarak 240 °C'ye ulaşıldı. Son olarak bu sıcaklıkta 30 dakika tutuldu. Böylece toplam analiz süresi 110 dakika olarak belirlendi. Enjektör bloğunun sıcaklığı 240 °C olarak ayarlandı. Uçucu yağ bileşenlerinin kantitatif belirlenmesi her bir bileşenin pik alanının toplam FID alanlarına oranıyla hesaplandı.

### **3.6.3.4. Uçucu yağın gaz kromatografisi (GC) / Kütle spektrometresi (MS) ile analizi**

Bitki uçucu yağlarının GC/MS analizleri yukarıdaki aynı sıcaklık programı ve 70 eV luk elektron iyonizasyon sistemi kullanılarak yapıldı. Bileşenlerin tek tek belirlenmesi orijinal örneklerin HP Innowax kapiler kolonda geliş zamanlarının kıyaslanması, orijinal örneklerden elde edilen kütle spektrumlarının karşılaştırılması [49] ve Wiley ve Nist kütüphane verileri kullanılarak belirlendi.

### **3.6.3.5. Antioksidan Aktivite Analiz Yöntemleri**

#### **3.6.3.5.1. Toplam Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi**

Örneklerin toplam antioksidan aktivitesi, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjugedienhidroperoksitlerin ve uçucu organik bileşiklerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β-karoten-linoleik asit sistemiyle belirlendi [50]. β-karoten çözeltisi, 0.5 mg β-karotenin 1 ml kloroformda çözülmesiyle hazırlandı. Bu çözeltiliye 25 µL linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform döner buharlaştırıcıda uçurulduktan sonra 100 ml hava geçirilmiş destile su ile karıştırıldı. Bu emülsiyonunun 2.5 mililitresi 2.0 mg/mL derişimdeki özütlerin 0.5 mililitresine ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 0.5 mL metanol/su konuldu. Emülsiyon test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japan) kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Tüpler 50 °C'de inkübasyona bırakıldı.

$\beta$ -karotenin rengi kayboluncaya kadar inkübasyona devam edildi (120 dakika).  $\beta$ -karoten renk açılım oranı (R), 1 eşitliğine göre hesaplandı:

$$R = \ln (a/b)/t \quad (1)$$

Burada;  $\ln$ = doğal logaritma,  $a$ = başlangıç absorbansı,  $b$ = 120 dakika inkübasyondan sonraki absorbansı ifade etmektedir.

Toplam antioksidan aktivite (TAA) ise 2 eşitliğine göre hesaplandı:

$$TAA = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (2)$$

### 3.6.3.5.2. Serbest radikal giderim aktivitesinin belirlenmesi

Örneklerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi [51]. İçerisinde 1 mL özüt çözeltisi (0.5 mg/mL) bulunan test tüplerine 1 mL metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi (final derişimi 0.2 mM) ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 1 mL metanol/su konuldu. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

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

Burada;  $A_{\text{kontrol}}$  kontrolün absorbansı ve  $A_{\text{örnek}}$  örneğin absorbansını ifade etmektedir.

### 3.6.3.5.3. İndirgenme gücü kapasitesinin belirlenmesi

İndirgeme gücü kapasitesi Oyaizu (1986) yöntemine göre yapıldı. Örneklerin 0.25 mL'si (2.0 mg/mL) test tüplerine ilave edildi. Her bir tüpe 0.5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH:6.6) ve 0.5 mL % 1'lik potasyumferrisiyanür ilave edilerek karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Sonra tepkime karışımına 0,5 mL%10'luk triklorasetik asit ilave edildi. Daha sonra üzerine 2 mL destile su ve % 0.1'lik 0.4 mL  $\text{FeCl}_3$  ilavesinden sonra 700 nm'de absorbans değerleri belirlendi. Kontrol olarak örnek yerine metanol ya da su kullanıldı.

### 3.6.3.5.4. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi

Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu Reaktif (FCR) kullanılarak gallik asit eşdeğer olarak belirlendi [52]. İçerisinde 0,2 mL özüt çözeltisi (2 mg/mL) bulunan test

tüplerine 1.5 mL destile su, 0.1 mL FCR ve 3 dakika sonra %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 0.5 mL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve ara sıra çalkalandı. Örneklerin absorbanları 760 nm'de okutuldu. Özütlerin toplam fenolik bileşik miktarları standart gallik asit grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi:

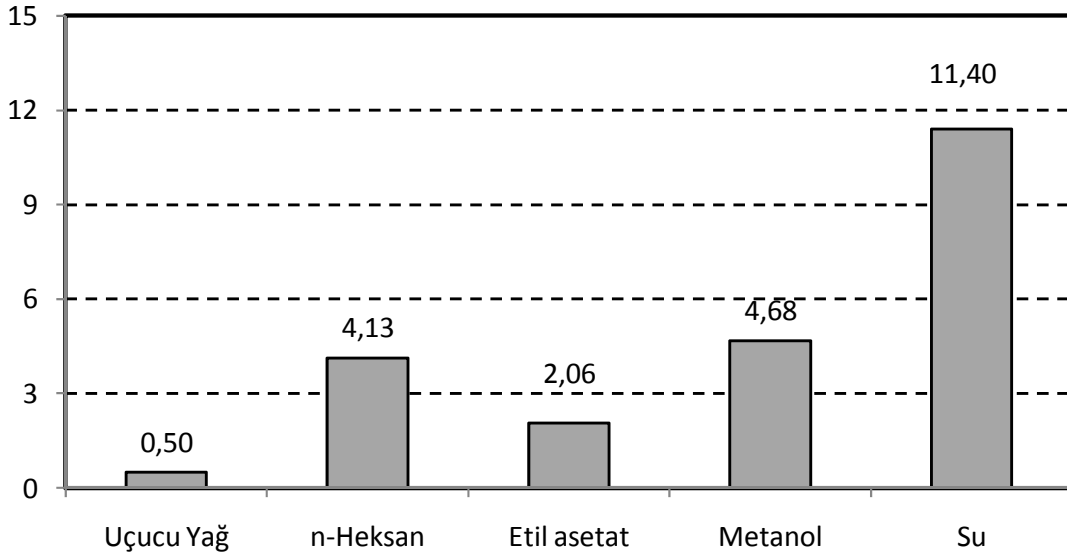
$$\text{Absorbans} = 0.026 [\mu\text{g gallik asit}] + 0.005 \quad (R^2: 0.9959)$$

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

##### 4.1 Özüt Verimleri ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Analizi

Bu tez çalışmasında *Mentha piperita* bitkisinin uçucu yağı clevenger aparatı kullanılarak hidrodestilasyon yöntemiyle elde edildi. Mentol bileşiğinin ayrıştırılması için kolon kromatografisi yöntemi kullanıldı. Çözücü özütleri ise ekstraksiyon yöntemiyle, sırasıyla n-hekzan, etil asetat, metanol ve su kullanılarak özütleme yapılarak hem uçucu yağı hem de çözücü özütlerinin in vitro olası antioksidan aktiviteleri araştırıldı.

*Mentha piperita* uçucu yağ ve çözücü özüt verimleri şekil 7'de görülmektedir. Bitkinin uçucu yağ verimi %0.5 olarak belirlenmiştir. Bu verimle bitki uçucu yağ verimi Kocabaş ve Karaman (2001)'in yaptığı çalışmadaki tanıma uyan orta zengin uçucu yağ verimine ait bitki sınıfına girmektedir[48]. Şekil 7'de de görüldüğü gibi takip eden özütleme sistemi kullanılarak yapılan özütleme sonunda en yüksek özüt verimi su özütüne (%11.4) aitken; en düşük özüt verimi etil asetat (%2.06) özütüne ait olduğu belirlenmiştir.



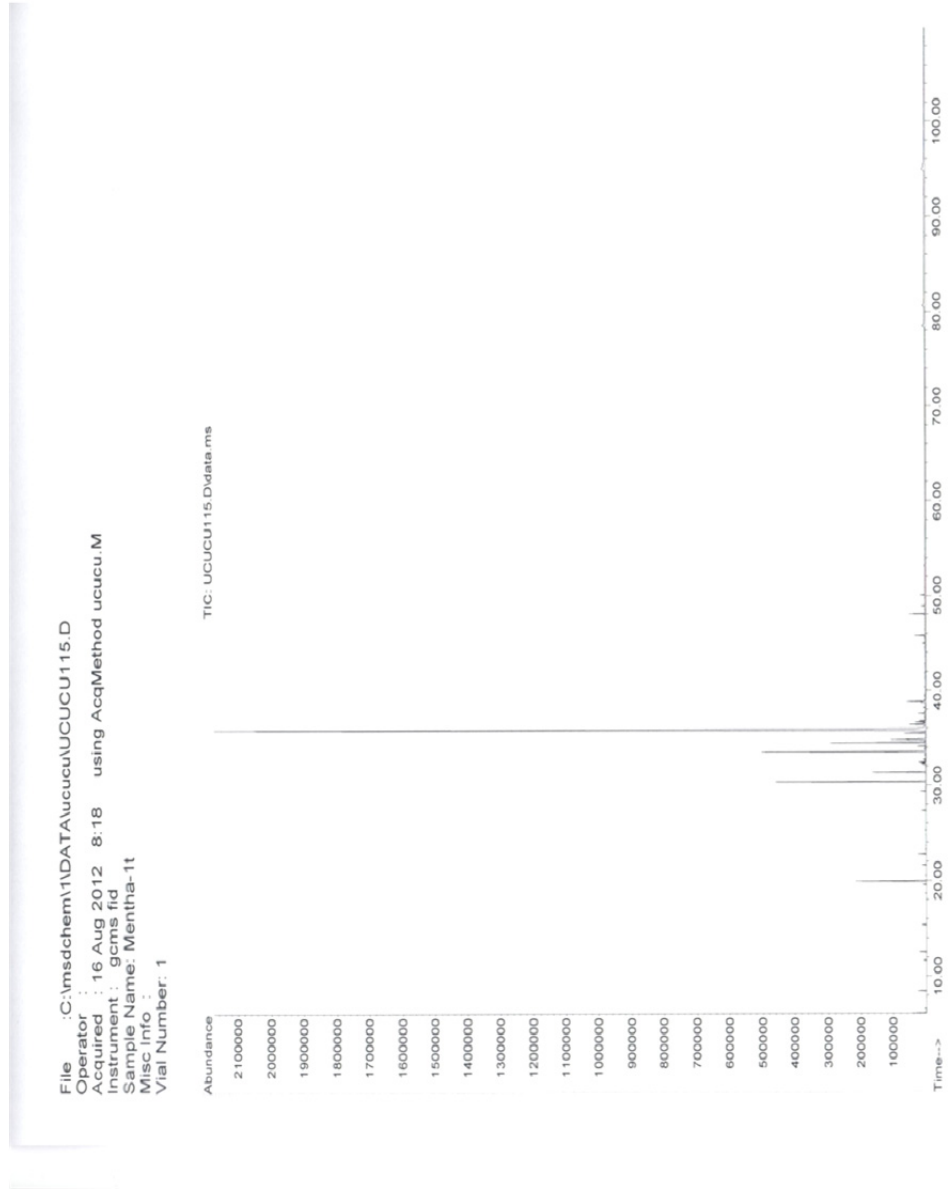
Şekil 7. *Mentha piperita* uçucu yağ ve çözücü özüt verimleri

Bu tez çalışmasında kullanılan *Mentha piperita* uçucu yağının GC/MS ile yapılan analizinde toplam 18 bileşen tespit edilmiş ve bu bileşenlerin toplam miktarı uçucu yağın %98.14 karşılık gelmektedir (çizelge 2). Bitki uçucu yağının total iyon kromatogramı şekil 8'de verilmiştir. Ayrıca bitki uçucu yağının IR spektrumu şekil 9'de verilmiştir. Uçucu yağda ana bileşenler olarak mentol (%74.54), isomentilasetat (%6.63), menton (%6.47) sineol (%2.97) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bazı literatür verileriyle paralellik arz etmektedir. Çünkü aynı bitkinin uçucu yağında ana bileşen olarak Gherman ve ark. (2000) %35 mentol [42] ve Marino ve ark. (2001) %40.55 mentol [43] tespit etmişlerdir. Ancak bazı araştırmacılar aynı bitkinin uçucu yağında ana bileşen olarak farklı bileşikler tespit etmişlerdir. Örneğin Sartoratto ve ark. (2004) linalolü (%51.0) [45] anabileşen olarak belirlerken; Yadegarinia ve ark. (2006) ise,  $\alpha$ -terpineni (%19.7) [46] ana bileşen olarak belirlemişlerdir. Bu farklılığın ana nedeni olarak bitkilerin yetiştirme koşullarının farklı coğrafyalarda gerçekleşmesine bağlanabilir.

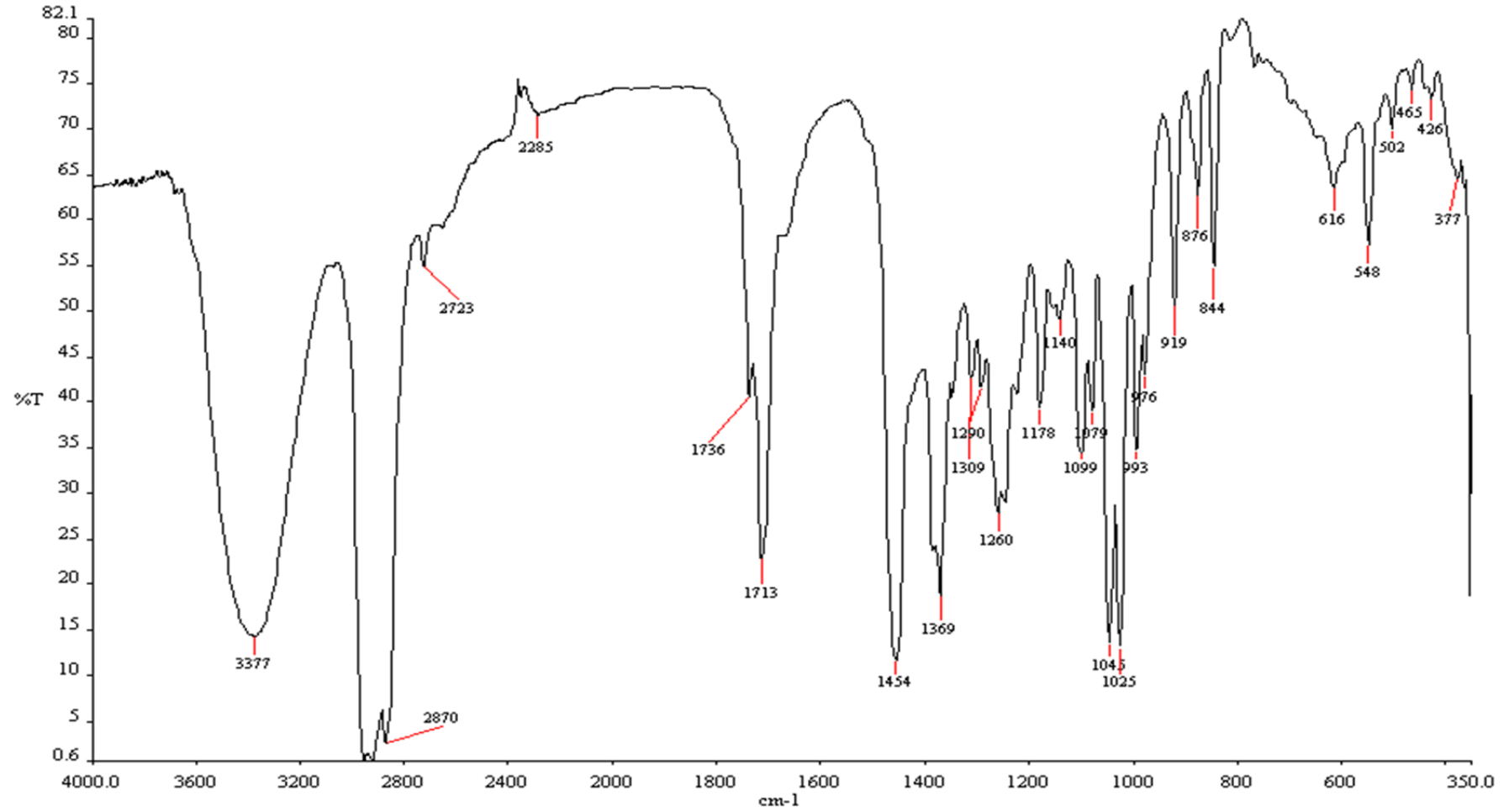
Ayrıca bitki uçucu yağında ana bileşen olarak tespit edilen mentolün ayrıştırılmasında kolon kromatografisi kullanılmıştır. 1.75 g uçucu yağdan 0.30 g mentol saf olarak izole edilmiştir. Bu da 1.75 g bitki uçucu yağında bulunan 1.30 g mentolün %23'ünün izole edilmesi anlamına gelmektedir.

**Çizelge 2.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağının kimyasal içeriği

No	RI	RT (dk)	Bileşen	%	No	RI	RT (dk)	Bileşen	%
1	1025	11.660	$\alpha$ -pinen	0.17	<b>10</b>	<b>1574</b>	<b>33.479</b>	<b>Isomentilasetat</b>	<b>6,63</b>
2	1113	15.367	$\beta$ -pinen	0.26	<b>11</b>	<b>1653</b>	<b>35.882</b>	<b>Mentol</b>	<b>74,54</b>
3	1203	19.524	Limonen	0.20	12	1668	36.354	Pulegon	0,75
4	1212	19.923	1,8-Sineol	2.97	13	1677	36.607	Isomentol	0,47
5	1251	21.620	$\gamma$ - terpinen	0.21	14	1708	37.512	$\alpha$ -Terpineol	0,37
6	1278	22.762	p-cymen	0.32	15	1753	38.778	Piperiton	0,68
7	1392	27.283	3-octanol	0.25	16	2019	45.783	Karyopfillenoksit	0,59
<b>8</b>	<b>1479</b>	<b>30.341</b>	<b>Menton</b>	<b>6.47</b>	17	2110	48.004	Viridiflorol	0,67
9	1507	31.314	isomenton	2.36	18	2199	50.055	Timol	0,25
								<b>Toplam</b>	<b>98.14</b>



Şekil 8. *Mentha piperita* bitkisinin total iyon kromatogramı

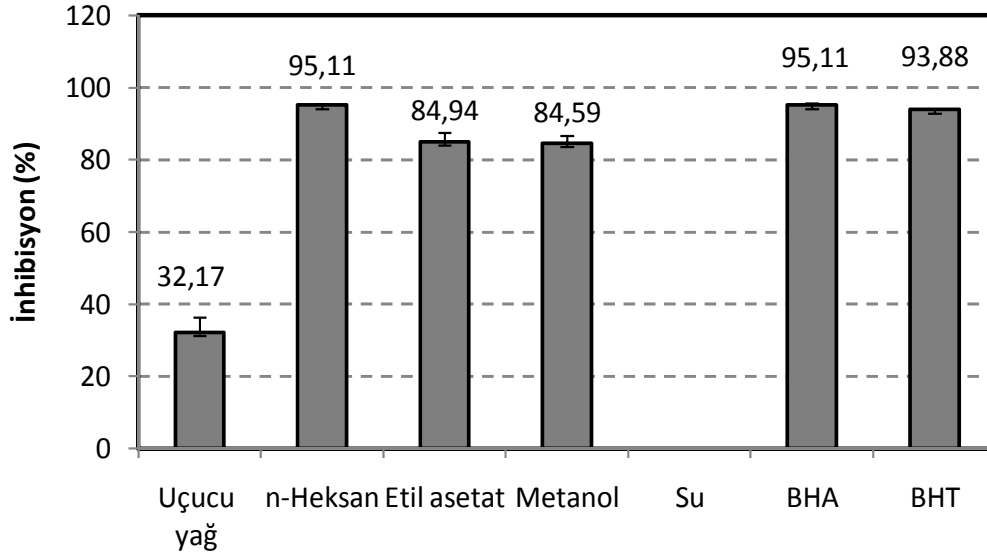


Şekil 9. *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağının IR spektrumu

#### 4.2 Antioksidan Aktivite Analiz Sonuçları

Bu tez çalışmasında antioksidan analiz testleri kapsamında  $\beta$ -karoten-linoleik asit model sistemle toplam antioksidan aktivite, DPPH serbest radikal giderim aktivite, indirgeme gücü kapasitesi ve toplam fenolik bileşik miktarı yöntemleri kullanılmıştır.

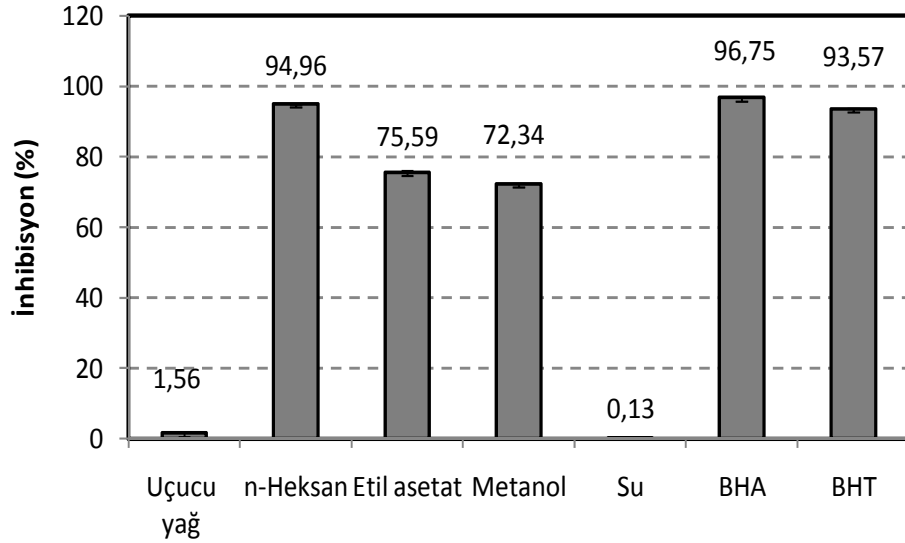
Bitki uçucu yağının ve çözücü özütlerinin toplam antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten-linoleik asit model sistemiyle belirlendi. Bu sistem, linoleik asidin inkübasyonu sırasında oluşan peroksit ürünlerinin  $\beta$ -karotenin karakteristik sarı rengini tepkime vererek gidermesi ve bu renk gideriminin spektroskopik olarak takip edilmesi temeline bağlıdır. Sistemde antioksidanların bulunması ya da sisteme antioksidan içerikli özütlerin ilave edilmesi, linolik asitten oluşan peroksit ürünlerinin bu antioksidanlarla nötralize edilmesini sağlar ve bunun sonucu olarak da  $\beta$ -karotenin karakteristik sarı rengi korunmuş olur. Dolayısıyla inkübasyon sonunda 490 nm'de ilgili türün daha yüksek absorbans değerine sahip olması daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği anlamına gelmektedir [57]. Şekil 10'da *Mentha piperita* bitkisinin uçucu yağ, çözücü özütleri ve standartların toplam antioksidan aktiviteleri görülmektedir. Özütler arasında n-heksan özütü 2 mg/mL derişimde oldukça güçlü aktiviteye ( $95.11 \pm 0.45$ ) sahipken; aynı derişimde su özütü hiç aktivite göstermemiştir. Etil asetat ve metanol özütleri ise benzer aktivite sergilemiştir. Özellikle n-heksan özütü ( $95.11 \pm 0.45$ ), standart antioksidan olan BHA ( $95.11 \pm 0.55$ ) ve BHT ( $93.88 \pm 0.26$ ) ile hemen hemen aynı aktiviteye sahiptir.



**Şekil 10.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağ, çözücü özütlerin ve standartların  $\beta$ -karoten-linoleik asit model sistemdeki toplam antioksidan aktiviteleri (Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır).

Serbest radikal giderim /süpürüm aktiviteleri oda sıcaklığında oldukça kararlı 1,1-difenil-2-pikril hidrazil(DPPH) serbest radikalının metanolik çözeltisi kullanılarak belirlendi. 517'nm de dalga boyu maksimuma sahip olan DPPH serbest radikali, kararlı diamagnetik bir molekül olabilmek için antioksidan moleküllerden bir elektron ya da hidrojen radikalini kolaylıkla alabilmektedir [53]. Bu nedenle antioksidanların DPPH radikal giderimi üzerine etkisinin, onların hidrojen verebilme yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

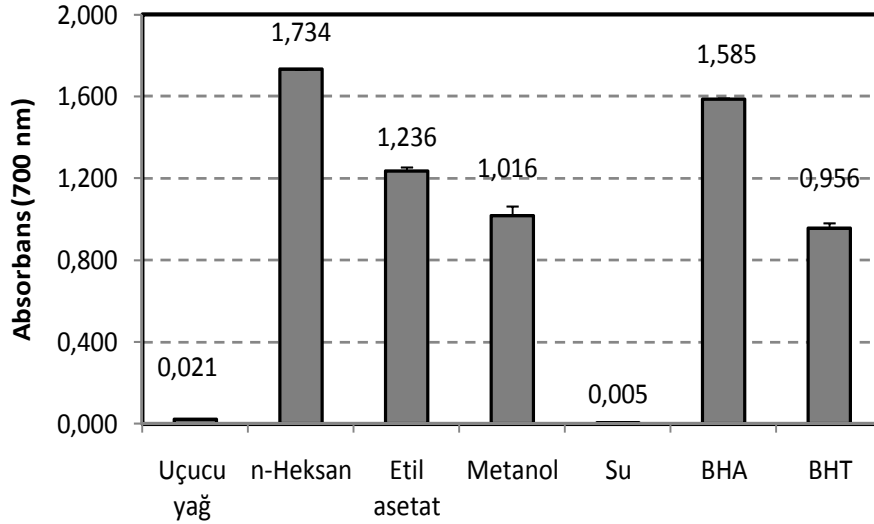
Şekil 11'de *Mentha piperita* bitkisinin uçucu yağ ve özütlerinin serbest radikal giderimleri görülmektedir. Şekilde de görüleceği gibi 0.5 mg/mL derişimde en yüksek serbest radikal giderim aktivitesi n-heksan (%94.96±0.01) özütüne aittir. Uçucu yağ (%1.56±0.13), etil asetat (%75.59±0.48), metanol (%72.34±0.08) ve su (%0.13±0.03) özütleri standart antioksidan olan BHA (%96.75±0.13) ve BHT (%93.57±0.11)'ninkinden oldukça düşüktür. Bu durumda n-heksan özütünün iyi bir DPPH serbest radikal giderici/söndürücü olduğu söylenebilir.



**Şekil 11.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağ, çözücü özütlerin ve standartların DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri (Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır).

İndirgeme gücünün belirlenmesinde, örnekler varlığına  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  dönüşümü araştırılmıştır. Çünkü bir bileşiğin indirgeme kapasitesi o bileşiğin potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir belirteci olabilmektedir [54]. Bu belirleme de test çözeltisinin başlangıçtaki sarı rengi her bir bileşiğin indirgeme gücüne bağlı olarak yeşil ve mavinin değişik tonlarına dönüşür. Ortamda indirgenlerin varlığı  $Fe^{3+}$ /ferrisiyanür kompleksindeki  $Fe^{3+}$  iyonunun  $Fe^{2+}$  iyonuna dönüşmesine neden olmaktadır. Bu da Perl's Prussian mavisi olarak bilinen  $Fe^{2+}$ /ferrisiyanür kompleksindeki  $Fe^{2+}$  iyonunu  $Fe^{3+}$ - $Fe^{2+}$  dönüşümünün 700 nm'de spektroskopik olarak belirlenmesini imkan sağlamaktadır.

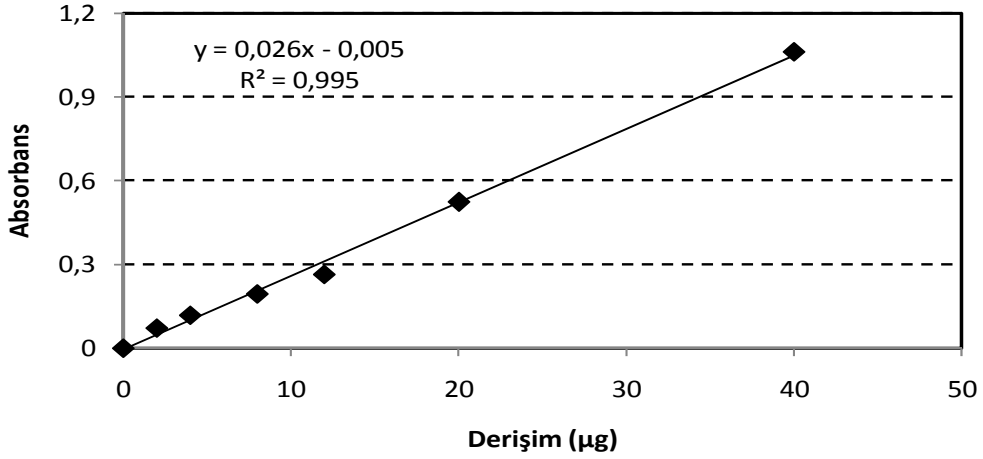
Şekil 12'de *Mentha piperita* bitkisinin uçucu yağ, çözücü özütleri ve standartların indirgenme gücü kapasiteleri görülmektedir. Şekilde de görüleceği gibi tıpkı serbest radikal giderim aktivitede olduğu gibi indirgenme gücü kapasitesinde de 2 mg/mL derişimde en yüksek indirgenme gücü kapasite n-hexsan özütüne ( $1.734 \pm 0.001$ ) aitken; en düşük indirgenme kapasitesi su özütüne ( $0.005 \pm 0.001$ ) aittir. Aynı derişimde standart antioksidan olan BHA ve BHT  $>4.000$  absorbands göstermiştir. Ancak 0.2 mg/mL derişimde standart antioksidanların indirgeme gücü aktiviteleri sırasıyla;  $1.585 \pm 0.007$  ve  $0.956 \pm 0.025$ 'dir. bu sonuçlardan n-hexsan özütünün iyi bir indirgeme gücü kapasitesine sahip olduğu söylenebilir.



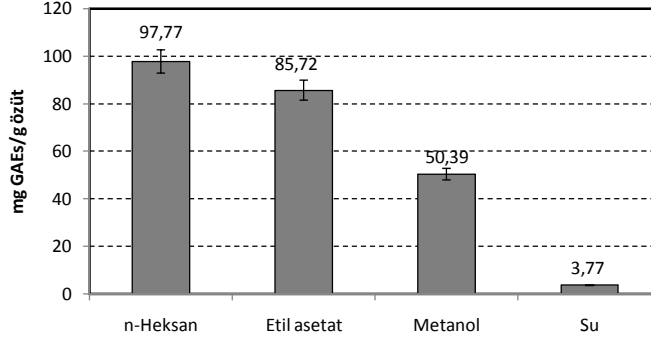
**Şekil 12.** *Mentha piperita* bitkisi uçucu yağ, çözücü özütlerin (2 mg/mL) ve standartların (0.2 mg/mL) indirgeme gücü kapasiteleri (Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır).

Toplam fenolik bileşik miktarı fenolik türü bileşikler hidroksil grupları bulundurdıklarından radikal yok etme yetenekleri nedeniyle çok önemli bileşenleridir [55]. Aynı zamanda fenolik bileşikler doğrudan doğruya antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilirler [56]. Polifenolik bileşikler, potansiyel bir antioksidan olduğu için antioksidan aktivite belirlemede, bu bileşiklerin miktarlarının bilinmesi oldukça önemlidir.

*Mentha piperita* bitkisinin çözücü özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları FCR reaktifi kullanılarak standart gallik asite ait şekil 12'deki grafikten elde edilen denkleme göre hesaplandı. Sonuçlar özütün gramı başına mg gallik asit olarak şekil 13'de verilmiştir. Şekil 14'te görüldüğü gibi, özütlerdeki fenolik bileşik miktarları mg gallik asit ekivalent/g özüt olarak n-hexsan ( $97.77 \pm 7.69$ )>etil asetat ( $85.72 \pm 1.34$ )>metanol ( $50.39 \pm 2.88$ )>su ( $3.77 \pm 0.07$ ) özüt sırasına göre değişim arz etmektedir.



**Şekil 13.** Standart gallik asit grafiği.



**Şekil 14.** *Mentha piperita* bitkisi çözücü özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları (Değerler üç paralel ölçümün ortalamasıdır).

Tüm antioksidan aktivite analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde özütler arasında özellikle n-heksan özütünün tüm testlerde en yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Aynı özütün fenolik bileşik içeriğine bakıldığında da benzer şekilde en yüksek fenolik bileşik içerdiği görülmektedir. Diğer özütlerde fenolik içerik miktarlarının azlığı yada çokluğuna paralel bir şekilde diğer testlerde aktivite göstermişlerdir. Buradanda özütlerin aktivitelerinin ana kaynağının içerdikleri fenolik bileşik miktarlarında doğrudan bağlı olduğu söylenebilir. Özellikle *Mentha piperita* bitkisinin n-heksan özütünün gerekli toksite testleri yapılmak kaydıyla gıda endüstrisinde oksidasyon önleyici olarak kullanılabileceğini söylemek doğru olacaktır.

**KAYNAKLAR**

- 1) Kaya, B., ÖZUĞUR, Z., DEMİR, E., KOCAOĞLU, S. ve ÇETİN, H., 2009. İki Origanum Türüne Ait Esansiyel Yağların *Drosophila Melanogaster*'de Genotoksik ve Antigenotoksik Etkilerinin Araştırılması. 7. Uluslar arası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi Kitapçığı Bildiri Özetleri Poster Sunusu-P012-S 74, 30 Mayıs - 01 Haziran, Ankara
- 2) Başer,H.C 1993.Uçucu yağların dünya ticareti.Tıbbi ve aromatik Bitkiler Bülteni,Anadolu Üniv.Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Araştırma merkezi,9:15-17
- 3) Ceylan,A.Yılmaz,G.Gürbüz,B.Bayram,E.. 1994.ilaç ve Aromatik Bitkilerin Tüketim Projeksiyonları ve Üretim Hedefleri. Türkiye Ziraat Mühendisliği 4. Teknik Kongresi,Ankara,571-576.
- 4) Türkiyenin Biyolojik Zenginlikleri,Türkiye Çevre Sorunları Vakfı (1987).Ankara
- 5) Ceylan A.,Tıbbi Bitkiler-II,E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları S=175,İzmir,1983
- 6) Baytop T. ,Türkiye de Bitkiler ile Tedavi,s:302-304,İstanbul,1994
- 7) Morton J.F.,Major Medicinal Plants,Charles C. Tomas Publisher,Illinois,USA,1997
- 8) Davis P.H., Flora of Turkey...,7,395 Edinburg University,Strosbourg,1996.
- 9) Baytop,A.,(1983).Farmasötik Botanik,4.İlaveli Baskı,Dilek Matbaası
- 10) Tanker,M.,Tanker,N.,(1976).Farmakognozi Cilt II,Reman Matbaası,İstanbul.
- 11) Evans,W.C.:(1989).Trease and Evans'Pharmacognosy,13th Ed,BailliereTindall,London
- 12) Tyler,V.E.,Brady,L.R.,Robbers,J.E.,(1981).Pharmacognosy,8thEd.,Leave Rebigier,Philadelphia
- 13) Ceylan,A.,(1997) Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri) Cilt II,Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayını,No:481, İzmir

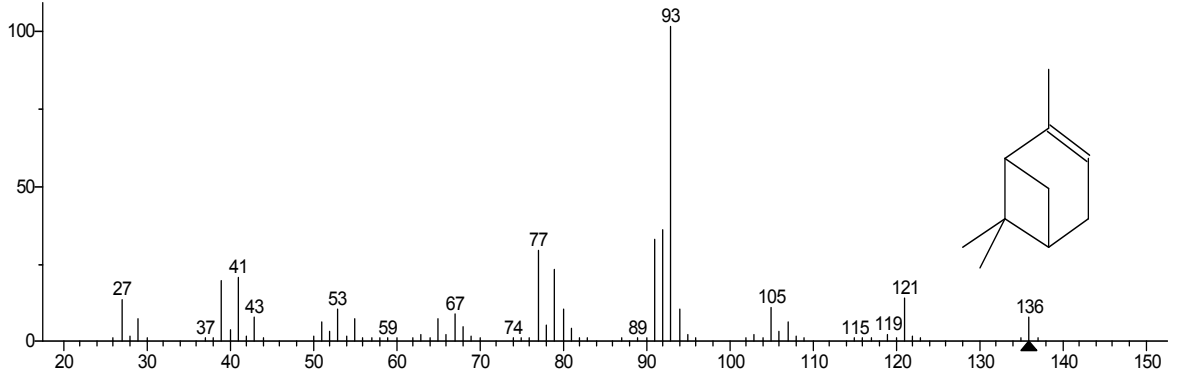
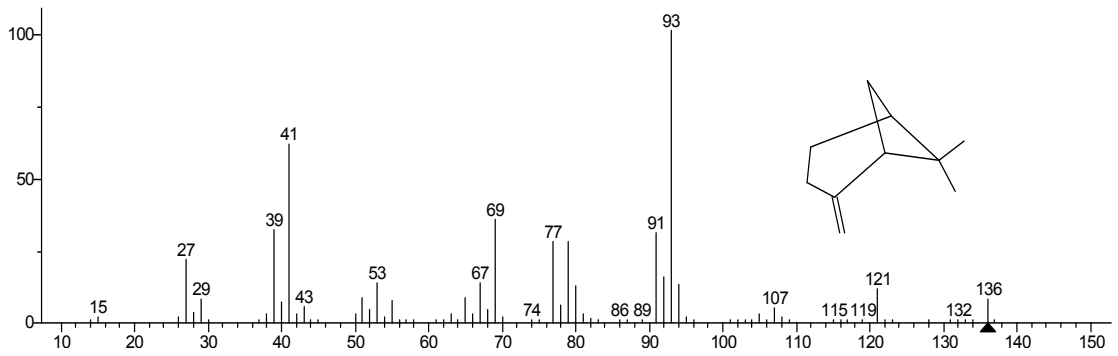
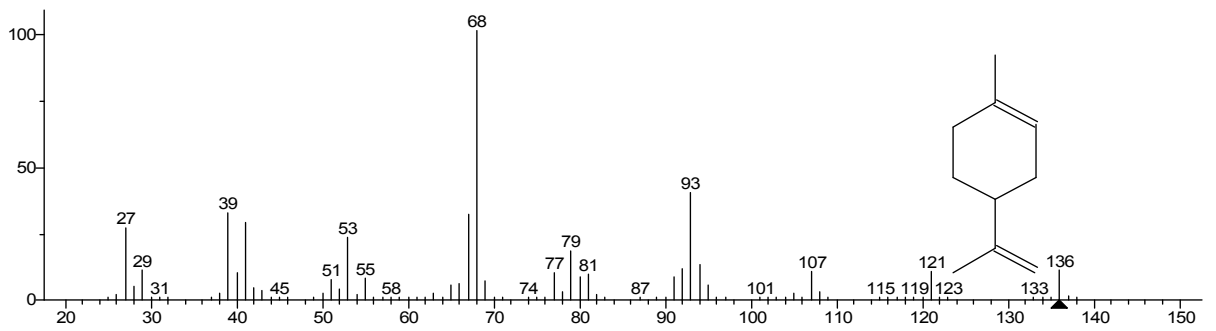
- 14) Duru,M.E. ve Harmandar,M.,(1993)Liquidambar asientalis Miller Uçucu Yağının Bileşimi,IX Kimya ve Kimya Mühendisliği Sempozyumu,S.93.K.T.Ü. Trabzon
- 15) T.Airata.,(1999)Pistaora Lenstiscus L.Yaprak ve Reanderden Elde Edilen Uçucu Yağların Kimyasal Bileşenlerinin Analizleri XIII.Ulusal Kimya Kongresi,S.327,P.0502 Ondokuz Mayıs Üniv.Samsun
- 16) Tanker,M.,Tanker,N.,(1990).Farmakognozi Ankara Üniv. Eczacılık Fak.Yay. No.65,Ankara,S.269-393
- 17) Guanter,E.,(1972),The Essential Oils,Vol.1,Robert E. Krieger Publishing Company,Florida
- 18) Tyler,V.E.,Brady,L.R.,Robbens,J.E.,(1981).Pharmacognosy,8th Ed. Les ve Febiger,Philadelpia P.160-200
- 19) Başaran,A.,(1984).Stachsys Lavandulifolia Vahl var.Lavandulifolia üzerinde Farmakognozik Araştırmalar,Hacettepe Üniv.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi
- 20) Denys,J.Charles.,James,E.Simon.,(1990)Comparison Of Extraction Methods for the Determination of Essential oil content and composition of Basil J.Amer.Soc.Host.Sci.115(3) P 458-62
- 21) Lawrance,1995. The isolation of aromatic materials from natural plant products. K.Tuley de Silva (de.).A manual on the essential oil İndustry, Eskişehir
- 22) Yalçındağ,1965. Eczacılıkta ekstraksiyon metotları ve bunlarla hazırlanan farmasötik preparatlar, Berksoy Matbaası, İstanbul.
- 23) Guanter,1948.The essential oils. Vol: I-IV,Robert E. Krieger Publishng Co. Inc., Malabar, Florida.
- 24) Thapa,1989. Extraction of essential oil, national workshop on chemical investigation and prpcessing of aromatic plants. Adhlkary, S,R, Amatya, K. R, Thapa, B. B.(eds). Nepal 71-81
- 25) Wigesekera,1992. Phenolic antioxidants, Critical Review of Food Science and Nutritional, 32,67-103.

- 26) El-Gammal,1991Extraction of volalite oils throughout history . Hamdard, 34, 57-80
- 27) Curtis ve Williams,1994. İntroduction to perfumery . Ellis Horwood, New York, 220-221
- 28) Acar et at,1996. Türkiye’de kızılçam ormanlarından akma reçine üretiminde asit pasta tahrik tekniğinin uygulanması üzerine araştırmalar. T.C. O.B.E .O .A.E.M Orman bakanlığı yayın no:25 teknik bülten no:5 İzmir.
- 29) Trasarti, A.F. , Marchi, A.J. and Apesteguía, C.R., ELSEVIER,2004,224,484-488
- 30) Etzold,B., Jess,A., Nobis,M.,ELSEVIER, 2009, 140, 30-36
- 31) Eccles,R.,Mentol ve ilgili sogutma bileşikler,’J.Ezc.Pharmacol’.,1994,46 (8) ,618-630
- 32) Galeottia,N.,Manellia,LCD,Manzantib,G.,Bartolinia,A.,Ghelardini,C., Mentol dogal bir analjezik bileşik ,’*Neuroscience Letters*,2002,322 (3), 145-148
- 33) Braina,KR,Greena,DM,Dykesb,PJ,Marksb,R.,Bola,TS,İnvivo %5 ibuprofen formulations topikal penetrasyondan cilt mentol rolü,Cilt Pharmacol Physiol,2006,19,17-21
- 34) Koyunođlu,Semra.. 2008, paeonia türleri içerisindeki monoterpen glikozitlerinin yapı tayinleri ve kromatografik analizleri için yöntem geliştirilmesi, doktora tezi, Hacettepe üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü.
- 35) Çelikel Nazan,2002,Uçucu yağların patojenler üzerine olan antimikrobiyal etkisi, doktora tezi. Ege üniversitesi süt teknolojisi anabilim dalı.
- 36) Akgül, A. 1993. Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yay.,Ankara.
- 37) Baytop, T. 1983. Farmakognozi 2. Đst.Üniv. Ecz. Fak. Yay. 35.
- 38) Baytop, T. 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmiste ve Bugün), 2. Baskı Nobel Kitapevi, İstanbul
- 39) Davis, P.H. 1982. Flora of Turkey and East Aegean Islands, Vol.7. Edinburgh University Pres, Edinburgh

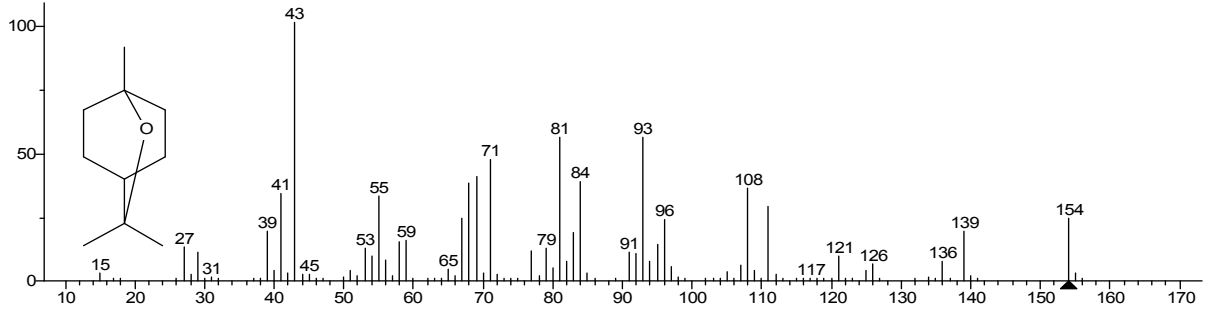
- 40) Baser, K. H. C. 1997. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Đlaç ve Alkollü Đçki Sanayilerinde Kullanımı. Anadolu Üniversitesi Tıbbi ve Aromatik Bitki ve Đlaç Araştırma Merkezi (TBAM), İstanbul Ticaret Odası, Yayın no:39, İstanbul.
- 41) Tassou, C., Koutsoumanisb, K. Nychas, G-J. E. 2000. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Research International. 33: 273-280
- 42) Gherman, C., Culea, M., Cozar, O. 2000. Comparative analysis of of some active principles of herb plants by GC/MS. 53: 253-262.
- 43) Marino, M., Bersani, C., Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. International Journal of Food Microbiology. 67 (3): 187-195.
- 44) Nori-Shargh, D., Norouzi-Arasi, H., Mohammadi, S., Mirza, M., Jaimand, K. 2000. Volatile Component of *Mentha longifolia* (L.) Huds. From Iran. Journal of Essential Oil Research. 12 (1): 111-112.
- 45) Sartoratto, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G. 2004. Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology (2004) 35:275-280.
- 46) Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., Rasooli, I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry. 67: 1249-1255.
- 47) Akgül A., "Baharat Bilimi ve Teknolojisi", **Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları**, Ankara, 41-47 (1993).
- 48) Kocabas Z. Y. and S. Karaman "Essential Oils of Lamiaceae Family from South East Mediterranean Region (Turkey)", **Pakistan J. Bio. Sci.**, 4 (10) : 1221-1223 (2001).
- 49) Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Componentes by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, USA

- 50) Dapkevicius A., Venskutonis, R., Van Beek, T.A., Linssen, P.H., 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 140-146
- 51) Hatano T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root : their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* ,36, 1090-2097
- 52) Singleton et al, Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu Reagent. *Met. Enzymol.*, 299, 152-178.
- 53) Soares J.R., Dinis, T.C.P., Cunha, A.P., & Almeida, L.M., 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad Res* ,26, 569-478
- 54) Meir S., Kanner, J., Akin, B., Hadas S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1813-1815
- 55) Hatano et al., 1989 T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, E., 1989. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 2016-2021
- 56) Duh P.D., Tu, Y.Y., & Yen, G.C., 1999. Antioxidant activity of water extract of *Huang Jiu* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* ,32, 269-277.
- 57) Sarıkürkçü, C. 2004. *Marrubium globosum* Montbret & Aucher ex Benth subsp. *globosum* Bitkisinin Uçucu Yağ Bileşenlerinin Karakterizasyonu Ve Bazı *Marrubium* Türlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi, s.111.

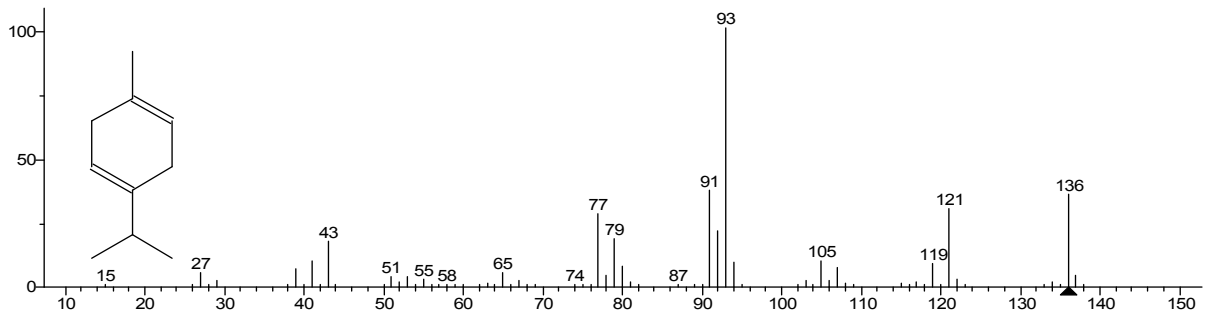
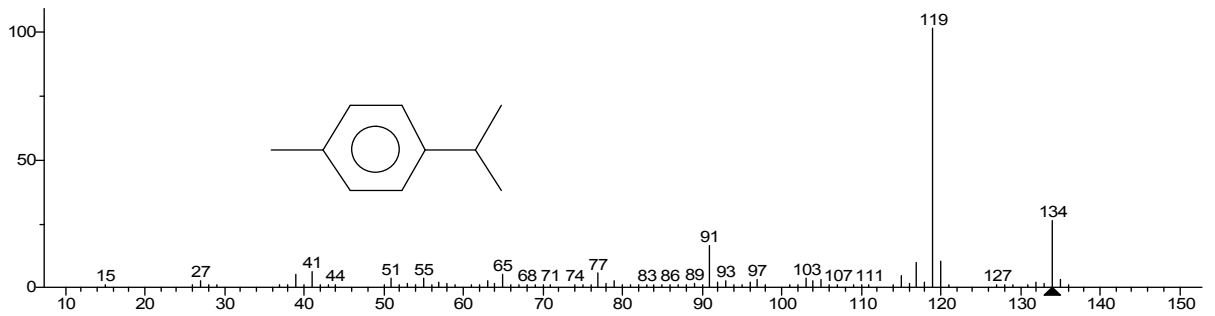
## EKLER

 $\alpha$ -pinen $\beta$ -pinen

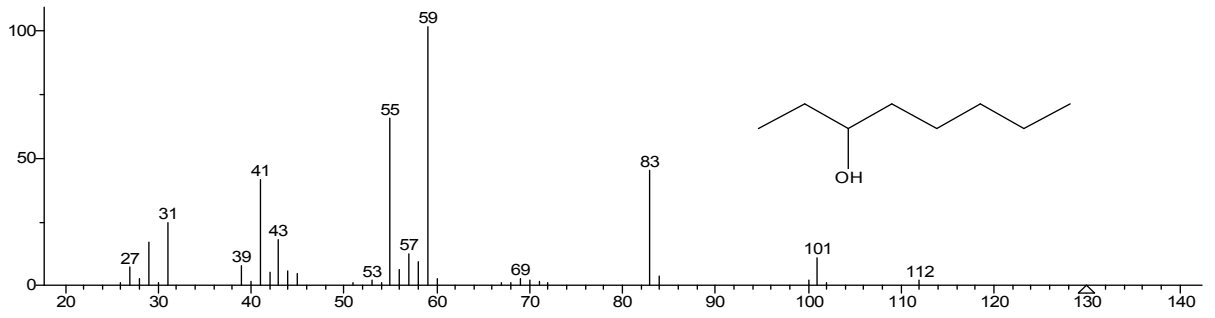
Limonen



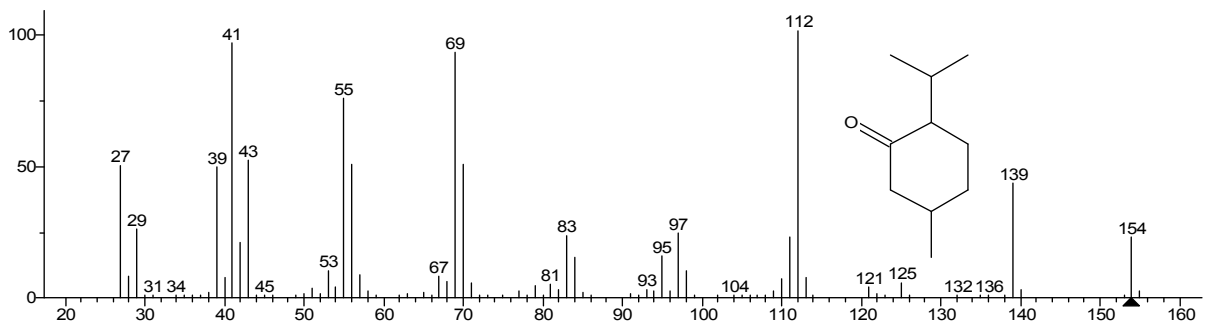
1,8-sineol

 $\gamma$ -terpinen

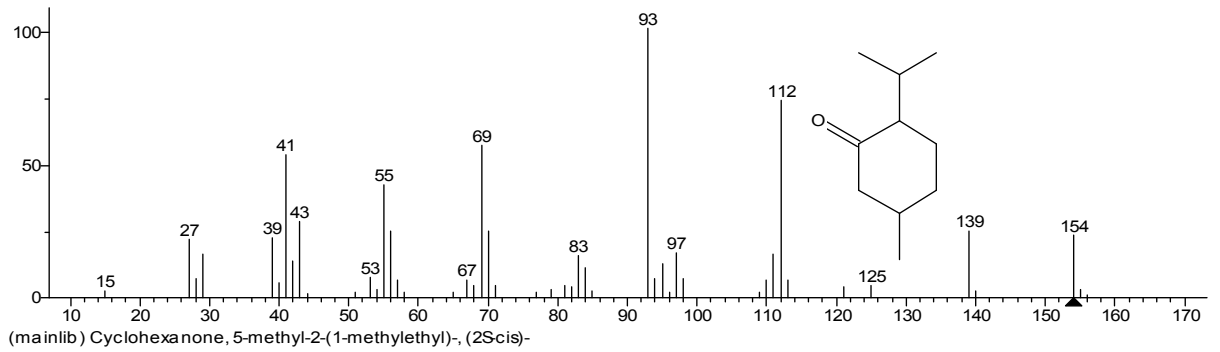
p-cymen



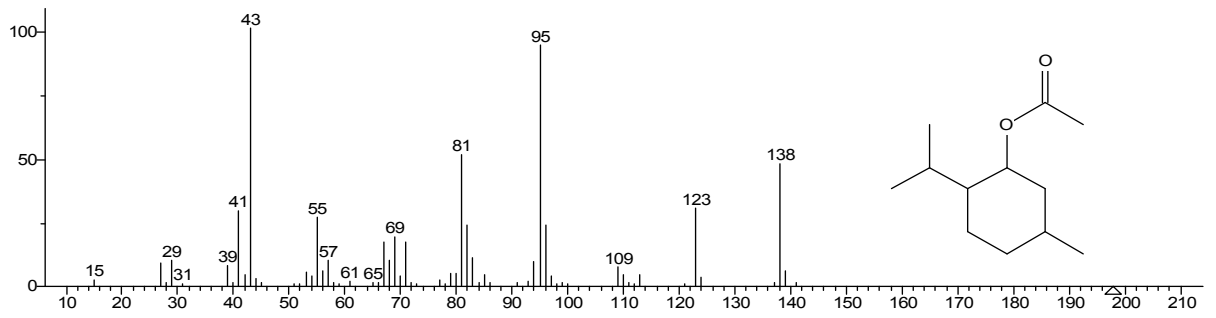
3-octanol



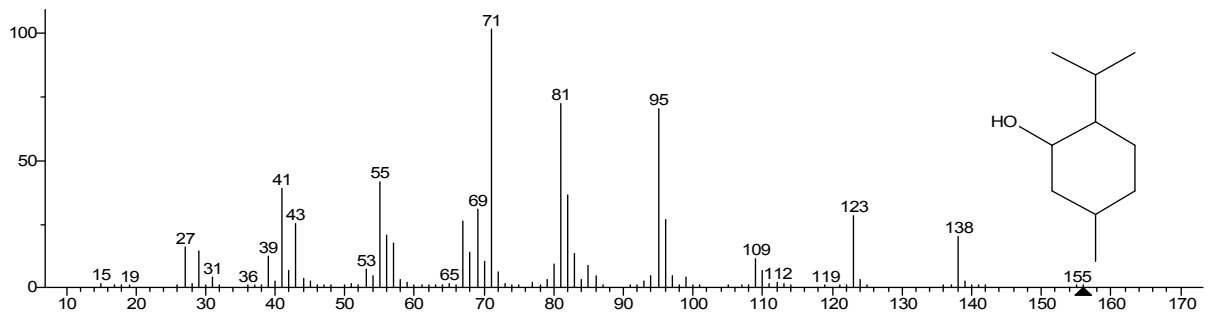
Menton



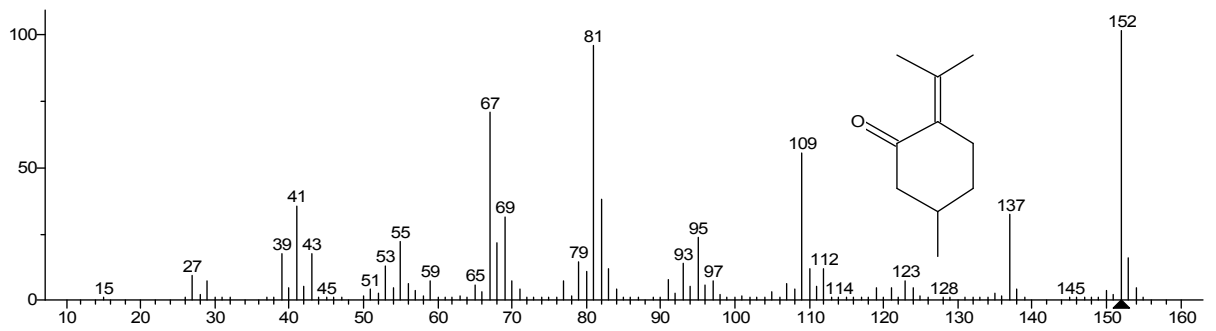
Isomenton



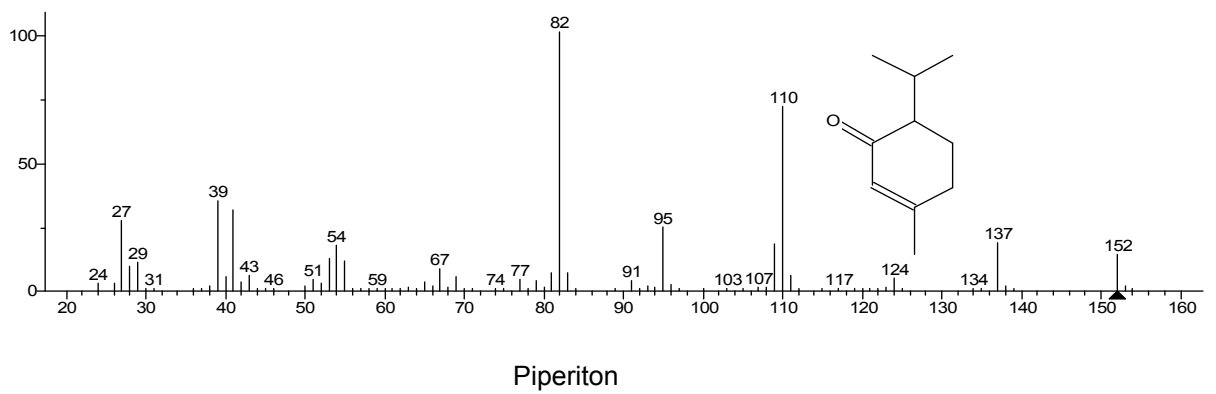
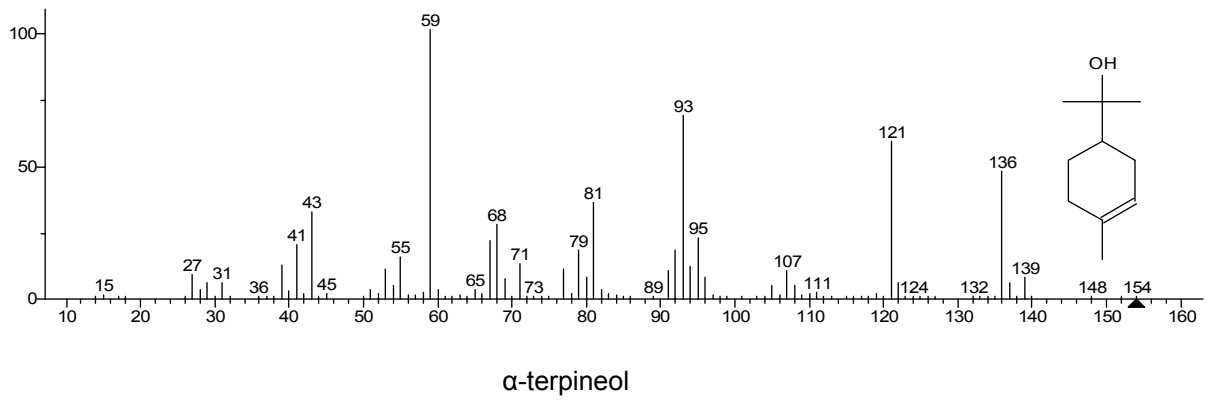
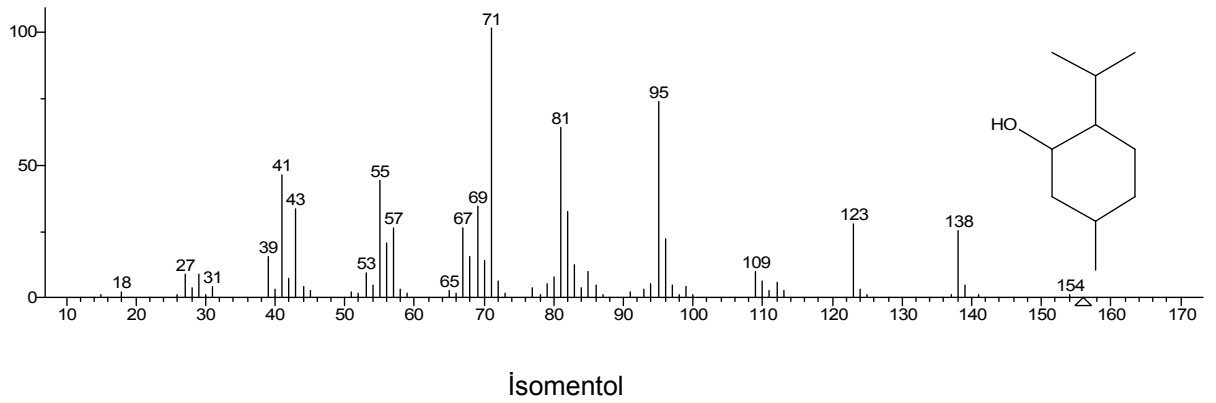
Isomentilasetat

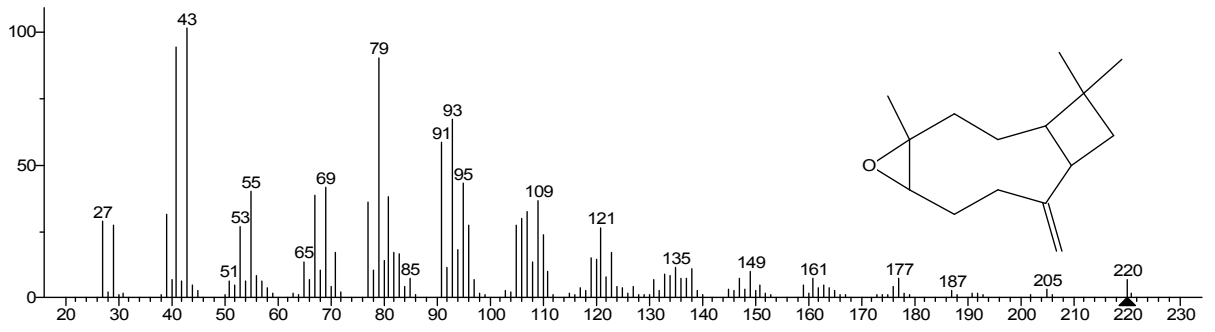


Mentol

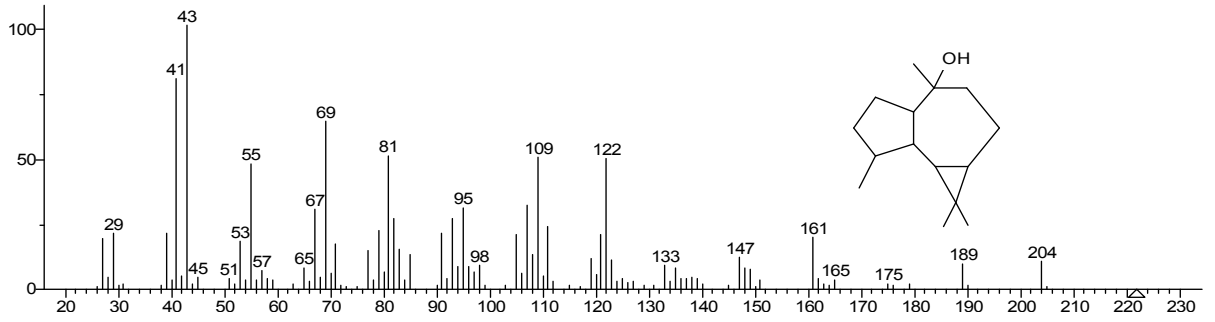


Pulegon

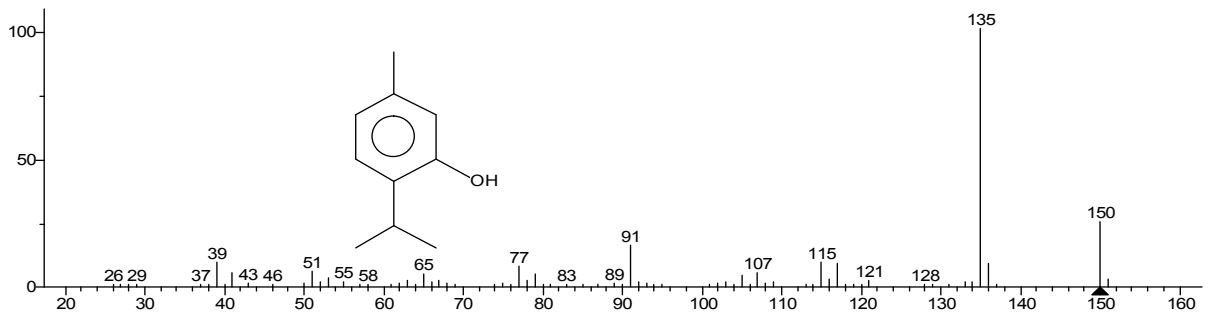




Karyofillenoksid



Viridiflorol



Thymol