ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

MENTHA SPICATA L. ALTTÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN YBSK-KS/KS YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Fatih Göger

Doktora Tezi

MENTHA SPICATA L. ALTTÜRLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN YBSK-KS/KS YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Fatih Göger

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Anabilim Dalı

Eskişehir, Ekim 2013

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Neş'e KIRIMER

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Jüri ve Enstitü Onayı

Fatih Göger'in *Mentha spicata* L. Alt Türlerinin Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Aktivitelerinin YBSK-KS / KS Yöntemi İle Belirlenmesi başlıklı, Farmakognozi Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 25.10.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	**İmza**
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Neş'e Kırımer Anadolu Üniversitesi	
Üye (İkinci Danışmanı)	Prof. Dr. Müberra Koşar Erciyes Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Betül Demirci Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Göksel Arlı Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Hasan Kırmızıbekmez Yeditepe Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04.12.2013 **tarih ve** 34/2 **sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI
Müdür

Capparis ovata buds and fruits, *Journal of Ethnopharmacology*, 142 (1), 48-52, 2012.

İşcan, G., Demirci, B., Demirci, F., Göger, F., Kırımer, N., Köse, Y., Başer, K.H.C., Antimicrobial and antioxidant activities of *Stachys lavandulifolia* subsp. *lavandulifolia* essential oil and its infusion, *Natural Product Communications*, 7(9), 1241-1244, 2012.

Özek G., Ishmuratova, M., Tabanca, N., Radwan, M.M., Göger, F., Özek, T., Wedge, D.E., Becnel J. J., Cutler, S.J., Başer, K.H.C., One-step multiple component isolation from the oil of *Crinitaria tatarica*(Less.) Sojak. by preparative capillary gas chromatography with characterization by spectroscopic and spectrometric techniques and evaluation of biological activity, *Journal of Separation Science*, 35, 650-660, 2012.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince büyük bir sabır ve anlayışla, desteğini benden hiç esirgemeyen, değerli bilgilerini bana aktaran, danışman hocam, Prof. Dr. Neş'e KIRIMER'e,

Antioksidan aktiviteler konusunda bildiğim her şeyi öğreten, yardımcı danışmanım Prof. Dr. Müberra KOŞAR'a.

Çalışmaların tamamını yaptığım, Farmakognozi Anabilim Dalı araştırma laboratuvarının bu denli donanımlı bir yer olmasında katkıları büyük olan Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER ve Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye

Çalışmalarım sırasında GC/MS analizlerimi gerçekleştiren Prof. Dr. Temel ÖZEK'e,

Bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren Prof. Dr. Betül DEMİRCİ'ye ve Prof. Dr. Göksel ARLI'ya

Her zaman desteğini hissettiğim sevgili eşim Gamze GÖGER'e, Annem'e, ve Babam'a teşekkür ederim.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ÖZET

Antioksidan etkili bileşikler genellikle canlı organizmalarda hücre bütünlüğünün korunması ve gıdalardaki bozulmaların önlenmesi için önemli olan ve yaygın kullanılan maddelerdir. Canlı organizmaların yaşam süresi ve kalitesi açısından hücre bütünlüğünün korunması önemlidir. Hücre bütünlüğünün korunması hücre membranlarının büyük bir kısmını oluşturan lipit dokusunun bozulmadan kalabilmesi ile mümkündür. Bu bütünlüğün antioksidan maddeler ile sağlanabildiği bilinmektedir. Günümüzde bu amaçla daha çok sentetik antioksidan maddeler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sentetik kimyasalların zararlı etkileri ile ilgili artan bilimsel bulgular nedeniyle, doğal maddelerin antioksidan etkileri ile ilgili araştırmalar artarak devam etmektedir.

Bu tez kapsamında Türkiye'de yetişen *Mentha spicata* L'nın iki alttürü, *Mentha spicata* L. ssp. *spicata* ve *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* (Briq.) Harley kullanılmış ve şimdiye kadar *Mentha spicata* alt türleri ile ilgili yapılmış en ayrıntılı fenolik bileşik analizi araştırması olmuştur. Toplam 80 maddenin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi/ Kütle Spektrometresi (YBSK-KS/KS) ile analizi yapılmış ve yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu fenolik maddelerden 18 tanesi ise *Mentha* cinsinde, 25 tanesi *Mentha spicata* türünde ilk defa tespit edilmiştir.

Mentha cinsi için yeni olan fenolik maddeler: sagerinik asit, ikarisit B5 glukopiranozit, apigenin asetilglukozit, luteolin asetilglukozit, salvianolik asit F, salvianolik asit C, salvianolik asit A, feruloilkinik asit, ponsirin, metil litospermat, dimetil litospermat, metil danşensu, 4-kafeoilkinik asit (kriptoklorojenik asit), 3-kafeoilkinik asit, 3-kumaroil kinik asit, 4-kumaroilkinik asit, kafeoil glukoz, dimetil rosmarinat olarak sıralanabilir

Diğer *Mentha* türlerinde rastlanmasına karşın daha önce *Mentha spicata* da rastlanmayan fenolik maddeler ise: salvianolik asit E, protokateşik asit heksozit, 12-hidroksi jasmonat sülfat ve metil rosmarinat, genkvanin, visenin-2, danşensu dimer'dir.

Ekstrelerin antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$) radikal süpürücü etkileri, β-karoten-linoleik asit oksidasyonunu ve linoleik asit peroksidasyonunun inhibe etmeleri, $ABTS^{\bullet}$ radikali süpürücü etkileri troloksa eşdeğer olarak (TEAK) incelenmiştir. $ABTS^{\bullet}$ radikali ile kolon sonrası her bileşik ayrı ayrı reaksiyona sokulmuş ve ekstre içindeki her molekülün antioksidan aktivite güçleri belirlenmiştir. Etkiden sorumlu olan her molekül YBSK-MS/MS yardımı ile tanımlanmıştır. Ayrıca ekstrelerin indirgeme kapasiteleri ile spektrofotometrik (toplam fenol, toplam flavonoit) ve kromatografik (YBSK, GK/KS, GK/FID, YBSK-KS/KS) olarak kompozisyonları da belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Lamiaceae, *Mentha spicata; Mentha spicata* ssp. *spicata; Mentha spicata* ssp. *tomentosa;* YBSK-KS, Fenolik bileşikler; Antioksidan aktivite

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ABSTRACT

In gerenal terms antioxidant compounds are important in contributing to the protection of living organizms for the cell integrity and thus widely used in foods to avoid spoilage and detoriation. For the lifespan and quality of living organizms maintaining the cell integrity is also vital. Maintaining the integrity of cell membranes is largely possible with the intact cell lipid layers. It is known that this integrity may be achieved by antioxidant substances. For this purpose generally synthetic antioxidants are used more frequently. However, the in the light of increasing scientific evidence on the potential harmful effects of synthetic chemicals versus natural substances continue to be the subject of increasing antioxidant research.

In this present work, *Mentha spicata* L. ssp. *spicata* and *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* (Briq.) Harley two subspecies of *Mentha spicata* L growing in Turkey, were investigated and analyzed in most detail for their phenolic composition, respectively. High Pressure Liquid Chromatography- Mass Spectroscopy/ Mass Spectroscopy (HPLC-MS/MS) was used in the detection and elucidation of 80 compounds. 18 of the phenolics were identified in *Mentha* species and 25 of them were identified in the *Mentha spicata* genus for the first time.

New phenolic compounds for the *Mentha* sp. are namely: salvianolic acid F, sagerinic acid, icariside B_5 glucopyranoside, apigenin acetylglucoside, luteolin acetylglucoside, salvianolic acid C, salvianolic acid A, feruloylquinic acid, poncirin, methyl lithospermate, dimethyl litospermate, methyl danshensu, 4-caffeoylquinic acid, 3-caffeoylquinic acid, 3-coumaroylquinic acid, 4-coumaroylquinic acid, caffeoyl glucose, and dimethyl rosmarinate, respectively. Other phenolic compounds reported in *Mentha* species but not in Mentha spicata are namely; salvianolic acid E, 12-hydroxyjasmonate sulphate, protocatechuic acid hexoside, methyl rosmarinate, genkwanin, vicenin-2 and the danshensu dimer, respectively.

Antioxidant activity of the extracts were determined using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ($DPPH^{\bullet}$) radical scavenging activity, β-carotene-linoleic acid co-oxidation assay and linoleic acid peroxidation assay. $ABTS^{\bullet}$ radical scavenging activity was calculated as trolox equivalent (TEAC). Post column derivatization with $ABTS^{\bullet}$ radical was also done for evaluation of all phenolics within the extracts. Active coumpounds were determined using LC-MS/MS. In addition, the reduction power and chemical composition of extracts were analysed by spectrophotometric (total phenol, total flavonoids, total flavonols) and chromatographic (HPLC, GC/MS, GC/FID, LC-MS/MS) techniques.

Keywords: Lamiaceae, *Mentha spicata; Mentha spicata* ssp. *spicata; Mentha spicata* ssp. *tomentosa;* HPLC-MS, Phenolic Compounds; Antioxidant activity

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	**i**
ÖNSÖZ	**iii**
ÖZET	**iv**
ABSTRACT	**v**
İÇİNDEKİLER	**vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ	**ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ	**xv**
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	**xvi**
GİRİŞ ve AMAÇ	**1**
KAYNAK BİLGİSİ	**2**
Botanik Özellikler	**2**
Lamiaceae (Labiatae) Familyası	**2**
Mentha cinsi	**2**
Mentha spicata L.	**3**
Mentha spicata alt *türlerine ait tayin anahtarı*	**3**
Farmakopelerde Kayıtlı Olan *Mentha* Monografları	**4**
***Mentha* Türlerinin Halk Arasındaki Kullanımı**	**4**
Ülkemizde Yetişen *Mentha* Türleri Üzerinde Yapılmış Araştırmalar	**5**
***Mentha* Türlerinde Bulunan Fenolik Asitler ve Polifenoller**	**7**
***Mentha* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri**	**8**
***Mentha spicata* ile yapılmış olan Biyolojik Aktivite Araştırmaları**	**8**
***Mentha spicata* ile yapılmış diğer çalışmalar**	**8**
Antioksidanlar	**13**
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	**13**
Reaktif Azot Türleri (RNS)	**15**
Antioksidan Maddeler	**16**
Antioksidan savunma mekanizması	**16**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Gıdalarda Kullanılan Antioksidanlar **19**
Kütle Spektrometresi ile Fenolik Bileşiklerin Analizi **20**
Fenolik asitlerin kütle spektrometresi ile analizi **21**
Flavanoitlerin parçalanmaları **23**
Flavanoitlerin parçalanma şekilleri **23**
GEREÇ ve YÖNTEMLER **27**
Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyal ve Kimyasal Maddeler **27**
Bitkisel materyal **27**
Kimyasal maddeler **27**
Kullanılan aletler **27**
Deneysel Çalışma **28**
Ekstrelerin hazırlanışı **28**
Bileşim analizleri **29**
Toplam fenol miktar tayini **29**
Toplam flavonoit miktar tayin **29**
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ile Fenolik Bileşiklerin Analizi **29**
Hekzan ekstrelerinin analizi **30**
Antioksidan Aktivite Çalışmaları **31**
İndirgeme gücünün belirlenmesi **31**
1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikalini süpürücü etki tayini **31**
ABTS radikal süpürücü etki **31**
YBSK Sonrası Türevlendirme ile ABTS· Radikali Süpürme Gücü **32**
Linoleik Asit peroksidasyonunu inhibe edici etki tayini **33**
β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini **34**
Tiyobarbitürik Asit (TBA) Metodu **34**
BULGULAR **35**
Ekstrelerin hazırlanışı, spektrofotometrik ve kromatografik bileşim analizleri **35**
YBSK-KS/KS Analizi Sonucu Elde Edilen Spektrum Değerlendirmeleri **46**
Hidroksisinnamik asit türevleri **46**
Kafeoilkinik asit türevleri **47**
Kumaroilkinik asit türevleri **48**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Kafeik asit ve diğer türevleri **50**

Salvianolik asit türevleri **54**

Flavonoit glikozitleri **65**

Flavanoit glukuronitleri **76**

Flavanoit asetilglukozitleri **80**

Rozmarinik asit türevleri **83**

Flavanoit aglikonlar **88**

Megastigman glikozitler **96**

Karbonhidratlar **98**

Hekzan ekstresinin kimyasal bileşiminin belirlenmesi **100**

Antioksidan Aktivite Bulguları **100**

Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi(TEAK) **100**

YBSK sonrası türevlendirme ile **$ABTS^{\bullet+}$** *Radikali Süpürücü etki İndirgeme gücünün belirlenmesi* **102 116**

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$) radikalini süpürücü etki tayini **117**

Linoleik asit peroksidasyonunu inhibe edici etki tayini **119**

Malondialdehit (MDA) değerinin ölçümü **121**

β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini **122**

SONUÇ ve TARTIŞMA **124**

KAYNAKLAR **131**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI		SAYFA
Şekil 1	*Mentha spicata* ssp. *spicata*'nın Türkiye üzerindeki dağılım haritası	**3**
Şekil 1	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa*'nın Türkiye üzerindeki dağılım haritası	**4**
Şekil 2	Oksijenin indirgenmesi	**14**
Şekil 3	Süperoksit anyon radikallerinin dismutasyon reaksiyonu	**14**
Şekil 2	Organik peroksitlerin demir (II) iyonlarıyla bozulması	**15**
Şekil6	Kafeoilkinik asit'in spektrumu ve parçalanması	**23**
Şekil 7	Aglikonlar için negatif kütle parçalanması	**24**
Şekil 8.	Glikon parçalanmalarını gösteren sınıflandırma	**24**
Şekil 9	Sık rastlanan flavonoitlere ait molekül formülleri	**26**
Şekil 10	YBSK sonrası türevlendirme şeması	**33**
Şekil 11	Toplam fenol miktar tayininde kullanılan gallik asite ait kalibrasyon grafiği	**35**
Şekil 12	%70Metanol ekstresinin diklorometan fraksiyonuna ait YBSK kromatogramı	**37**
Şekil 13.	Miktar tayininde kullanılan standartlaraait örnek kromatogram	**38**
Şekil 14	Hidroksisinnamik asitlerin isimlendirilmesi	**46**
Şekil 15	3-kafeoilkinik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**47**
Şekil 16	5-kafeoil kinik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**48**
Şekil 17	4-kafeoil kinik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**48**
Şekil 18	3-kumaroikinik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**49**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şekil 19.	4-kumaroilkinik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**49**
Şekil 20.	Feruloilkinik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**50**
Şekil 21.	Kafeik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**51**
Şekil 22.	Kafeoil glukoz'un kütle spektrumu ve parçalanması	**51**
Şekil 23.	Etil kafeat'ın kütle spektrumu ve parçalanması	**52**
Şekil 24.	Kafeik asit sülfat tuzu'nun kütle spektrumu ve parçalanması	**53**
Şekil 25.	Protokateşik asit heksozit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**53**
Şekil 26.	Danşensu dimeri'nin kütle spektrumu	**54**
Şekil 27.	Metil danşensu'nun kütle spektrumu ve parçalanması	**55**
Şekil 28.	Metil danşensu'nun kütle spektrumu ve parçalanması	**56**
Şekil 29.	Dimetil danşensu'nun kütle spektrumu ve parçalanması	**57**
Şekil 30.	Salvianolik asit E'nin kütle spektrumu ve parçalanması	**57**
Şekil 31	Monometil litospermat'ın kütle spektrumu	**58**
Şekil 32.	İzosalvianolik asit A'nın kütle spektrumu ve parçalanması	**59**
Şekil 33.	Salvianolik asit B'nin kütle spektrumu ve parçalanması	**60**
Şekil 34.	Monometil litospermat'ın izomeri'nin kütle spektrumu	**61**
Şekil 35.	Salvianolik asit C'nin kütle spektrumu ve parçalanması	**61**
Şekil 36.	Salvianolik asit A'nın kütle spektrumu ve parçalanması	**62**
Şekil 37.	Dimetil litospermat'ın kütle spektrumu	**63**
Şekil 38.	Salvianolik asit C türevi'nin kütle spektrumu	**64**
Şekil 39.	Dimetil litospermik asit B'nin kütle spektrumu	**64**
Şekil 40.	Salvianolik asit F'nin kütle spektrumu ve parçalanması	**65**
Şekil 41.	6,8-C-diheksozil apigenin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**66**
Şekil 42.	Eriodiktiyol glukozit'in kütle spektrumu	**67**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şekil 43.	Eriositrin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**68**
Şekil 44.	Naringenin rutinozit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**69**
Şekil 45.	m/z 593[M-H] ve m/z 285[M-H] moleküllerini gösterir seçilmiş iyon kromatogramı	**70**
Şekil 46	Luteolin neohesperosit'in kütle spektrumu	**71**
Şekil 47.	İzosakuranetin-7-rutinosit'in kütle spektrumu	**71**
Şekil 48	Sakuranetin ve izosakuranetin molekül formülleri	**71**
Şekil 49	Luteolin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**72**
Şekil 50.	İzosakuranetin'in kütle spektrumu	**72**
Şekil 51.	Luteolin glukozit'in kütle spektrumu	**73**
Şekil 52.	Hesperidin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**73**
Şekil 53.	Hesperetin glukozit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**74**
Şekil 54.	Apigenin rutinozit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**75**
Şekil 55.	Apigenin glukozit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**75**
Şekil 56.	Diosmin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**76**
Şekil 57.	*m/z* 461[M-H] molekül ağırlıklı moleküllerin seçilmiş iyon kromatografisi ile görüntülenmesi	**78**
Şekil 58.	48 numaralı maddeye ait *m/z* 461[M-H] kütle spektrumu	**78**
Şekil 59.	Luteolin glukuronit'in kütle spektrumu	**79**
Şekil 60.	Diosmetin glukuronit'in kütle spektrumu	**79**
Şekil 61.	Apigenin glukuronit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**80**
Şekil 62a	Luteolin asetilglukosit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**81**
Şekil 62b	İzosakuranetin asetilglukozit formülü	**82**
Şekil 63.	Apigenin asetil glukozit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**83**
Şekil 64	Sagerinik asit'in kütle spektrumu	**84**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şekil 65.	Rozmarinik asit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**85**
Şekil 66	Metil rosmarinat'ın kütle spektrumu ve parçalanması	**85**
Şekil 67.	*m/z* 567[M-H] molekül ağırlıklı moleküle kütle spektrumu (metil rosmarinat ve kinik asit esterleşmesi)	**86**
Şekil 68.	Rozmarinik asit sülfat tuzu'nun kütle spektrumu ve parçalanması	**87**
Şekil 69	Dimetil rosmarinat'ın kütle spektrumu	**88**
Şekil 70	Hesperetin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**88**
Şekil 71.	12-Hidroksijasmonat sülfat'ın kütle spektrumu ve parçalanması	**89**
Şekil 72.	Eriodiktiyol kütle spektrumu ve parçalanması	**90**
Şekil 73	Naringenin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**90**
Şekil 74	Genkvan'in kütle spektrumu ve parçalanması	**92**
Şekil 75.	Dihidroksi-dimetoksiflavon sülfat tuzu kütle spektrumu ve parçalanması	**93**
Şekil 76.	Sideritiflavon kütle spektrumu ve parçalanması	**94**
Şekil 77	Apigenin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**94**
Şekil 78.	Spikatosit B'nin kütle spektrumu	**95**
Şekil 79	Diosmetin'in kütle spektrumu ve parçalanması	**96**
Şekil 80.	İkarisit B_5'in kütle spektrumu ve parçalanması	**97**
Şekil 81.	ikarisit B_5 glukopiranosit'in kütle spektrumu ve parçalanması	**98**
Şekil 82.	Stakioz'un kütle spektrumu ve molekül formülü	**99**
Şekil 83.	*Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerine ait troloksa eşdeğer antioksidan aktivite grafiği	**101**
Şekil84.	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa* ekstrelerine ait troloksa eşdeğer antioksidan aktivite grafiği	**101**
Şekil 85.	Troloks kalibrasyon eğrisi	**102**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şekil 86.	*Mentha spicata* ssp. *spicata* Etil asetat ekstresine ait Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**103**
Şekil 87.	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa* Etil asetat ekstresi Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**104**
Şekil 88.	*Mentha spicata* ssp. *spicata* %70 metanol ekstresine Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**105**
Şekil 89.	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa* %70 metanol ekstresine Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**106**
Şekil 90.	*Mentha spicata* ssp. *spicata* %5 infüzyon ekstresine Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**107**
Şekil 91.	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa* %5 infüzyon ekstresine Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**108**
Şekil 92.	*Mentha spicata* ssp. *spicata* %70 metanol ekstresine fraksiyonlama sonrası sulu kısıma Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**109**
Şekil 93.	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa* %70 metanol ekstresine fraksiyonlama sonrası sulu kısıma Kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**110**
Şekil 94.	*Mentha spicata* ssp. *spicata* %5 infüzyon ekstresinin fraksiyonlama sonrası sulu kısmına kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**111**
Şekil 95.	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa* %5 infüzyon ekstresinin fraksiyonlama sonrası sulu kısmına kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**112**
Şekil 96.	*Mentha spicata* ssp. *spicata* asit hidrolizi ekstresine kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**113**
Şekil 97.	*Mentha spicata* ssp. *tomentosa* asit hidrolizi ekstresine kolon sonrası ABTS radikali ile türevlendirme kromatogramı	**114**
Şekil 98.	*Mentha spicata* ssp *spicata* YBSK sonrası ABTS radikali ile türevlendirme sonrası negatif pik alanları toplamı ve ABTS radikali süpürücü etki deneyi arasındaki korelasyon	**115**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şekil 99. *Mentha spicata* ssp *tomentosa* YBSK sonrası ABTS radikali ile türevlendirme sonrası negatif pik alanları toplamı ve ABTS radikali süpürücü etki deneyi arasındaki korelasyon **115**

Şekil 100. *Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü **116**

Şekil 101. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* ekstrelerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü **117**

Şekil 102. *Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerinin ve standartların $DPPH^{\bullet}$ radikalini süpürme kapasiteleri **118**

Şekil 103. *Mentha spicata* ssp *tomentosa* ekstrelerinin ve standartların $DPPH^{\bullet}$ radikalini süpürme kapasiteleri **118**

Şekil 104. *Mentha spicata* ssp *spicata* Linoleik asit oksidasyonunda *Mentha* ekstrelerinin ve standartların etkileri kapasiteleri **119**

Şekil 105. *Mentha spicata* ssp *tomentosa* Linoleik asit oksidasyonunda *Mentha* ekstrelerinin ve standartların etkileri kapasiteleri **120**

Şekil 106. *Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerinin ve standartların β-karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini **123**

Şekil 107. *Mentha* spicata ssp.*tomentosa* ekstrelerinin ve standartların β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini **123**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI		SAYFA
Çizelge 1.	*Mentha* Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri	**9**
Çizelge 2.	*Mentha spicata* ile ilgili yapılmış aktivite çalışmaları	**10**
Çizelge 3.	*Menta spicata* ile ilgili yapılmış diğer çalışmalar	**12**
Çizelge 4.	Reaktif oksijen türleri	**13**
Çizelge 5.	Reaktif azot türleri	**15**
Çizelge 6.	Doğada sık rastlanan fenolik asit yapıları	**22**
Çizelge 7.	*Mentha* türlerinden elde edilen ekstrelerin % verimleri	**35**
Çizelge 8.	*Mentha* ekstrelerinin toplam fenol ve flavonoit miktarları	**36**
Çizelge 9.	YBSK analizlerinde kullanılan standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları	**37**
Çizelge 10.	*Mentha* ekstrelerinin YBSK analiz sonuçları	**39**
Çizelge 11.	YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlaması yapılan bileşikler	**41**
Çizelge 12.	*Mentha* ekstrelerinin 10 saatlik hızlandırılmış oksidasyon sonundaki MDA oluşumunu inhibe etme yüzdeleri	**123**
Çizelge 13.	En yüksek antioksidan etki gösteren ekstrelerin standart ile karşılaştırılması	**130**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$ABTS^{\bullet+}$: 2,2-Azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit) radikali
APCI : Atmosferik Basınçta Kimyasal iyonlaşma
amu : Atomik kütle birimi
BHT : Bütillenmiş hidroksitoluen
DPPH• : 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
DSS : Danşensu
ESI :Elektrosprey iyonlaşma
GA : Gallik asit
eV : Elektron volt
YBSK : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IC50 : % 50 inhibisyon konsantrasyonu
KA :Kafeik asit
KS : Kütle Spektrometresi
LC : Sıvı Kromatografisi
m/z : Kütle/yük
M+ : Moleküler iyon
MeOH : Metanol
mg_{RE} : mg rutine eşdeğer
mg_{GAE} :mg gallik asite eşdeğer
mM : Milimolar
nm : Nanometre
Rt : Tutunma zamanı
S/N :sinyal / gürültü
TEAK : Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasite
TIC :Toplam iyon kromatogramı
TP :Temel Pik
UV : Ultraviyole
XIC :Seçilmiş iyon kromatogramı
YBSK : Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
µg : Mikrogram
µL : Mikrolitre
%AA : %Antioksidan Aktivite

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye bitki çeşitliliği bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden biridir. Son yapılan çalışmalarla birlikte Türkiye Florasında 12.476 takson kayıt altına alınmıştır (Deveci, 2012). Bunlardan yaklaşık 500 kadarı halk arasında tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Halk arasında tıbbi bitkiler en fazla çay formunda tüketilmektedir. Tıbbi çaylar arasında da önemli bir kısmı Lamiaceae (Labiatae) bitkileri oluşturmaktadır (Kendir ve ark., 2010).

Mentha cinsi dünyada 18 tür ve 11 hibrit olmak üzere 62 takson ile temsil edilirken ülkemizde 6'sı hibrit toplam 15 taksonu bulunmaktadır (Başer ve ark., 2012).

Mentha spicata (Bahçe Nanesi) halk tarafından en çok kullanılan ve en iyi bilinen baharatlar arasındadır. Nane yağında antiseptik özelliğine sahip mentol bulunmaktadır. Gıdalarda kullanılmasının yanında, halk arasında mide bulantısını kesici, gaz söktürücü ve koku verici olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1984). Tıbbi olarak, dahilen şişkinlik ve mide gazı gibi sindirim sistemi problemlerinde, safra kanalı ve gastrointestinal sistem kramplarında, irite kolon sendromunda, öksürük ve soğuk algınlığı tedavisinde, oral ve farenjiyal mukoza iltihabına karşı kullanılmaktadır. Haricen inhalasyon yoluyla soğuk algınlığına, kas kasılmaları ve kramplara, nevraljiye karşı kullanılmaktadır (Ersoy, 2009).

Son yıllarda sentetik antioksidanların insanlar üzerindeki zararlı etkilerinin ortaya çıkması nedeniyle bunların yerine kullanılabilecek doğal madde arayışı hızla sürmektedir. *Mentha* türleri de bu araştırmaların yoğun olarak sürdüğü türlerin başında gelmektedir. Farklı ülkelerde pek çok *Mentha* türü ile hem aktivite hem de kimyasal araştırmalar sürdürülmektedir (Oueslati ve ark., 2010; Candan ve ark., 2011, 2012).

Bu tez kapsamında ülkemizde doğal olarak yetişmekte olan *Mentha spicata*'nın iki alt türü, *Mentha spicata* L. ssp. *spicata* ve *M. spicata* L. ssp. *tomentosa* (Briq.) Harley'nın fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Antioksidan aktivite tayini için farklı polaritelerdeki çözücüler ile hazırlanan ekstrelerin *in vitro* 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$) radikal süpürücü etkileri, troloksa eşdeğer antioksidan aktivite güçleri, YBSK sonrası türevlendirme ile antioksidan aktivite güçlerinin belirlenmesi yanında, linoleik asit peroksidasyonunu engelleyici etkileri, β-karoten-linoleik asit peroksidasyonunu engelleyici etkileri ile indirgeme kapasiteleri belirlenmiştir. Aynı zamanda ekstrelerin antioksidan aktiviteden sorumlu olabilecek fenolik bileşikleri hem spektrofotometrik hem de kromatografik yöntemlerle incelenmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

KAYNAK BİLGİSİ

Bu bölümde *Mentha* cinsi ile ilgili botanik, kimyasal, etnofarmakognozik ve farmakolojik araştırmalar özetlenmektedir. Botanik bilgiler Türkiye Florası (Hedge, 1982) temel alınarak, diğer bölümler ise çeşitli veri tabanları ve internet erişimiyle ulaşılan kaynaklar derlenerek hazırlanmıştır.

Botanik Özellikler

Lamiaceae (Labiatae) familyası

Başlıca Akdeniz havzasında yayılış gösteren, uçucu yağ taşıyan, bir veya çok senelik otsu bitkiler veya çalılardır. Gövde 4 köşeli, yapraklar basit veya parçalı, dekusat dizilişlidir. Çiçekler yaprakların koltuğunda, sık kümeler halinde bulunur (Davis, 1982).

Tıpta ve parfümeride kullanılan birçok uçucu yağın kaynağı olması nedeniyle önemli bir familyadır. Lamiaceae familyası bitkileri halk arasında da oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitkiler daha çok çay ya da baharat olarak kullanılırlar. Bu familya bitkileri aynı zamanda ülkemizin önemli ihraç maddeleri arasında da yer almaktadır (Baytop, 1984; Sertkaya ve ark., 2010). Ülkemizde bu familyanın uçucu yağları ile ilgili olarak yoğun araştırmalar Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı tarafından yapılmaktadır. Bu familya bitkileri ayrıca son yıllarda antioksidan aktiviteye sahip bitkiler bakımından da araştırma odağı olmuştur (Başer ve ark., 1997, 1999, 2008; Koşar ve ark., 2004)

Mentha cinsi

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

***Mentha spicata* L.** Çok değişkenlik gösteren, keskin kokulu, kültür formları tüysüz, 30-110 cm boyunda, dik ve yarı yatık habituslu bitkilerdir. Yapraklar çoğunlukla tabanda daha geniş olup, ovat veya lanseolat, yaprak kenarları dişli, yüzeyi düz veya hafif dalgalıdır (Davis, 1982).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

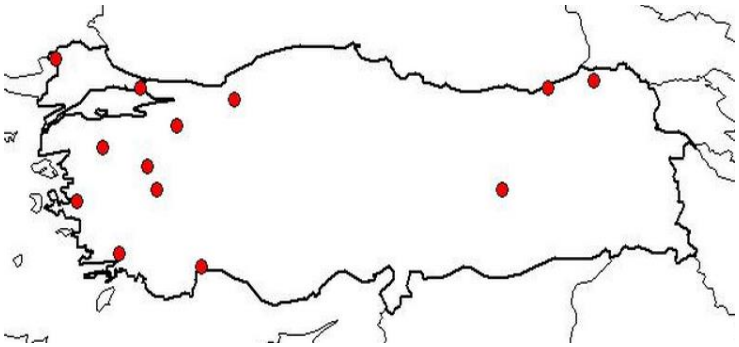


Mentha spicata L.

***Mentha spicata* alt türlerine ait tayin anahtarı** (Davis, 1982; Ersoy, 2009)

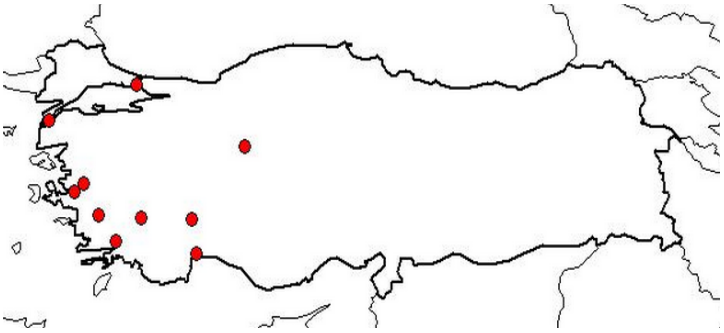
Gövde yaprakları tabanda geniş, alt tarafında yeşil ve tüysüzden kaba gri-yeşil, gri-villousa değişen şekillerde tüylü; tüyler sert kuruduğunda kıvrılmaz (keçe gibi görünmez), spika alt kısımda kesintili, az dallanmış…….. ……..... ***spicata***

1. Bitki tüysüz veya tüylü, gövde yaprakları 35-75 mm uzunluğunda ve genellikle genişliği 12 mm'nin üstünde, kenarları yassı ve alt tarafında başlıca basit tüylü; spika 40-80 (-110) mm, alt kısımda kesintili……... subsp. ***spicata***
2. Bitki daima tüylü, yaprakları 30-38 mm uzunluğunda ve genellikle genişliği 12 mm"nin altında, sıklıkla kenarları undulat ve alt tarafında çok sayıda dallanmış tüylü; spika (35-) 70-110 (-140) mm, özellikle meyvede genellikle fazla kesintili…….subsp. ***tomentosa***



Şekil 1. *Mentha spicata* ssp. *spicata* dağılım haritası (Bolu, İstanbul, Antalya, Artvin, Balıkesir, Bilecik, Edirne, Elazığ, İzmir Muğla, Rize, Tokat Uşak) (Babaç, 2004).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 2. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* dağılım haritası (İstanbul, Antalya, Aydın, Çanakkale, Denizli, Isparta, İzmir, Manisa, Muğla, Sakarya) (Babaç, 2004).

Farmakopelerde Kayıtlı olan *Mentha* Monografları

Avrupa Farmakopesinde *Mentha* ile ilgili 4 monograf bulunmaktadır: Menthae arvensis aetheroleum partim mentholum depletum (Nane yağı, mentolü kısmen alınmış), Menthae piperitae aetheroleum (nane esansı), Menthae piperitae folii extractum siccum (nane yaprağı ekstresi), Menthae piperitae folium (nane yaprağı) (EP 7.5, 2012).

İngiliz Farmakopesinde *Mentha* ile ilgili 4 monograf bulunmaktadır: Peppermint Leaf, Peppermint Oil, Spearmint Oil, Dementholised Mint Oil (BP, 2009).

Amerikan Farmakopesinde kayıtlı 4 monograf bulunmaktadır: Peppermint, Pepermint Oil, Peppermint Spirit, Peppermint Water (USP, 2008).

Alman Farmakopesinde ise Mentha piperitae aetheroleum kayıtlıdır (Deutsches Arzneibuch 1999).

Aetheroleum Menthae Piperitae, Folium Menthae Piperitae monograflarıda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) monografları arasında bulunmaktadır (WHO, 2002).

Mentha Türlerinin Halk Arasında Kullanımı

Mentha türleri Gaziantep yöresinde kalp rahatsızlıklarında çay olarak kullanılmaktadır. *M. aquatica* Malatya yöresinde ishale karşı, *M. piperita*'nın limon kabukları ile hazırlanan dekoksiyonu Eskişehir yöresinde soğuk algınlıklarına karşı, İstanbul'dan gelen bilgilerde yine *M. piperita*'nın mide üşütmelerine karşı kullanıldığı, nane yağının ise baş ve diş ağrılarını giderici olduğu bilgileri kayıtlıdır (Başer ve ark., 1986)

Mentha longifolia toprak üstü kısımları dekoksiyon halinde çay olarak tüketilirken taze bitki kurt düşürücü olarak kullanılmaktadır (Kozan ve ark., 2006).

M. longifolia ssp. *longifolia* yaprakları Zonguldak, Çaycuma'da antiseptik olarak açık yaraların üzerine konulmaktadır, aynı bitkinin dekoksiyonu Bartın, Akçaağaç'ta böbrek taşlarına karşı çay olarak kullanılmaktadır, aynı bitki Niğde, Elmalı'da hemoroide karşı dahilen tüketilir (Yeşilada ve ark., 1999; Sezik ve ark., 2001).

M. longifolia ssp. *typhoides* var. *typhoides* yapraklarından hazırlanan infüzyon karın ağrısına karşı çay olarak tüketilir (Kültür, 2007).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

M. spicata dekoksiyonu karminatif olarak, *M. longifolia* dekoksiyonu veya taze bitki dahilen kurt düşürücü olarak Mersin Gözne ve Erdemli bölgelerin de de kullanılmaktadır (Yeşilada ve ark., 1993).

M. longifolia dekosiyonu Van, Gevaş'da soğuk algınlığına karşı Van Güzelkonak'da taşikardiye ve nezleye karşı, Bitlis Sibek'de infüzyonu çay olarak, Van, Bahçesaray'da *M. spicata* dekoksiyonu romatizmaya karşı, *M. pulegium* dekoksiyonu ise safra kesesi rahatsızlıklarına karşı kullanılır (Tabata ve ark., 1994).

M. longifolia Isparta Sütçüler'de güneş çarpmasına karşı bitki ıslatılarak alına kompress yapılır. Konya Bozkır Soğucak'da ise çocuklarda yüksek ateşe karşı lapa yapılıp alına uygulanır (Yeşilada ve ark., 1995).

M. longifolia dekoksiyonu Bolu Çeltikdere'de boğaz ağrısına karşı; *Mentha* türleri Samsun Vezirköprü'de güneş çapmasına karşı kızılcık lapasıyla karıştırılarak kompres yapılır (Fujita ve ark., 1995).

M. longifolia ssp. *typhoides* Kütahya Emet'de karın ağrısında, baş ağrısında dekoksiyon olarak kullanıldığı gibi güneş çapmasında da kullanılır (Honda ve ark., 1996).

Mentha türlerinin başlıca etkileri analjezik, afrodizyak, anestezik, antibakteriyel, antiemetik, antiinflamatuar, antipuritik, antioksidan, ateş düşürücü, antiseptik, antispazmodik, öksürük kesici, antiülser, antiviral, apoptotik, sıkılaştırıcı, bronkodilatör, kardiyotonik, gaz giderici, kolagog, sedatif, tahrişe karşı dekonjestan, detoksikant, terletici, hazmettirici, idrar söktürücü, balgam söktürücü, böcek öldürücü, kas gevşetici, sekrolitik, yatıştırıcı, uyarıcı, mide, tonik, sakinleştirici, vazodilatatör ve yara iyi edici olarak kullanılır.

Aft, meme kanseri, akciğer kanseri, dalak kanseri, mide kanseri, soğuk algınlığı, kolik, öksürük, kramp, depresyon, diyare, hazımsızlık, bağırsak enfeksiyonları, ateşlenme, gaz sancısı, mide rahatsızlıkları, bel soğukluğu, kum dökme, bahar nezlesi, baş ağrısı, hemoroit, hepatozis, histeri, uykusuzluk, nefroz, sinir hastalıkları, taşikardi, romatizma, dalak rahatsızlıklarında, karın ağrısında, ve enflemasyon durumlarında kullanıldığını belirtilmiştir (Guedon ve ark., 1994; Olennikov ve ark., 2010; Deans, 2007).

Ülkemizde Yetişen *Mentha* Türleri Üzerinde Yapılmış Araştırmalar

Ülkemizde *Mentha* türleriyle ilgili olarak daha çok uçucu yağ bileşenleri incelenmiş, bu çalışmaların büyük çoğunluğu Anabilim Dalımız tarafından yapılmıştır (Başer ve ark., 1999; 2008). Bu çalışmaları etnofarmakognozik çalışmalar (Sezik ve ark., 2004; Avcı ve ark., 2006; Kozan ve ark., 2006; Kültür, 2007) ve antimikrobiyal etki çalışmaları takip etmiştir.

Mentha spicata alttürlerinde yapılan uçucu yağ araştırmasında, ssp. *spicata*'nın uçucu yağ verimi % 2,2 ve ana bilşikleri limonen (% 18) ve karvon (% 64), ssp. *tomentosa*'nın uçucu yağ verimi % 0,8 ve ana bileşikleri *trans*-piperiton oksit (% 58), piperitenon oksit (% 12), 1,8-sineol (% 7), *cis*-piperiton oksit (% 5) olarak bulunmuştur (Başer ve ark., 2012)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Bölümümüzde yapılan bir araştırmada 21 farklı bitki ve insan patojenine karşı *Mentha piperita* uçucu yağı denenmiş ve uçucu yağın bitki patojenlerine karşı kuvvetli etkili olduğu buna karşı insan patojenlere karşı orta düzeyde bir etki gösterdiği görülmüştür (İşcan ve ark., 2002). Aralarında *Mentha spicata*'nın da bulunduğu 17 değişik bitkiden elde edilen ekstrelerin kültür ortamında bakteri ve mayalar üzerindeki inhibitör etkisi test edilmiştir ve zayıf etkili olarak bulunmuştur. *Mentha* ekstresinin bakteri ve mayalar üzerine zayıf inhibitor etkisi bulunmuştur (Kıvanç ve ark., 1997).

M. spicata ssp. *spicata* uçucu yağı ile yapılan bir antimikrobiyal etki çalışmasında *Escherichia coli, Candida albicans, Candida tropicalis* e karşı yüksek oranda aktivite gösterirken *Staphylococcus aureus*'a karşı orta düzeyde aktivite gözlenmiştir (Şarer ve ark., 2011).

M. longifolia'dan elde edilen luteolin türevleri antigenotoksik potansiyelleri yönünden incelenmiştir Benzer bir çalışmada*M. pulegium* metanol ekstresinin lenfosit hücreleri üzerindeki antioksidatif ve antigenotoksik etkilerine bakılmıştır (Orhan ve ark., 2012).

Bir diğer farmakolojik çalışmada *M. piperita* ve *M. spicata* bitkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik özelliklerini araştırmak amacıyla sıçanların karaciğer dokuları kullanılmış. Bitki çayları'nın sıçanlara verilmesi ile lipit peroksidasyonunun oluştuğu ve karaciğerde hasara yol açtığı görülmüş, hasarın doza bağımlı olarak ortaya çıktığı bulunmuştur (Akdoğan ve ark., 2004a). Aynı çalışma grubu benzer çalışmaları böbrek hücreleri ile de denemişlerdir ve mentha spicata'nın nefrotoksik olduğunu belirtmişlerdir (Akdoğan ve ark., 2003). Bir başka çalışmaları ise nane çaylarının hormon seviyeleri üzerine etkisi olmuştur (Akdoğan ve ark., 2007). Aynı ekibin yaptığı bir diğer çalışma diyetlerinde *Mentha spicata* bulunan farelerin dokularındaki demir seviyeleri ölçülmüş ve doz ile doğru orantılı olarak demir absorblama gücünün arttığı rapor edilmiş ve demir eksikliği çeken hastalar ve çocuklarda dikkatli kullanılması gerktiği belirtilmiştir (Akdoğan ve ark., 2004b).

Mentha türlerinin kültüre alınmaları ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır (Telci, 2001; Kartal ve ark., 2008).

Endüstriyel amaçlı bir araştırma *M. piperita* nın kurutma koşullarını ve şartlarının iyileştirilmesi yönünde çeşitli parametrelerin gözlemlenmesi üzerine yapılmıştır (Arslan ve ark., 2010).

Mentha türleri ülkemizde bitkisel enzim izolasyonu amacıylada kullanılmış ve *M. piperita*'dan polifenoloksidaz enzimi izole edilmiştir (Kavrayan ve ark., 2001).

Antioksidan etki üzerine çalışmalar da çok sayıdadır. Bu çalışmalar neticesinde polar ekstrelerinde yüksek fenol miktarı ve yüksek antioksidan etki görülmüştür (Koşar ve ark., 2003; 2004; Ayar-Kayalı ve ark., 2009; Candan ve ark., 2011, 2012).

M. spicata ssp. *spicata* ve *M. spicata* ssp. *tomentosa* bitkilerininde aralarında bulunduğu 38 bitkinin % 50 metanol ekstrelerinin antioksidan aktivitesi üzerine yapılan çalışmada *Mentha* türlerinin önemli ölçüde etki gösterdiği bulunmuştur (Serteser ve ark., 2009).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Özgüven ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diyetlerinde *Mentha* bulunan farelerde lipit peroksidasyon ve malonildialdehit (MDA) seviyeleri ölçülmüş ve fare uterus hücrelerinde lipit peroksidasyonuna bağlı olarak ağır hasar bulgularına rastlanmıştır (Güney ve ark., 2006).

Bir diğer çalışmada *M. spicata* etanol ekstresinden S-karvon izole edilmiş ve S-karvonun güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu α tokoferolden daha fazla etkili olduğu bulunmuştur (Elmastaş ve ark., 2006). Aynı çalışma grubu'nun yaptığı bir başka çalışmada *M .spicata* etanol ekstresinin lipit peroksidasyonunu engellemede %97 oaranında başarılı olduğu rapor edilmiştir (Elmastaş ve ark., 2005).

Bir başka çalışmada *M. aquatica, M. arvensis* var. *japanensis*; *M. dalmatica, M. piperita, M. haplocalyx, M. moroccan, M. spicata* var. *crispa, M* x *verticillata* sulu ekstreleri YBSK ile kolon sonrası DPPH• radikali süpürücü etki işlemine tabi tutulmuş ve ekstreler antioksidan olarak etkili bulunmuştur. Toplam fenol miktarı ve DPPH$^{\bullet}$ radikali sürücü etki arasında doğru orantı bulunurken bu durum kromatografik olarak da ifade edilebilmiştir (Koşar ve ark., 2004).

M. longifolia ile yapılan bir çalışmada metanol ekstreleri DPPH• radikal süpürücü etki ve beta karoten linoleik asit peroksidasyonunu önleyici etki bakımından zayıf olarak bulunmuştur (Güllüce ve ark., 2007).

Bir diğer çalışmada antioksidan enzim aktivitesi ile ağır metaller arasındaki ilişki incelenmiştir. Çeşitli ağır metaller ile strese sokulmuş *Mentha* türleri üzerine de yapılan inceleme sonucu özellikle Mn^{+2} ve Cu^{+2} varlığında antioksidan enzim aktivitelerinini arttığı gözlemlenmiştir (Candan ve ark., 2003).

Sarıkürkçü ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada *M. pulegium* metanol ekstresini DPPH• radikali süpürücü etki bakımından incelemiş ve pozitif kontrol olarak kullandıkları BHT kadar etkili bulmuşlardır (Sarıkürkçü ve ark., 2012). Albayrak ve arkadaşları benzer etkileri *M. piperita* metanol ekstresinde gözlemlemişler ve DPPH• radikal süpürücü etki bakımında güçlü etkili olarak rapor etmişlerdir (Albayrak ve ark., 2013).

Mentha Türlerinde Bulunan Polifenoller, Fenolik Asitler ve Glikozitler

Bu araştırmada antioksidan etki ve bu etkiden sorumlu fenolik bileşiklerin belirlenmesi amaçlandığı için *Mentha* türlerinden tanımlanan fenolik maddeler derlenmiştir. En çok rastlanan bileşik rozmarinik asittir. Diğer bileşikler aşağıda gruplandırılarak verilmiştir.

Salvianolik asit türevleri: salvianolik asit J, litospermik asit, litospermik asit B, magnezyum litospermat B, sodyum litospermat B, danşensu (salvianik asit)**,** salvianolik asit E, protokateşik asit hekzozit, danşensu dimer, metil rozmarinat. **Metoksi flavonlar:** Bu gruptaki bileşiklerin kütle spektrumlarının değerlenmesinde metil gruplarının sayısı önemli olduğundan sıralama buna göre yapılmıştır. Tek metoksil taşıyanlar: sorbifolin**,** asesatin**,** genkvanin**,** dimetoksisudakitin**.** Dimetoksi flavonlar: timusin, ladanein**.** Trimetoksi flavonlar: nevadensin, mentokübanon, öpatorin, eriositrin, ksantomikrol, salvigenin,

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ksantomikrol, timonin, sideritoflavon. Tetrametoksi flavonlar: 5,6-dihidroksi-7,8,3',4'-tetrametoksiflavon, himenoksin, 5-hidroksi-3',4',6,7-tetrametoksiflavon, gardenin B, gardenin D, pebrellin. Pentametoksi flavon: demetilnobiletin.

Flavaonit glikozitler: luteolin-7-glikozit, eriodiktiol-7-glikozit, narirutin, diosmin, luteolin-7-*O*-glikozit, İsorhoifolin, roifolin, eriositrin, visenin-2, hesperidin ve luteolin-7-*O*- rutinosit. luteolin-7-*O*-rutinosit.

Flavonoit Aglikonlar, fenolik olmayan bileşikler ve diğerleri: kateşin, epikateşin, rutin, mirsetin, luteolin, apigenin, naringenin hesperetin, diosmetin, kafeik asit hidroksi benzoik asit, homovanilik asit, vanilik asit, ferulik asit, naringenin, hidroksi sinnamik asit 12 hidroksi jasmonat sülfat protokateşik aldehit, protokateşik asit, krizoeriol, nodifloretin spikatosit a ve b, spikatolignan a ve b, oksinobiletin, ikarisit b_5, karveol β-D-glikopiranosit, alilkateşol glikozit, 3,4-dihidroksilalilbenzen 4-O-β-D-glikozit (*Z*)-3-heksinil β-D-glikopiranosit, 3-metoksi-4-metilbenzaldehit, ve veratrik asit olarak sayılabilir. (Duband ve ark., 1992; Guedon ve ark., 1994; Maruyama ve ark., 1996; Zaidi ve ark., 1998, Yamamura ve ark., 1998, Sharaf ve ark., 1999; Zheng ve ark., 2002; Zheng ve ark., 2003; Fiamegos ve ark., 2004; Gómez ve ark., 2007; Chen ve ark., 2006, 2007; Zheng ve ark., 2007; Deans, 2007; Olennikov ve ark., 2010; Yannai, 2010; Bimakr ve ark., 2011; Li ve ark., 2013; Kapp ve ark., 2013).

Mentha Türlerinin Uçucu Yağ Bileşimleri

Lamiaceae familyasına dahil cinslerin pek çoğunda olduğu gibi *Mentha* cinsinde de uçucu yağ miktarları ve kompozisyonları önemlidir. Bu nedenle *Mentha* türleri uçucu yağları ile ilgili pek çok kaynak bulunmaktadır (Başer ve ark., 2012; Lawrence, 2010). Burada sadece *Mentha spicata* alttürleri ile yapılmış olan uçucu yağ çalışmaları özetlenmiştir (Çizelge 1).

Mentha spicata ile yapılmış olan Biyolojik Aktivite Araştırmaları

Mentha spicata ile yapılan alttür belirtilmeyen biyolojikaktivite araştırmaları Çizelge 2. de özetlenmiştir.

Mentha spicata ile yapılmış diğer çalışmalar

Mentha spicata ile yapılmış kültür ve doku kültürü çalışmaları, kurutma koşulları, ucucu yağ veriminin arttırılması araştırmaları, enzim çalışmaları ve veteriner hekimlik açısından değerlendirilmesi gibi konuları içeren çalışmalar Çizelge 3. te özetlenmiştir

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 1. *Menta spicata* ile ilgili yapılmış uçucu yağ çalışmaları

Ana maddesi	Kaynak
1,8 sineol, *trans*-piperiton oksit	Cook ve ark., 2007
karvon	Stella ve ark., 1995
trans-piperiton oksit, piperiton oksit	S. Kokkini ve ark., 1997
kemotip 1: karvon, dihidrokarvon. kemotip 2: piperitenon oksit piperiton oksit	Karousou ve ark., 1998
karvon, limonen	Kim ve ark., 1999
pulegon, menton, izomenton	Fuchs ve ark., 2001
karvon, limonen	Pino ve ark., 2001
karvon, limonen, 1,8-sineol	Diaz-Maroto ve ark., 2003
linalol	Kofidis ve ark., 2004
karvon, pulegon, linalol	Telci ve ark., 2004
karvon, limonen	Younis ve ark., 2004
kemotip1: terpinen 4-asetsat, kemotip 2:karvon oksit; kemotip 3:piperiton ve mentol, kemotip 4: karvakrol, kemotip 5: izomenton ve piperiton oksit kemotip 6: *p*-simen, *trans*-karil asetat	Zeinali ve ark., 2005
limonen, piperiton	Rasoolia ve ark., 2008
karvon	Vian ve ark., 2008
karvon	El Hassani ve ark., 2009
karvon, limonen	Matraka ve ark., 2010
piperiton, pulegon	Telci ve ark., 2010
karvon, limonen	Vimolmangkang ve ark., 2010
cis-piperiton oksit, piperitenon oksit	Kofidis ve ark., 2011
karvon, 1,8-sineol (*M.spicata* ssp. *spicata)*	Şarer ve ark., 2011
karvon	Sitthithaworn ve ark., 2011
karvon, *trans*-karveol	Znini ve ark., 2011
karvon, piperiton oksit	Baser ve ark., 2012
karvon , *cis*-karveol, limonen	Govindarajan ve ark., 2012
2,5-dimetil-3-metoksipirazin karyofillen	Silva ve ark., 2013
karvon	Egawa ve ark., 2003
limonen, karvon	Aggarwal ve ark., 2002
karvon, *cis*-karveol	Hussain, A. ve ark., 2010
karvon biyosentezi	Maffei ve ark., 2001
limonen biyosentezi	Karp ve ark., 1990
limonen biyosentezi	Wust ve ark., 2001
trans-karveol ve *trans*-izopiperitenol biyosentez çalışması	Bertea ve ark., 2003
karvon, limonen	Delfine ve ark., 2005
Uçucu yağ verimi ve karvon limonen oranları ana bitkiden daha yüksek olarak bulunmuştur.	Hirata ve ark., 1990
Otoklavlanan fungal artıkların uçucu yağda karvon miktarı üzerine etkisi araştırılmış, Karvon miktarının arttığı gözlenmiştir.	Khan ve ark., 2005
karvon, limonen (*M.spicata* ssp. *insularis*)	Marongiu ve ark., 2001

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 2. *Mentha spicata* ile ilgili yapılmış aktivite çalışmaları

Ativite çalışması	Kısaca sonucu	Kaynak
Antimikrobiyal	Uçucu yağı pek çok insan patojenine karşı etkili bulunmuştur karvon ve limonen ana madde olarak tespit edilmiştir.	Aggarwal ve ark., 2002
Antioksidan Antimikrobiyal	Uçucu yağı antimikrobiyal aktivite göstermiştir Metanol ekstresi yüksek fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite göstermiştir.	Scherer ve ark., 2013
Antioksidan, Antimikrobiyal	Uçucu yağı DPPH$^{\bullet}$ radikal süpürücü etki ve β-karoten testlerinde etkili görülmüş fakat *Mentha piperita* daha etkili görülmüş ve gıda endüstrisi için kullanımı tasviye edilmiştir.	Rasoolia ve ark., 2008
Antioksidan	Uçucu yağ karvon ve *trans*-piperiton oksit ana bileşik olarak bulunmuştur ve yüksek oranda antioksidan aktivite gözlenmiştir.	Chauhan ve ark., 2011
Antioksidan ve Antigenotoksik	Etanol ekstresi, sulu fraksiyonunda antigenotoksik etki gözlenmiştir. Bununla beraber fareler üzerinde yapılan in vivo deneylerde antioksidan enzim seviyelerinde artış görülmüştür.	Arumugam ve ark., 2009a
Antioksidan	Isıtmanın etkisiyle rozmarinik asit seviyelerindeki düşüş izlenmiş ve yüksek sıcaklıkta rozmarinik asit seviyesinin ve antioksidan aktivitesi düşmüştür.	Fletcher ve ark., 2005
Antifungal	Uçucu yağı *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* ve *M. nanum* üzerinde ketokanozol ve mikanazolden daha etkili olarak bulunmuşlardır.	Pandey ve ark., 2002
Antifungal	Uçucu yağı karvon ana madde olarak görülmüş *Malassezia furfur*, *Trichophyton rubrum* ve *Trichosporon beigelii* üzerinde denemiş ve orta düzeyde etkili görülmüştür.	Adam ve ark., 1998
Antikanser	Wehi-164 fibrosarkoma ve U937 lösemik monosit hücrelerine karşı sulu ekstre denemiş ve antikanser aktivitesi gözlenmiştir.	Hajighasemi ve ark., 2011
Antioksidan	*Mentha spicata*, *Foeniculum vulgare* ve *Aloysia citrodora* infüzyonları antioksidan aktiviteleri bakımından değerlendirilmişler aynı zamanda infüzyon karışımlarının sinerjik etkilerine bakılmıştır sonuç olarak en yüksek antioksidan aktivite biki karışımlarında gözlenmiştir bu durum sinerjik etkiyi göstermiştir.	Guimaraes ve ark., 2011
Antioksidan	*M. spicata*'nın alkollü ekstresi antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde içerikleri bakımından *M. longifolia* dan daha etkili bulunmuştur. İlk çıkan yapraklardaki toplam fenolik madde içeriği ikincil çıkan yapraklardan daha düşük bulunmasına karşın antioksidan ativitesi daha yüksek olarak bulunmuştur.	Malik ve ark., 2013
Antioksidan aktivite	Fareler üzerinde yapılan incelemelerde oksidatif stresi azalttığı görülmüştür.	Saleem ve ark., 2000
Antioksidan aktivite	Etanol ekstresine ait etil asetat hekzan su ve kloroform fraksiyonlarının antiokasidan aktivitelerine bakılmış ve etil asetat	Arumugam ve ark., 2006

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

	ekstresinin en yüksek toplam fenol içeriğine ve antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür.	
Antioksidan aktivite	Metanol ekstresinin güçlü antioksidan etkisi olduğu gözlenmiştir.	Hosseinimehr ve ark., 2007
Antioksidan aktivite	Sulu ekstre Çok güçlü lipit koruyucu ve radikal süpürücü etkisi olduğu gözlenmiştir.	Kanatt ve ark., 2007
Antioksidan aktivite	*in vivo* lipit peroksidasyon, etil asetat ekstresinin güçlü antioksidan etkisi olduğu rapor edilmiştir	Arumugam ve ark., 2009b
Farmakolojik aktivite	Hipotalamusa olan oksidatif stressi üzerine araştırmalar oksidatif stresi azalttığı görülmüştür.	Kumar ve ark., 2008
Farmakolojik aktivite	Sulu ekstre Kontakt dermatit'e sebeb olduğu rapor edilmiştir.	Bonamonte ve ark., 2001
Antioksidan aktivite	Dietil eter, metanol ve diklorometan ekstreleri $DPPH^{\bullet}$ radikal süpürücü etki bakımından değerlendirilmiş sadece dietil eter ekstresi güçlü antioksidan aktiviteye sahip çıkarken diğer 2 ekstrede sonuçlar zayıf olarak bulunmuştur.	Choudhury ve ark., 2006
insektisit aktivite	Uçucu yağ etkili bulunmuştur.	Raja ve ark., 2001

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 3. *Menta spicata* ile ilgili yapılmış diğer çalışmalar

Konusu	Kısaca sonucu	Kaynak
Doku kültürü	Doku kültüründe büyüme sağlanmıştır. Toprağa transferi ile ilgili bir bilgi mevcut değildir.	Banthorpe ve ark., 1990
Doku kültürü gen transferi	*Agrobacterium tumefaciens* ile gen transferi yapılmıştır.	Diemer ve ark., 1999
Enzim izolasyonu	NADPH-Sitokrom P450 izole edilmiştir	Ponnamperuma ve ark., 1996
Enzim izolasyonu	sitokrom P450 limonen hidroksilaz izole edilmiştir.	Lupien ve ark., 1999
Enzim izolasyonu	limonen sentetaz enzimi izole edilmiştir.	Muñoz ve ark., 2008
Hayvan yemi	Yağı alınmış fabrika atıkları düşük kaliteli yem olarak değerlendirilmiştir.	Mustafa ve ark., 2001
Kurutma koşulları	Nem, sıcaklık ve kurutma hızı gibi faktörler değerlendirilmiş sıcaklık en önemli parametre olarak belirlenmiştir.	Lebert ve ark., 1992
Kurutma koşulları	Yüksek sıcaklıkta kurutmalarda uçucu yağ veriminde düşüş gözlenmiştir.	Parminder ve ark., 2009
Uçucu yağ verimi ve morfolojik özellikler	Yaprak büyüklüğü arttıkça uçucu yağ verimi artmış, verimi arttıran bir başka unsur ise gövde çapı olarak bulunmuş ve gövde çapı ve uçucu yağ verimi arasında bir doğru orantı görülmüştür.	Mirzaie-Nodoushan ve ark., 2001
Uçucu yağ verimini arttırılması	Süper kritik karbondioksit ile ekstraksiyon parametreleri üzerine bir çalışma yapılmış en iyi sonuç karbondioksit basıncının 90 bar, sıcaklığın 45^{o}C, partikül çapının 500µm ve akış hızının 5ml/s olduğu, parametrelerde uçucu yağ verimi %2 ile en yüksek olarak bulunmuştur.	Ansari ve ark., 2012
Kültür çalışmaları	Çinko ilaveli toprak içeriğinin etkisi incelenmiş dokularda çinkoya rastlanmasına karşın yapraklarda rastlanmamıştır.	Bekiaroglou ve ark., 2002
Kültür hasat zamanları	Kuzey Finlandiyada yetişen *M. spicata* üzerine yapılan bu raştırmada uçucu yağ miktarı en iyi ağustos sonunda yapılan hasatlarda görülmüş ağustos başında ve eylül sonunada yapılan hasatlardaki toplam uçucu yağ verimi ağustos sonunda elde edilenden daha düşük olarak bulunmuştur.	Aflatuni ve ark., 2006
Magnezyum ve demirce zengin destek	Magnezyum ve demirce zengin desteklerle yetiştirilen *Mentha spicata* kültürlerinin içerdiği demir ve magnezyum miktarlarınıda arttırmıştır.	Arzani ve ark., 2007
Veteriner hekimlik araştırması	*Mentha spicata* ekstreleri enjekte edilen atlarda inflamasyon belirleyicileri olan lipopolisakkarit ve prostoglandin seviyelerine bakılmıştır. Diyetlerine *Mentha* ekstreleri katılan atların eklem sıvılarında lipopolisakkarit (LPS) prostaglandin E2, nitrik oksit (NO) ve glikozaminglikan (GAG) seviyelerinin belirgin ölçüde azaldığı görülmüştür.	Pearson ve ark., 2012

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Antioksidanlar

Moleküler oksijen, aerobik organizmalar için gerekli olduğu kadar bu organizmalar için uygun koşullar sağlandığında tehlikeli de olabilmektedir. (Gilbert ve ark., 1999). Soluduğumuz havanın % 21'ini oluşturan oksijen solunum olayı sonucunda mitokondrilerde bulunan elektron taşıma sistemlerinde (ETS) birtakım enzimsel olaylar ve indirgenme reaksiyonları ile suya çevrilmekte ve zararsız hale getirilmektedir (Cadenas ve ark., 2000).

Tüm bu olaylar sonucunda elde edilen enerji de bize hayat vermektedir. Bazı durumlarda oksijen suya kadar indirgenemeden ortamdan uzaklaşır ve yarım bıraktığı bu reaksiyonu her türlü hücresel materyalle tamamlama eğilimine girerek çok tehlikeli bir hal alan reaktif türleri oluşturur. Oksijenin bu şekilde davranması oksijen paradoksu olarak adlandırılmıştır (Scandalios, 1997).

Normal şartlar altında vücudun serbest radikallere karşı bir savunma sistemi bulunmaktadır. Eğer oksidasyon olaylarını kontrol eden bu savunma sistemi zayıflarsa veya dengeler antioksidan sistem aleyhine dönerse oksidasyon süreci kontrolü kaybederek hastalık oluşturacak seviyelere erişebilir (örn. damar sertliği, kanser, karaciğer rahatsızlıkları v.b.) (Davies, 2005).

Günümüzde yapılan çalışmaların amacı bu oksidatif süreci geciktirmek veya durdurmaktır. Yapılan çalışmalarda, bu etkilere fenolik bileşiklerin neden olduğu, göstermiştir (Koşar ve ark., 2008).

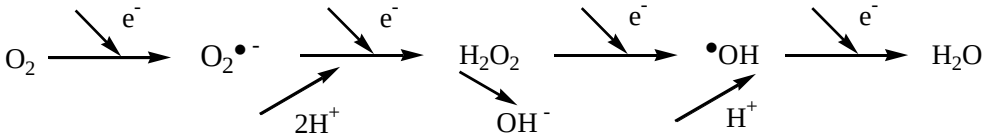
Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türleri, doğada radikal veya radikal olmayan formlarında bulunabilir.

Çizelge 4. Reaktif oksijen türleri

Radikal türler	Radikal olmayan türler
Moleküler oksijen, O_2	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Süperoksit, $O_2^{\bullet-}$	Hipokloröz asit, HOCl
Hidroksil, $^{\bullet}OH$	Ozon, O_3
Peroksil, $RO_2^{\bullet}$	Singlet oksijen, $^1\Delta g$
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Hidroksiperoksil, $HO_2^{\bullet}$	

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 3. Oksijenin indirgenmesi ($O_2^{\bullet -}$: süperoksit, H_2O_2: hidrojen peroksit, $^{\bullet}OH$: hidroksil radikal) (Halliwell, 2006)

Serbest oksijen radikalleri

Serbest radikaller son orbitallerinde eşleşmemiş elektron içeren ve bu nedenle de çok fazla reaktif özellik gösteren moleküllerdir. Serbest radikaller oksijen türevi veya azot türevi serbest radikaller olabilir (Fang ve ark., 2002; Halliwell, 2006)

Hidroksil radikali

Hidroksi radikaller ($^{\bullet}OH$) hücre içinde bulunan hemen hemen her tip molekülle (şekerler, amino asitler, fosfolipitler, DNA ve organik asitler gibi) hızlı bir biçimde etkileşime girerler. *In vivo* ortamda hidroksil radikali 3 yolla oluşur.

a) UV ışınlarıyla oluşan, H_2O_2'deki O-O bağının homolitik fizyonu ile

$$H\text{-}O\text{-}O\text{-}H \xrightarrow{UV} 2^{\bullet}OH$$

b) Fenton reaksiyonu: Hidrojen peroksidin transiston metallerle reaksiyona girmesi sonucu oluşur.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow \text{ara kompleksler} \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

c) Peroksinitrit radikalinin bozulmasıyla

$$ONOOH \longrightarrow OH^{\bullet} + NO_2$$

$^{\bullet}OH$ radikali ile karbonat iyonu (CO_3^{2-}) arasındaki reaksiyon çok güçlü oksidan özelliği olan karbonat radikallerini ($CO^{\bullet}{}_3^-$) meydana getirir. Bu ise karbonat metabolizmasının çok geniş yer tuttuğu insan organizması için çok önemlidir (Halliwell, 2006).

Süperoksit anyon radikali

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), oksijenin bir elektronla indirgenmesi sonucu oluşur. Sulu çözeltilerde süperoksit radikali hidroksil radikalinden daha az reaktiftir çünkü oluşmasını takip eden kısa süre içinde dismutasyon reaksiyonuna bağlı olarak hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönüşür (Şekil 4).

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Şekil 4. Süperoksit anyon radikallerinin dismutasyon reaksiyonu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Günlük kullanılan oksijenin yaklaşık %1-2 lik bir kısmı elektron taşıma sistemlerinden kaçarak süperoksit radikalini oluşturur. Bu durumda 80 kg lık bir adam günde yaklaşık 215-430 mmol süperoksit radikali oluşturabilir. Mitokondriyal kaynaklı süperoksit üretiminde mitekondri membranında bulunan Fe ve Cu miktarının da ilgisi olduğu düşünülmektedir. Süperoksit radikalinin diğer bir biyolojik kaynağı ise ksantin oksidaz enzimidir (Cadenas ve ark., 2000; Halliwell, 2006).

*Peroksil ve alkoksil anyon radikalleri*Organik peroksitlerin bozulmasıyla peroksil ($RO_2^{\bullet}$) ve alkoksil ($RO^{\bullet}$) radikalleri oluşabilir. Bu reaksiyona peroksitlerin geçiş metal iyonları ile olan etkileşimleri (demir (II) iyonları) örnek olarak verilebilir (Şekil 5).

$$ROOH + Fe^{3+} \longrightarrow RO_2^{\bullet} + Fe^{2+} + H^{+}$$

$$ROOH + Fe^{2+} \longrightarrow RO^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^{-}$$

Şekil 5. Organik peroksitlerin demir (II) iyonlarıyla bozulması

Peroksil ve alkoksil radikali pek çok organik molekülün C-H bağlarını etkileyerek onların parçalanmasını sağlar. Bu durum özellikle lipit peroksidasyonunun çoğalma basamağında önemlidir (Denisov ve ark., 2005).

Serbest olmayan oksijen radikaller

Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2) genellikle *in vivo* ortamlarda enzimatik olarak süperoksit dismutaz tarafından katalizlenen maddelerin oluşturduğu radikal olmayan türlerdir. Süperoksit dismutaz enziminden başka ksantin, ürat ve D-aminoasit oksidaz gibi enzim sistemleri tarafından da oluşturulabilir. H_2O_2 moleküler yapısı nedeniyle suya çok benzediği için (H-O-O-H) hücre içine kolaylıkla difüze olabilir. Hidrojen peroksit metal iyonları sayısı arttırdığında fenton reaksiyonunu tetikler ve hidroksil radikali oluşmasına neden olur. Ortamdaki demiri kullanması özellikle haem proteinlerinin (hemoglobin, miyoglobin) sayısını azaltmaktadır. Hidrojen peroksit idrarda antibakteriyel ajan olarak bulunur ve böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesinde yardımcı olur. İdrarda bulunan hidrojen peroksit miktarı diyetle değişebilse bile aynı zaman da vücutta meydana gelen oksidatif stresinde göstergesidir (Halliwell, 2006).

Reaktif azot türleri (RNS)

Reaktif oksijen türlerinde olduğu gibi azot türlerinde de radikal olanlar ve olmayanlar vardır (Çizelge 5) (Halliwell, 2006).

Çizelge 5. Reaktif azot türleri

Radikal olanlar	Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$), azot dioksit ($NO^{\bullet}_2$)
Radikal olmayanlar	Nitrik asit (HNO_2), diazot trioksit (N_2O_3), diazot tetraoksit (N_2O_4), peroksinitrit ($ONOO^-$), peroksinitrik asit (ONOOH), alkil peroksinitritler (ROONO), nitroksil anyonu (NO^-), nitroksil katyonu (NO^+) ve nitril klorit

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Antioksidan maddeler

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri hücre zarında bulunan lipitleri oksidasyona karşı korumaları olmuştur. Bunun sonucu olarak başlangıçta antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır (Yalçın, 1998). Halliwell ve ark. antioksidanları düşük konsantrasyonlarda okside edici ajanlarla karşılaştıklarında bu ajanlarla yarışarak substratın oksidasyonunu geçiktiren veya engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır (Göger, 2006; Halliwell, 2006)

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu şekillerde gösterirler

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığı ile veya doğrudan temizlenmesi
2. Reaktif oksijen türlerinin baskılama yoluyla engellenmesi
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir

1) Yapılarına göre

a) Enzimler

b) Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

2) Kaynaklarına göre

a) Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)

b) Dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)

3) Çözünürlüklerine göre

a) Suda çözünenler

b) Lipitlerde çözünenler

4) Yerleşimlerine göre

a) Hücre içinde bulunanlar

b) Ekstraselüler sıvılarda bulunanlar (Göger, 2006)

Antioksidan savunma mekanizması

Aerobların hayatta kalabilmelerinin sebebi ise, antioksidan savunma mekanizmalarının işlemesidir.

Bazı hareketli bakteriler oksijenin toksisitesini basit taşıma yolları veya elektron iletim zincir reaksiyonlarında $O_2^{\bullet -}$ üretimini engelleyerek yok ederler (Bachmayer 2004).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Antioksidan savunma mekanizması şunlardan oluşur:

a) Ajanlar serbest radikalleri ve diğer reaktif türlerini katalitik olarak uzaklaştırırlar. Süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimleri bu kısımda yer alır.

b) Demir, bakır ve haem gibi pro-oksidanların varlığında proteinler yapar. Transferrinler, heptaglobinler, hemopeksinler ve metallotiyonein bu kısımda yer alır.

c) Proteinler farklı mekanizmalarla biyomolekülleri oksidatif hasara karşı korurlar.

d) Küçük moleküllü ajanlar reaktif oksijen ve reaktif azot türlerini (ROS/RNS) süpürürler. Glutatyon, askorbik asit ve α-tokoferol örnek olarak verilebilir (Bachmayer 2004).

In vivo antioksidan savunma mekanizması

Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD)

Hücre membranlarında ve DNA üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak hasar yapar. Süperoksit anyon radikalinin organizmadan uzaklaştırılması işleminden sorumlu olan süperoksit dismutaz enzimidir. Süperoksit dismutaz enziminin 3 farklı tipi vardır: metal içeren süperoksit dismutaz enzimi (Fe-SOD), manganez içeren süperoksit dismutaz enzimi (Mn-SOD), bakır/çinko içeren süperoksit dismutaz enzimi (Cu, Zn-SOD) (Cheng ve ark 2006). Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit radikaline dönüştürerek etkisiz hale getirir (Bachmayer 2004).

$$2O_2^{\bullet} + 2H \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Katalaz

Süperoksit anyon radikali süperoksit dismutaz tarafından H_2O_2 ye dönüştürülüp etkisiz hale getirilse de bu durumda bir başka tehlike ortaya çıkmaktadır. Meydana gelen H_2O_2 aslında bu haliyle zararsız bir molekül de olsa parçalanıp $OH^{\bullet}$ radikaline kolayca dönüşebildiği için ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir (Halliwell ve ark 2000).

$$H\text{-}O\text{-}O\text{-}H \xrightarrow{UV} 2^{\bullet}OH$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + 2^{\bullet}OH$$

Oluşan H_2O_2 katalaz enzimi etkisiyle su ve oksijene parçalanarak ortamdan uzaklaştırılır. (Huang ve ark., 2005)

Gulutatyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) hidrojen peroksidin suya indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir ve yapısında selenyum bulunmaktadır. Glutatyon peroksidaz

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

bu reaksiyon sonucu yükseltgenmiş glutatyona dönüşür (GSSG) (Bachmayer 2004).

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSH + 2H_2O$$

Enzimatik olmayan koruma

Enzimatik olmayan antioksidanlar E vitamini, C vitamini, karatenoitler, flavonoitler, fenolik bileşikler gibi pek çok eksojen ve endojen kökenli maddelerdir.

Vitamin E

E vitamini sadece bitkilerde sentezlenebilen ve yağda çözünen tokoferoller ve tokotrienollerden oluşan toplam 8 çeşit bileşik için kullanılan genel bir isimdir. Sınıflandırılmaları ise eski yunan alfabesine göre yapılmaktadır. En etkili antioksidan bileşik d-α-tokoferoldür. Alfa-tokoferol yağ asitlerini serbest radikallerin oksidasyonundan koruyan çok güçlü bir ajandır. E vitamini yağda eriyen bir vitamin olması nedeniyle emilmesi için ince barsakta yağın bulunmasına ihtiyaç vardır. İnce bağırsakta yağ bulunmasını ya da absopsiyonunu bozan bazı hastalıklarda ciddi E vitamini eksikliği ortaya çıkmaktadır. E vitamini'nin zengin olduğu kaynaklar balıklar hariç diğer yağlı besinler, fındık, tahıllar ve yumurta olarak sayılabilir (Tanakol, 1998).

Vitamin C

C vitamini, askorbik asit olarak da bilinir ve suda eriyebilen önemli bir antioksidandır. Birçok hayvanda C vitamini sentezlenemediğinden diyetle dışarıdan alınması gerekmektedir. Eksikliğinde meydana gelen skorbit hastalığı çok eski zamanlardan beri bilinmektedir (Tanakol 1998). Askorbik asit güçlü bir serbest radikal süpürücü etkiye sahiptir ayrıca kollajen sentezinde de kullanılmaktadır. E vitamini ile birlikte Düşük Yoğunluklu Lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu engellemektedir. C vitamini bazı durumlarda prooksidan özellik gösterir. Ortamda C vitamini ile birlikte Fe^{+3} iyonları varsa bu iyonları Fe^{+2} formuna indirger. Fe^{+2} iyonları ise hidrojen peroksit ile etkileşime girerek süperoksit radikalinin oluşmasını sağlar ve prooksidan özellik bu şekilde ortaya çıkmış olur (Tanakol, 1998; Göger, 2006).

Karotenoitler ve ksantofiller

En önemli karatenoit A vitamininin de ön maddesi olan beta-karatenoit'tir. A vitamini retinoit olarak da adlandırılır ve eksikliğinde özellikle çocuklarda körlük ortaya çıkabilmektadir. Karatenoitler bitkilerde fotosentez sonucu oluşan singlet oksijeni ortamdan uzaklaştırırlar (Tanakol, 1998).

Polifenoller

Aromatik halkasında bir ya da daha fazla hidroksil grubu taşıyan maddeler fenolik maddelerdir. Fenolik maddelerin bir araya gelmesi ile polifenolik maddeler oluşur. Polifenollerden antioksidan etkisi C ve E vitamininden bile daha güçlü olan bir grup vardır ki, bu grup flavonoitler olarak adlandırılır ve C6-C3-C6 yapısına sahiptirler ve bitkilerde genellikle glikozit halinde bulunmaktadırlar. Flavonoitler serbest radikal süpürücü etkileri yanında metallerle şelat oluşturarak

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

muhtemel serbest radikal oluşumlarının da önüne geçerler. Flavonoitlerin flavanol, flavonol, flavanon ve flavon alt sınıfları vardır. Bunlardan kateşinler flavanol grubuna dahildir ve yeşil çay, siyah çay ve kırmızı şarap başlıca kateşin kaynaklarıdır. Naringenin ve taksifolin flavanon grubuna dahillerdir ve başlıca kaynakları narenciye kabuğu ve turunçgillerdir. Krisin ve apigenin flavon grubuna dahildir ve başlıca kaynaklarını meyvaların kabukları ile kereviz ve maydanoz oluşturmaktadır (Yalçın, 1998; Göger, 2006).

Diğer Düşük Molekül Ağırlıklı Ajanlar

Bilirubin, melatonin, koenzim Q, ürik asit bu gruba dahil antioksidanlardır.

Bilirubin lipit peroksidasyonu inhibe eder, süperoksit ve hidroksil radikalini süpürür (Yalçın, 1998).

Melatonin lipofilik bir antioksidandır. Kan-beyin bariyerini geçebilme özelliği bulunduğundan beyinde de etkili olabilien bir antioksidandır. Toksik etkisine uzun kullanımlarda bile rastlanmamıştır. Prooksidan aktivitesi de yoktur. DNA hasarlarını engellemede çok başarılı olmuştur Yaşlanma ile melatonin üretimi azalır (Yalçın, 1998).

Übikinon lipofilik antioksidandır ve soya yağı ile balık başlıca doğal kaynaklarıdır. En önemli übikinon, übikinon-10 (koenzim-Q) dur. Çok güçlü bir antioksidan değilse de E vitamini gibi güçlü bir antioksidan maddenin rejenerasyonunda rol oynar (Tanakol, 1998; Yalçın, 1998).

Ürik asitin en önemli özelliği C vitamininin prooksidasyon etkisini baskılamasıdır. Bu özeliğini demir ve bakır iyonlarını bağlayarak yapar. Lipit peroksidasyonunu engelleyici özelliği yoktur (Yalçın, 1998).

Gıdalarda kullanılan antioksidanlar

Gıdalarda bulunan lipitler, özellikle doymamış lipitler, çok çabuk okside olup gıdaların bozulmasına sebep olmaktadırlar. Gıdalarda antioksidan maddeler kullanılmasının asıl sebebi bu oksidasyonu geciktirerek gıdaların raf ömrünü uzatmaktır (Bachmayer, 2004).

Sentetik antioksidanlar

BHA (butillenmiş hidroksianisol), BHT (butillenmiş hidroksi toluen), trolox, propil gallat sentetik antioksidanlardandır. Bunlardan BHT ve BHA lipit peroksidasyonunu engellemede başarılıdır. Trolox, alfa-tokoferolün suda çözünen formu olarak da düşünülebilir. Propil gallat ise suda çözünen güçlü bir antioksidandır. (Sebranek ve ark., 2005).

Doğal antioksidanlar

Sentetik antioksidanların toksik etkilerinin ortaya çıkması ile doğal antioksidanların kullanılması düşüncesi önem kazanmaya başlamıştır. Fakat doğal antioksidanların etkilerinin istenilen kadar güçlü olmaması ve tat/kokularının güçlü olması gibi olumsuzluklar nedeniyle kullanımları kısıtlıdır. Çoğunlukla sentetik antioksidanlarla kombine halde kullanılmaktadırlar (Bachmayer, 2004).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Kütle Spektrometresi ile Fenolik Bileşiklerin Analizi

Bir organik bileşiğin yapı analizi için en kolay yol, hidrojen ve karbon atomları türüne bakmak, fonksiyonel gruplarını aramak yerine tüm yapısına birden bakmaktır. Kütle spektrometrisi, günümüzde mevcut spektroskopik yöntemler arasında araştırmacıya molekülün tüm yapısı hakkında bilgi veren ve çoğu kez molekül kütlesinin ve molekül formülünün bulunmasını sağlayan yegane yöntemdir (Erdik, 1993). Geride bıraktığımız son yirmibeş yıl Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) ve Kütle Spektroskopisi (KS)' nin beraberce kullanıldığı ve kabul gördüğü yıllar olmuştur. Son zamanlarda da bu ikili kullanılarak yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Kompleks bitkisel karışımların ayrılmasından tıp alanında vücut sıvılarında numune aranmasına, adli tıpta suçluların bulunmasına kadar pek çok alanda kullanımı artmıştır. YBSK ile kullanılan diğer dedektörlerde analizden doğru sonuç almanın olmazsa olmazı kolonda iyi bir ayırım gerçekleşmesinden geçiyorsada kütle spektrometresinde aradığınız moleküllerle ilgili ön bilgiye sahipseniz kromatografik bir ayırım yapılmasa bile ilgili maddelerin tespitine olanak sağlanmaktadır (Niessen ve ark., 1995; Mauri ve ark., 2000). Fakat burada bir konu gözden kaçırılmamalıdır: Kromatografik ayrımın yapılmaması, analizi yapılacak madde karışımının doğrudan kütle spektrometresine gönderilmesi ve spektrum toplanması, bu karışım ile yapılacak sonraki çalışmalar için sadece belirleyici, kıstas yapıcı, yol gösterici olmaktadır. Kromatografik ayrım sonucu bilgi toplanması işleminde yol gösterici olması bakımından önemlidir. Bu tarz bir analizde izomer bileşiklerin ayrımının yapılması mümkün olamamaktadır, bazı moleküller hareketli faz içinde baskılanmakta ve taban gürültüsü içinde kaybolmaktadır. Bu nedenle yanlış sonuçlar almak büyük bir olasılıktır.

Fenolik bileşiklerin analizi için yapılan yayınlarda kromatografik işlemler esnasında kullanılan çözücü seçimi, analiz sıcaklığı, akış hızı gibi pek çok faktör farklılık göstersede hepsinde kullanılan kolon aynıdır. Partikül çapı 1,7-5µm arasında değişen ve boyları 50-250 mm olan ters faz C-18 kolonlar bu analizler için en çok tercih edilen kolonlar olmuşlardır. Fenolik asitlerin analizi için tavsiye edilen pH değeri 2-4 arasında olmuştur, çünkü pek çok fenolik asitin pKa değeri 4 civarındadır. Bu amaçla kütle spektrometrisi içinde analizler asitli mobil fazlarda yapılmaktadır. UV dedektörler veya diğer tip dedektörler için kullanılan çoğu asit KS için uygun olamamaktadır. Örneğin, fosforik asit kullanımı diğer dedektörler için ideal bir pH ayarlayıcısı olabilir, fakat uçucu olmaması KS analizlerinde kullanılmasını engellemektedir. Benzer olarak Trifloro asetik asit (TFA) da KS analizlerinde uygun değildir, çünkü bu asidinde iyonlaşma gücü çok fazla olduğu için analizler sırasında diğer iyonların baskılanmasına neden olmaktadır. TFA ile yapılan analizler sonucunda alınan spektrumlarda ilgili moleküller çok az veya hiç görülememektedir. Asetik asit ideal bir çözücü olarak görülse de ilgili moleküllerle kompleks yapma ihtimali büyüktür. Bu tarz analizlerde eğer aranan molekül ağırlığı görülemiyorsa "negatif M+59 veya pozitif M+61" pikleri de kontrol edilmelidir. KS için en uygun pH ayarlayıcı formik asittir bazı durumlarda formik asit molekül ile kompleks yapar. Bu durumda (negatif M+46 veya pozitif m+48) pikleri de aranmalıdır. KS analizlerinde kulanılan mobil fazın pH değeri % 0.1 den % 3 e kadar değişen konsantrasyonlarda kullanılabilmektedir. Şurası unutulmamalıdır ki kullanılan asitli mobil faz

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

kromatografik ayrımın gerçekleşmesi için gerekli olduğu kadar molekülleri protonlayıcı olarak da çalışmaktadır (pozitif iyon modunda). Negatif iyon modunda amonyum asetat gibi tampon çözeltili mobil fazlar molekülden H kopmasını kolaylaştırdıkları için tercih edilmektedir. Bu durumda kromatografik ayrım istenildiği gibi olamamaktadır. Amonyum asetatlı çözeltiler doğrudan enjeksiyonlarda kromatografik bir ayrımın yapılmadığı durumlarda tercih sebebi olabilir. Hareketli fazda pH ayarlamak ve iyonlaşmayı kolaylaştırıcı tampon olarak kullanılan çözeltilerde uyulması gereken ilk kural kullanılan tamponun uçucu olmasıdır.

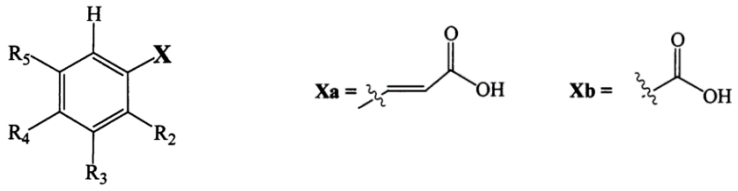
Bu nedenle genel bir kural olarak kullanılan asitlerin inorganik asit olmamasına ve kullanılacak bazların da alkali metal türde olmamasına dikkat edilmelidir. Bu amaçla sadece asetat veya format tamponları kullanılmalıdır (Stalikas, 2007). KS analizlerinde kullanılacak en uygun akış sistemleri dakikada 10-50 µl olanlardır fakat böyle bir akış hızında ayrımın saatler alabileceği düşünülürse bu durumda elektro sprey iyonlaşma (ESI) için akış maksimum 2 ml/dk atmosferik basınçta kimyasal iyonlaşma (APCI) için ise akış maksimum 3 ml/dakika olmalıdır.

Fenolik Asitlerin Kütle Spektrometresi ile Analizi

Fenolik asitler bitkisel sekonder metabolitlerden fenolik diye ifade edilen çok büyük bir grubun küçük bir parçasını oluştururlar. Genel olarak yapılarında en az bir hidroksil veya karboksilik asit taşıyan fenol halkalarıdır. Başka bir ifadeyle hidroksisinnamik asit veya hidroksibenzoik asit türevleri fenolik asitler olarak ifade edilir (Robbins, 2003). Fenolik asitlerde iskelet yapı aynı olmasına karşın yapıdaki hidroksil sayısı ve pozisyonları değişerek kendi içlerinde türevlerini oluşturular.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 6. Doğada sık rastlanan fenolik asit yapıları (Robbins, 2003)



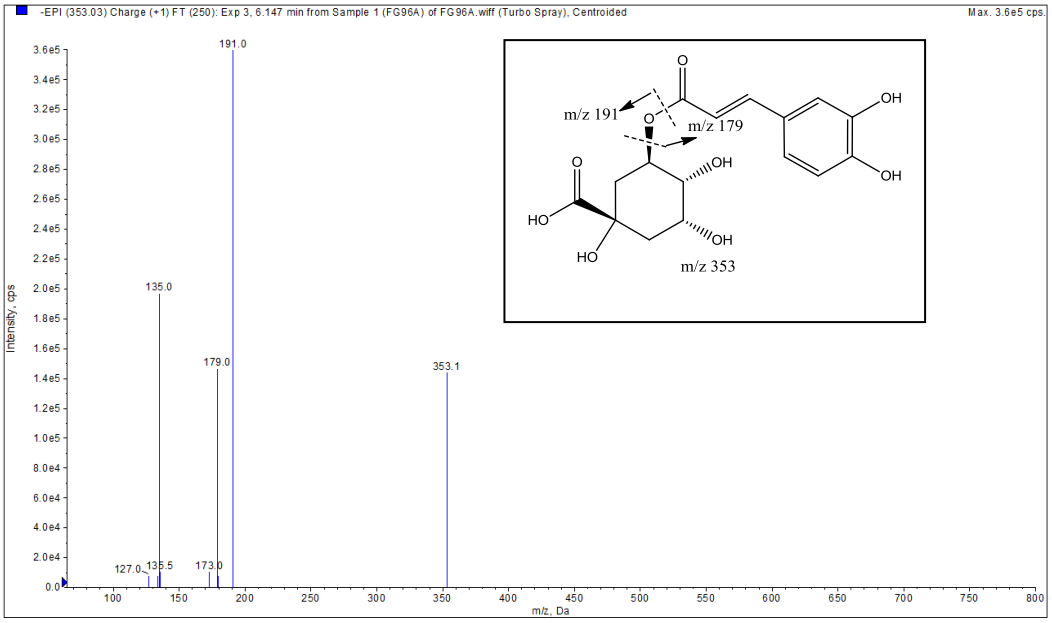
No	R_2	R_3	R_4	R_5	x	Genel ismi
1	H	H	H	H	a	sinnamik asit
2	-OH	H	H	H	a	*o*-kumarik asit
3	H	H	-OH	H	a	*p*-kumarik asit
4	H	-OH	H	H	a	*m*-kumarik asit
5	H	$-OCH_3$	-OH	H	a	ferulik asit
6	H	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	a	sinapik asit
7	H	-OH	-OH	H	a	kafeik asit
8	H	H	H	H	b	benzoik asit
9	-OH	H	H	H	b	salisilik asit
10	H	H	-OH	H	b	*p*-hidroksibenzoik asit
11	H	$-OCH_3$	-OH	H	b	vanilik asit
12	H	$-OCH_3$	-OH	$-OCH_3$	b	siringik asit
13	H	-OH	-OH	H	b	protokateşik asit
14	-OH	H	H	-OH	b	gentisik asit
15	H	-OH	-OH	-OH	b	gallik asit

Fenolik asitlerin KS analizlerinde en iyi sonuçlar negatif ESI ile alınmaktadır. Bu duruma fenolik asitlerin yapılarında bulunan hidroksil veya karboksil gruplarından H koparmanın proton eklemeye nispeten daha kolay olması sebep olmaktadır. Fenolik asitlerin ve flavanoitlerin benzer bu durumu günümüzde artık negatif iyonlaşma modunda yani ana molekülden bir proton çıkartarak analiz yapma tekniklerinin yaygınlaşmasını sağlamıştır.

Fenolik asitler yüksek sıcaklık ve basınçta kolaylıkla yapılarından CO_2 çıkartarak (M-H-44) karakteristik iyonunu gösterirler. KS analizlerinde tanınmalarını kolaylaştıracak birçok ipucu vardır. Örneğin *m/z* 191 iyonu tipik olarak kinik asit esterlerinin yapıda olduğu gösterir (Clifford ve ark., 2005). Bazen yapıdan bir molekül su çıkışıyla *m/z* 173 iyonu da spektrumda gözükebilir. Bazen analizleri değerlendirmek çok kolay olmayabilir. Spektrumda görülen -162 *amu'luk* farklar yapıdan kafeoil veya bir hekzoz (glikoz veya galaktoz) grubunun koptuğunu gösterir böylesi durumlarda yapının glikozit olup olmadığı, glikozit ise aglikonunun spektrumunun görülüp görülmediği gibi veya UV spektrumlarının vereceği farklar dikkate alınarak yapı aydınlatılmaya çalışılmalıdır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

.



Şekil 6. kafeoilkinik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması

kafeoilkinik asite ait kütle spektrumu

Spektrumda görülecek olan *m/z* 191 iyonu molekülün bir kinik asit türevi olduğu gösterir aynı spektrumda *m/z* 179 ve 135 iyonları sırasıyla kafeik asit ve kafeik asit – $C0_2$ pikleridir. Bu bilgiler spektrumu görülen molekülün kafeik asit ve kinik asit birleşmesi ile oluşmuş bir kafeoilkinik asit olduğunu, iyonların bağıl yoğunluğundan ise kafeik asit ve kinik asitin esterleşme pozisyonları belirlenebilir. Benzeri tanımlamalar YBSK-KS/KS analizi esnasında rastlanılan her molekül için ayrı ayrı yapılmıştır ve yeri geldiğinde tekrar üzerinde durulacaktır. Bu ve benzeri bilgileri içeren sayısız makale vardır (Hughes ve ark., 2001; Clifford ve ark., 2003; Hvattum ve ark., 2003; March ve ark., 2004; Matsuda ve ark., 2009; Barros ve ark., 2012; Prasain, 2012).

Flavonoitlerin Parçalanmaları

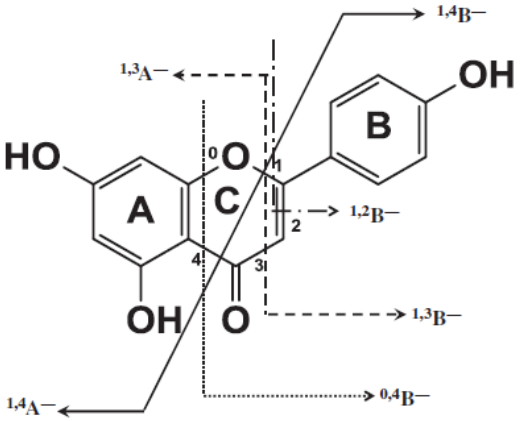
Flavanoitler bitkisel sekonder metobolitlerin çok büyük bir kısmını oluşturur. Yapılarında bir kromon halkası ve fenil halkası ihtiva ederler. Flavonoitler genellikle 3, 5, 7, 3', 4' ve/veya 5' pozisyonlarından hidroksillenirler sıklıkla da bu hidroksillerden biri veya birkaçı metillenir, asetillenir veya sülfatlanabilir. Flavon glikozitleri çoğunlukla "O" nadiren ise "C" glikozitleri şeklinde görülebilir. O glikozitlerinde şeker genellikle 3 veya 7 pozisyonuna bağlanırken C glikozitlerinde şeker genellikle 6 veya 8 pozisyonundadır.

Flavanoitlerin Parçalanma Şekilleri

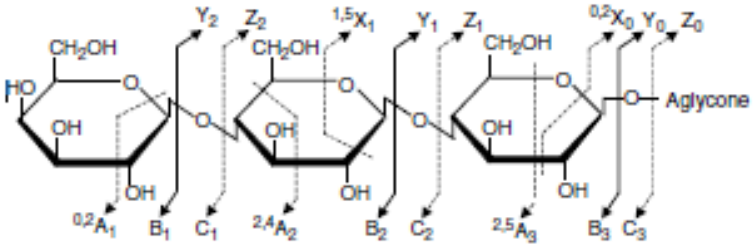
En bilinen flavonoit parçalanma şekli Retro Dials Alder (RDA) reaksiyonudur ve özellikle aglikon yapısını belirlerken kullanılmaktadır. RDA parçalanmasının gerçekleşmesi için 6'lı bir siklik yapı ve bir çifte bağ bulunması gerekmektedir ki bu durum çoğu flavonoit glikozitin C halkasını tarif etmektedir. Parçalanma sigma bağının olduğu yerden meydana gelir ve açığa çıkan paylaşılmamış elektronların yeni çifte bağlar oluşturması ile sonlanır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Fragmentasyonların oluşması kullanılan cihazdan ve iyonlaşma kaynağından bağımsız olarak hareket eder. Farklılıklar ancak iyonların göreceli bolluğu üzerinde meydana gelir. oluşan fragmentler şu şekilde gösterilir:



Şekil 7. Aglikonlar için negatif kütle parçalanması (Ko ve ark., 2013)



Şekil 8. Glikon parçalanmalarını gösteren sınıflandırma (Ferreres ve ark., 2004)

$^{x,y}A^-$ ve $^{x,y}B^-$ kavramlarından x ve y kopmanın olduğu bağları A ve B ise kopmanın hangi halkayı içine alarak oluştuğunu gösterir. $^{1,3}A^-$ ve $^{1,3}B^-$ fragmentleri flavonoitler içinde en sık rastlanan bağ kopması şeklidir. Fakat $^{1,3}A^-$ fragmentini görülme sıklığı $^{1,3}B^-$ den her zaman daha fazladır. $^{0,3}A^-$ ve $^{0,3}B^-$ parçalanmalarına sadece izoflavonlarda rastlanmıştır. Benzer olarak $^{0,4}B^-$ parçalanmasına da sıklıkla izoflavonlarda rastlanırken $^{0,4}A^-$ parçalanmasına flavonlarda rastlanmaktadır.

$^{1,2}A^-$ parçalanması kersetin için karakteristiktir. Flavanoller hariç bütün flavanoitlere *m/z*151 ve 107 iyonları gözlemlenirken kateşin ve epigallokateşinde *m/z*137 ve 109 iyonları gözlenir. Benzer olarak flavonlar hariç bütün flavanoitlerde *m/z*137 ve 109 gözlemlenirken flavonlarda *m/z*121 gözlemlenir (de Rijke ve ark., 2006; Gates ve ark., 2012). Ayrıca negatif iyon modunda -18, -28, -44, -42 (H_2O, CO, CO_2, H_2CCO) farklar da görülmektedir.

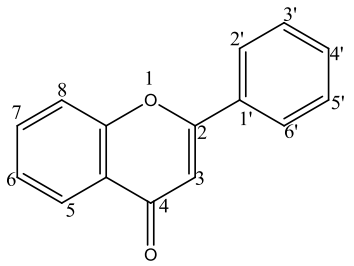
Kovalent Bağların koparak molekülün glikon ve aglikonuna ayrılması 2 şekilde olabilir: Homolitik bağ kopması ki bu durumda elektronlar eşit olarak ayrılan kısımlara dağılır. Bu durumda $(Y_0\text{-H})^-$ radikal aglikon iyonu oluşur. Bir diğer bağ kopması şeklide heterolitik bağ kopmasıdır ki bu durumda elektronlar eşit olarak dağılmaz (Y_0) aglikon iyonu oluşur. Negatif iyon modunda (Y_0-H) ve (Y_0)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

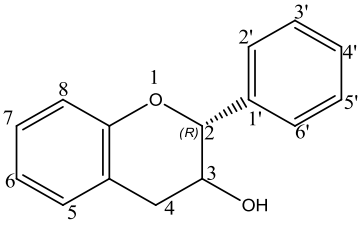
iyonları da oluşur. Flavonol 3-*O*-glikozitlerde homolitik kopmanın hetrolitik kopmaya oranı ((Y_0-H)/Y_0) B halkasında hidroksil sayısının artması ile artar. Aksine B halkasında metoksil bulunması flavon 7-*O* glikozitlerde radikal aglikonun (Y_0- H) oluşmasını engeller. Son olarak da dihidrokalkon ve flavanon glikozitlerde radikal aglikon iyonu oluşmamaktadır.

Şekil 8 den anlaşılacağı üzere Y_1 sadece diglikozitler için geçerli bir molekül iyonudur. Spektrum yorumlanmasında bu iyonların bağıl yoğunluğu da önemlidir (Y_0-H) 3-*O* glikozitlerde 7-*O*-glikozitlere göre daha yüksektir (Hvattum ve ark., 2003).

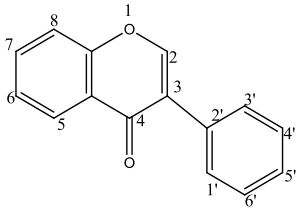
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



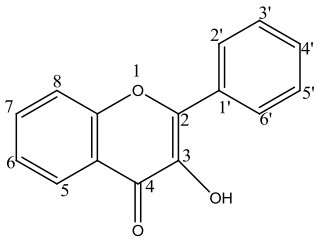
Flavonlar	5	7	3’	4’
Apigenin	OH	OH		OH
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Kırisin	OH	OH		



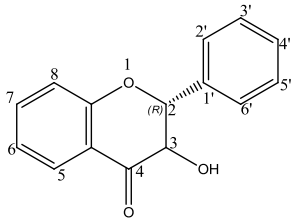
Flavan-3-ol	3	5	7	3’	4’	5’
Kateşin	βOH	OH	OH	OH	OH	
Epikateşin	αOH	OH	OH	OH	OH	
Epiagallokateşin	αOH	OH	OH	OH	OH	OH



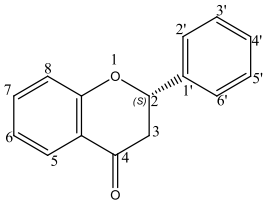
İzoflavononlar	5	7	4’
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	O-glu	OH
Daidzein		OH	OH
Daidzin		O-glu	OH



Flavonoller	5	7	3’	4’	5’
Kersetin	OH	OH	OH	OH	
Kamferol	OH	OH		OH	
Galangin	OH	OH			
Fisetin	OH	OH	OH		
Mirsetin	OH	OH	OH	OH	OH



Flavanonol	5	7	3’	4’
Taksifolin	OH	OH	OH	



Flavanonlar	5	7	3’	4’
Naringenin	OH	OH		OH
Naringin	OH	O-ram-glu(1,6)		OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH_3
Hesperidin	OH	O-ram-glu (1,6)	OH	OCH_3

Şekil 9. Sık rastlanan flavonoitlere ait formüller (ram: ramnoz, glu: glikoz)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Materyal ve Kimyasal Maddeler

Bitkisel materyal

Materyal olarak *Mentha spicata* ssp. *spicata* ve *M. spicata* ssp. *tomentosa'*nın toprak üstü kısımları kullanılmıştır.

Bitkisel materyaller Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Gül Tarımcılar tarafından 2006 yılında toplanmıştır. Herbaryum örnekleri Bursa Uludağ Üniversitesi Herbaryumunda (BULU) bulunmaktadır. Toplanma yerleri ile ilgili bilgiler:

Mentha spicata ssp. *spicata*, Prj-143, A2: Yalova; Yalova-İzmit arası, Sultaniye, 0 m, nemli alan, 07.09.2006. BULU 30571.

Mentha spicata ssp. *tomentosa*, Prj-138. A2: Yalova; Orhangazi-Yalova arası, Esadiye, 200 m, kurak alan, 07.09.2006. BULU 30569.

Kimyasal maddeler

Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik kalitededir. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi analizlerinde YBSK kalitesinde çözücüler ve standart maddeler kullanılmıştır. Tüm deneylerde kullanılan su ise bidistile sudur.

Kullanılan aletler

Çalkalamalı su banyosu (GL Science)

Rotavapor (Heildolph)

Santrifüj (Eppendorf)

Ultrasonik banyo (Bandalin Sonorex)

Vorteks karıştırıcı (Heildolph)

pH metre (WTW Inolab)

Etüv (Binder)

Liyofilizatör (Lyovac)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Cihazı (Shimadzu Prominance)

UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu)

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

Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi/Kütle Spektrometresi

(Aplied Biosystem 3200Q trap)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Deneysel Çalışma

Bu bölümde *Mentha spicata'*nın iki alt türü ssp. *spicata ve* ssp. *tomentosa*'nın topraküstü kısımları üzerinde yapılan ekstraksiyon işlemleri, ekstrelerde yapılan YBSK/KS sistemi ile bileşim belirleme ve miktar tayinleri ile antioksidan aktivite çalışmaları hakkında bilgi verilmektedir.

Ekstrelerin hazırlanışı

Bikisel materyallerin kurutulmuş topraküstü kısımları 100gr olacak şekilde kaba toz edildikten sonra oda sıcaklığında çözücü olarak sırasıyla hekzan, etil asetat, %70 metanol kullanılarak 16 saat süreyle 3'er kez çalkalamalı maserasyon yöntemiyle ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstreler vakum altında rotavaporda (< 40 ºC) yoğunlaştırılmıştır. Ayrıca materyallerden, % 5'lik infüzyonlar ve asit hidroliz sonrası etil asetat ekstresi hazırlanmıştır. Asit hidroliz için materyaller 1,2 M Hidroklorik asit içeren metanol:su (1:1) ile 80^{O}C de çalkalamalı su banyosunda 1 saat bekletilmiş, soğutulan ekstreden metanollü kısım uzaklaştırılmış, geri kalan sulu kısım etil asetat ile tekrar ekstre edilmiş, etil asetatlı kısımlar rotavaporda düşük basınç altında kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır (Koşar ve ark., 2007).

Bu ekstrelerden % 70 metanol ve % 5 infüzyon ekstreleri daha sonra suyla disperse edilip sırasıyla hekzan ve diklorometan çözücüleri ile fraksiyonlanmış ve geri kalan sulu kısımlarla birlikte diğer fraksiyonlarda kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen su ekstreleri liyofilize edilmiş ve tüm ekstreler analiz anına kadar -18 ºC'de saklanmıştır. Ekstreler aşağıdaki kodlar ile adlandırılmıştır. %5 infüzyon ekstresi bundan sonra sulu ekstre olarak adlandırılacaktır.

Kodu	Ekstraksiyon metodu	Ekstre açıklaması
(E1)	maserasyon	hekzan ekstresi
(E2)	maserasyon	etil asetat ekstresi
(E3)	maserasyon	% 70 metanol ekstresi
(E4)	infüzyon	% 5 infüzyon ekstresi (sulu ekstre)
(E5)	asit hidrolizi	asit hidrolizi ekstresi
(E6)	partisyon	% 70 metanol hekzan fraksiyonu ekstresi
(E7)	partisyon	% 70 metanol diklorometan fraksiyonu ekstresi
(E8)	partisyon	% 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım ekstresi
(E9)	partisyon	% 5 infüzyon hekzan fraksiyonu (sulu ekstre hekzan fraksiyonu)
(E10)	partisyon	% 5 infüzyon diklorometan fraksiyonu (sulu ekstre diklorometan fraksiyonu)
(E11)	partisyon	% 5 infüzyon fraksiyon sonrası sulu kısm (sulu ekstre fraksiyonlanma sonrası kalan sulu kısım)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Bileşim analizleri

Bitkisel materyallerden hazırlanan ekstrelerde toplam fenol miktarı, toplam flavonoit miktarı, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi/KütleSpektrometresi (YBSK-KS/KS) ile fenolik bileşiklerin analizleri aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Toplam fenol miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam fenoller gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi (Singleton ve ark., 1999) kullanılarak hesaplanmıştır. 6 mL distile su içeren 10 mL ölçekli kap içerisine 100 µL örnek çözeltisi ve 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. 1 dakika sonra 1,5 mL %20'lik sulu Na_2CO_3 ilave edilip 10 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanılmıştır. 2 saat 25 ºC'de inkübe edildikten sonra absorbans 760 nm'de ölçülerek ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Üç paralel deney yapılarak sonuçlar ortalama değerler olarak verilmiştir.

Toplam flavonoit miktar tayini

Ekstrelerin içerdikleri toplam flavonoit miktarları rutine eşdeğer olarak (RE) mg_{RE}/g_{ekstre} olarak hesaplanmıştır (Miliauskas ve ark., 2004). 1 mL metanolde hazırlanmış ekstre (10g/L), 1 mL etanolik aluminyum triklorit (20g/L) ile karıştırılmış ve 25 mL ye etanol ile seyreltilmiştir. Çözeltilerin absorbansları 20 °C de 40 dakika bekletildikten sonra 415 nm de ölçülmüştür. Şahit çözelti 1 mL ekstre ve 1 mL asetik asitin 25 mL etanolik çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Rutinin kalibrasyon eğrisi etanolde çözülerek aynı şekilde hazırlanmıştır. Bütün ölçümler dört paralel olarak alındı ve ortalama sonuçlar kullanılmıştır.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Kütle-Spektrometresi (YBSK-KS/KS) ile fenolik bileşiklerin analizi

Cihaz	: Shimadzu 20A Prominance sıvı kromatografisi sistemi
Dedektör	: Applied Biosystems 3200 Q-Trap MS/MS
İyonlaşma modu	: Elektro Sprey İyonizasyon (ESI), negatif iyonlaşma
Kolon	: GL Science Intersil ODS 4,6x 250mm, 5µ
Kolon sıcaklığı	: 40^oC
Akım hızı	: 1 ml/dk
Hareketli faz A	: metanol: su: formik asit (10:89:1 h/h/h)
Hareketli faz B	: metanol: su: formik asit (89:10:1 h/h/h)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Akış programı:

Zaman(dk)	B kons
0.01	15
15.00	40
18.00	45
30.00	45
35.00	75
38.00	85
39.00	95
40.00	100
45.00	100
46.00	15

Hekzan ekstrelerinin analizi

Gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) ve gaz kromatografisi (GC/FID) ile apolar bileşiklerin analizi

GC/MS-GC/FID çalışma şartları

Cihaz : Agilent 5975 GC-MSD sistemi ve Agilent 6890N GC/FID sistemi

Enjektör sıcaklığı : 250 °C

İnterface : 280 °C

GC dedektör sıcaklığı : 300 °C

Kolon : HP-Innowax FSC kolonu (60 m x 0.25 mm, 0.25 mm film kalınlığı) (Aynı kolon ve analiz şartları Gaz kromatografisi için de kullanılmıştır)

Taşıyıcı gaz : Azot (0.8 mL/dak)

Sıcaklık programı :

zaman (dak)	Sıcaklık (°C)	Artış programı (°C/dak)
0	60	-
10	60	-
50	220	4
60	220	-
80	240	1
120	240	-

Split oranı : 40:1

Kütle aralığı : *m/z*35-550 (70 eV)

Tanımlama : Uçucu bileşenlerin kütle spektrumları Uçucu Yağ Bileşenleri Başer Uçucu Yağ Bileşikleri Kütüphanesi, Adams Kütüphanesi ve MassFinder Kütüphanesi kullanılarak, ayrıca tutunma indeksleri karşılaştırılarak Aydınlatılmıştır. Ayrılan bileşiklerin relatif yüzde miktarları ise FID kromatogramlarından alan değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Antioksidan aktivite çalışmaları

İndirgeme gücünün belirlenmesi

Ekstrelerin demir (III)'ü indirgeme kapasiteleri Oyaizu ve arkadaşlarının yöntemine göre yapılmıştır. 1 mL ekstre çözeltisi 2.5 mL 0.2 M fosfat tamponu (pH 6.6) ve 2.5 mL %1 lik potasyum hekzasiyanoferrat çözeltisi ile karıştırılmıştır. 50 C de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.5 mL %10 luk trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiş ve karışım 10 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak, 2.5 mL üst kısım 2.5 mL su ve 0.5 mL %0.1 lik $FeCl_3$ ilave edilip karıştırılarak 700 nm de absorbansları okunmuştur. Ekstrelerin indirgeme güçleri askorbik asite eşdeğer olarak (AscAE) mmol askorbik asit/g örnek olarak verilmiştir. Büyük AscAE değeri zengin indirgeme kapasitesini göstermiştir. Tüm analizler dört paralel olarak yapılmış ve ortalama değerler olarak verilmiştir (Oyaizu, 1986).

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil ($DPPH^{\bullet}$) radikalini süpürücü etki tayini

DPPH radikal süpürücü etki tayini için Kumarasamy ve arkadaşlarının yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 96-kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarının ilk sütununa sırasıyla 100'er µL metanol ve örnek aktarılmıştır. Çok-kanallı pipet aracılığıyla, eşit miktarda MeOH içinde 10 seri seyreltme yapılarak, 5 dakika boyunca vortekste karıştırılmıştır. DPPH stok çözeltisi 2 mg $DPPH^{\bullet}$'ın 25 mL MeOH'de çözünmesiyle son konsantrasyonu 80 $\mu g.mL^{-1}$ olacak şekilde hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 100 µL $DPPH^{\bullet}$ çözeltisinden eklenerek tepkime başlatılmış ve 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda bırakılmıştır butillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve Gallik asit aynı konsantrasyonda pozitif kontrol, $DPPH^{\bullet}$+MeOH negatif kontrol, sadece MeOH ise kör olarak aynı mikro plağa'e uygulanmıştır. UV absorbans 517 nm'de mikroplate spektrofotometre kullanılarak oda sıcaklığında okunmuştur. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma (*n*=8) olarak ifade edilmiş, istatistiksel değerlendirme ve hesaplamalarda Gen5 Data Analysis programı (BioTek) kullanılmıştır. % 50 inhibisyon konsantrasyonu değeri hesaplanmıştır % inhibisyon değeri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Kumarasamy ve ark., 2007).

$IC_{50} = [(A_0-A_1)/A_0]$ x100

A_0: kontrol absorbans

A_1: numune absorbans

$ABTS^{\bullet+}$ Radikal Süpürücü Etki

Standart TEAC metodu (Troloks'a eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi (Papandreou ve ark., 2006) kullanılarak gerçekleştirilen deney, $ABTS^{+}$ (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikalinin süpürülmesi ve vitamin E nin suda çözünen analoğu olan troloks ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. 7mM ABTS $^{\bullet+}$ ve 2.5 mM sodyum persülfat ($Na_2S_2O_8$) karışımının karanlıkta 12-16 saat bekletilmesi sonucu mavi yeşil renkli radikal oluşumu sağlanmış, bu çözeltinin 734 nm deki absorbansı 0,8-0,7 olacak şekilde absolü etanol ile seyreltilmiştir. 10 µL örnek ve 990 µL hazırlanan $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi karıştırılarak, 1dk 'lık aralıklarla 734 nm de absorbansı 30 dk süre ile ölçülmüştür. TEAC aktivite sonuçlarının bulunması için $ABTS^{+}$ radikali Trolox'un 2,5mM (miliMolar), 2 mM, 1.5 mM,

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

1mM, 0.5 mM ve 0.1mM lık konsantrasyonları kullanılarak % inhibisyon değerlerine bağlı olarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve denenen materyallerin % inhibisyonları kalibrasyon denklemine göre bulunmuştur. Troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi troloksun kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır (Papandreou ve ark., 2006)

YBSK Sonrası Türevlendirme ile ABTS$^{\bullet}$ Radikali Süpürme Gücü

$ABTS^{+}$ Radikalinin sulu ve organik çözücülerde rahatlıkla çözülmesi ve geniş pH aralığına dayanıklı olması, YBSK sistemlerinde kolon sonrası türevlendirmelere dayalı antioksidan etkinin ölçülmesinde tercih edilme sebebi olmuştur. Bu amaçla TEAK deneyinde hazırlanan $ABTS^{+}$ radikal çözeltisi kullanılmıştır. Reaktif 0.7ml/dk akış hızı ile reaksiyon bölümüne YBSK pompası aracılığı ile gönderilmiştir. 13m uzunluğunda ve 0.25 mm çaplı Yüksek bansınca dayanıklı bir reaksiyon kolonu bu amaçla kullanılmıştır. Bu reaksiyon kolonu YBSK kolon çıkışı ve $ABTS^{\bullet+}$ reaktif pompası arasına bir T bağlantısı ile yerleştirilmiştir. Tüp içerisindeki reaksiyon süresi 0.6 dakika olacak şekilde pompa akış hızı ayarlanmış ve türevlendirme sonrası ölçümler 734 nm de PDA dedektör kullanılarak alınmıştır ve etkili pikler negatif pikler olarak dedekte edilmiştir (M. Kosar ve ark., 2003) Birbirinden bağımsız olan 2. Kısımda ise etkili bileşikler kütle spektrometresi ile tayin edilmiştir.

. *YBSK çalışma şartları*:

Cihaz : Shimadzu Prominance sıvı kromatografisi sistemi

Dedektör : Shimadzu SPD-M10A*vp* PDA dedektör (200-500 nm arası)

Kolon : GL Science Intersil ODS 4,6x 250mm, 5µ

Sıcaklık : 40 ^{o}C

Akış hızı : 1 mL/dak

Hareketli faz : A) metanol/su/asetik asit (10:88:2, h/h/h)

:B) metanol/su/asetik asit (90:8:2, h/h/h)

C) metanol

Gradient akış :

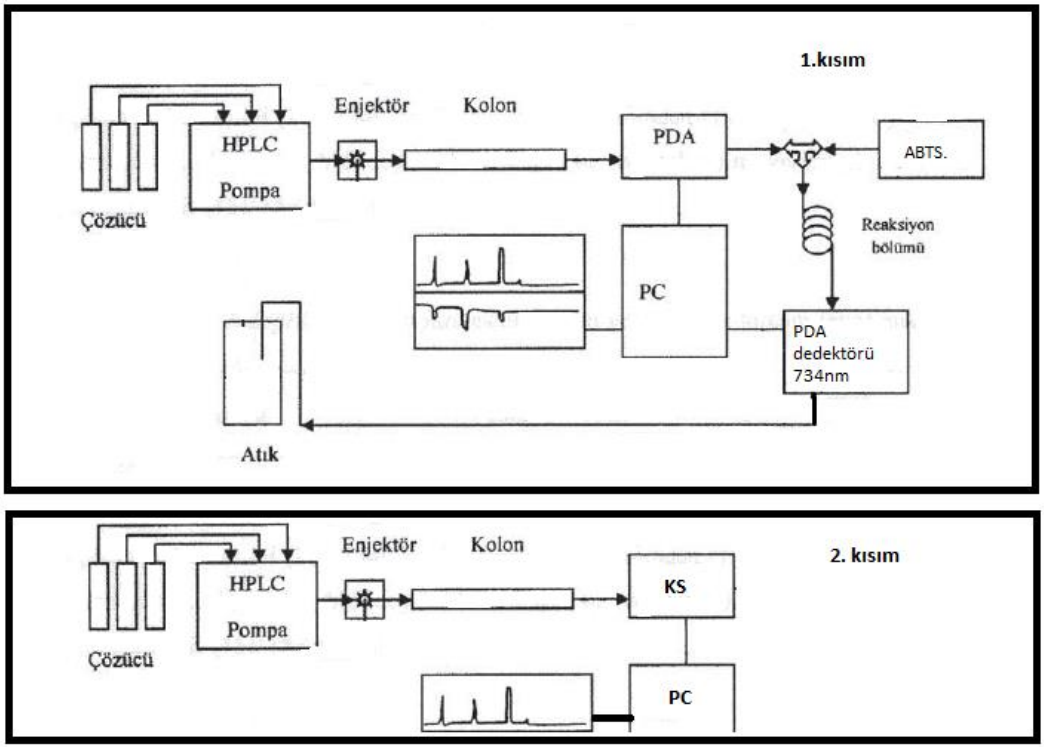
zaman (dak)	hareketli faz A (%)	hareketli faz B (%)	hareketli faz C (%)
0	15	85	0
15	30	70	0
18	40	60	0
30	40	60	0
35	0	100	0
37	0	85	15
48	0	70	30
50	15	85	0

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Linoleik asit peroksidasyonunu inhibe edici etki tayini

***Tiyosiyanat metodu*:** Lipit oksidasyonunun inhibe edilmesinin *in vitro* olarak belirlenmesi amacıyla bu yöntem kullanılmıştır (Llorach ve ark., 2002). Reaktifler taze olarak hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı (2.525 mL) etanolde çözünmüş linoleik asit (% 2.5) (0.25 mL), 50 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7 (1 mL), etanol (0.25 mL), distile su (0.9 mL), örnek (0.1 mL) ve hızlandırıcı olarak 1.8 mM AAPH (25 µL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı ağzı kapalı tüplere konup karıştırılmış ve 50 ºC lik etüvde 10 saat inkübe edilmiştir. Her 2 saatte bir 30 µL reaksiyon karışımı 2910 µL etanol içerisine alınmış ve 30 µL amonyum tiyosiyanat (3.86 M) ilave edilmiştir. Daha sonra 30 µL demir (II) klorür ilave edilip 3 dakika sonra 500 nm de absorbans okunmuştur. Spektrofotometre numune içermeyen reaktif karışımına karşı sıfırlanmıştır. Pozitif standart olarak BHT ve askorbik asit kullanılmıştır. İnhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Kontrol absorbansı olarak 10 saat sonundaki absorbans kullanılmış, değerler dört paralel deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100-(Abs_{örnek} - Abs_{kontrol} \times 100)$$



Şekil 10. YBSK sonrası türevlendirme şeması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Tiyobarbitürik Asit (TBA) Metodu: Demir (II) tiyosiyanat metodunda kullanılan reaksiyon karışımı 10 saat sonunda oluşan MDA miktarının belirlenmesi amacıyla TBA deneyinde kullanılmıştır (Llorach ve ark., 2002).1 mL reaksiyon karışımı 1 mL trikloroasetik asit (TCA, % 2.8) ve 1 mL tiyobarbitürik asit (TBA, % 1) ile karıştırılıp ağzı kapatılarak 90 ºC lik su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir. 10 dakika buz banyosunda soğutulduktan sonra 2 mL *n*-butanol ilave edilip vorteks ile karıştırılmıştır. 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildikten sonra absorbans 532 nm de *n*-butanol'e karşı okunmuştur. Değerler dört deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

β-Karoten/Linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini

Ekstrelerin antioksidan aktivitesi β-karoten soldurma deneyine göre yapılmıştır (Oomah ve ark., 1996; Velioglu ve ark., 1998). Kısaca, 1 mL β-karoten (0.2 mg/ml kloroform içerisinde) içerisinde linoleik asit (40 mg) ve Tween 20 (400 mg) bulunan çözeltiye ilave edilmiştir. Kloroform azot altında yoğunlaştırılmıştır. 50 ml distile su ilave edilmiş ve hızla çalkalanmıştır. Kontrol, örnek ve standart konulmadan aynı prosedür ile hazırlanmıştır. Kontrol ve örneklerin şahitleri ise β-karotensiz olarak hazırlanmıştır. Tüm numunelerin örnekleri 470 nm de spektrofotometrede ölçülmüştür. Sonra örnekler termal otooksidasyon için 50 °C de 105 dakika su banyosunda bekletilmiştir. β -Karoten'in solma derecesi 15 dakikalık periyotlarla örnek alınarak izlenmiştir. Antioksidan aktivite sonucu üç deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

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

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

BULGULAR

Ekstrelerin Hazırlanışı, Spektrofotometrik ve Kromatografik Bileşik Analizleri

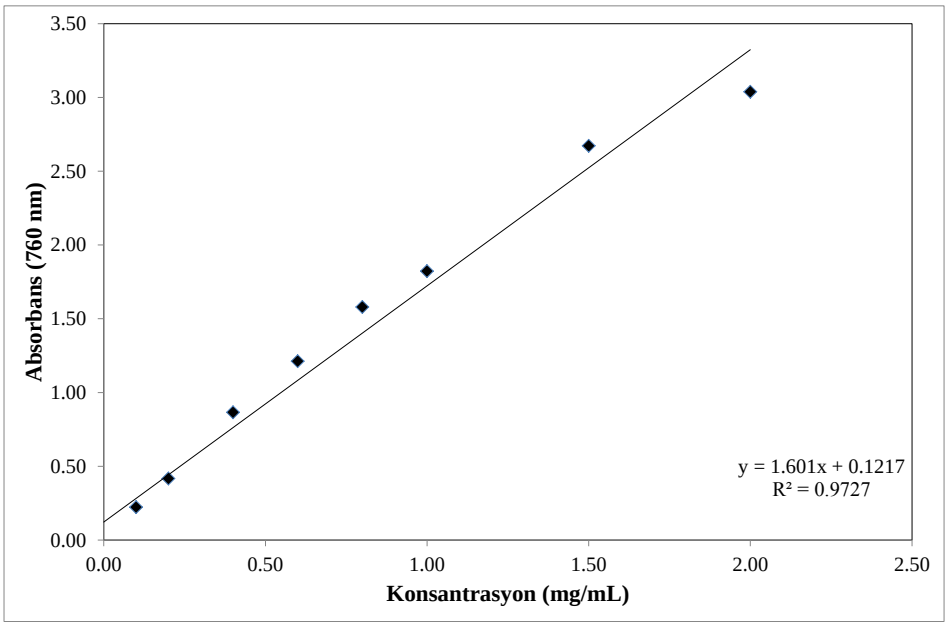
Sulu metanol (%70) ve sulu ekstre hekzan fraksiyonları hariç tüm ekstreler hem antioksidan aktivite analizlerinde hem de kompozisyon analizlerinde kullanılmıştır. Elde edilen ekstre verimleri Çizelge 7'de verilmiştir. Çizelge 7'de görüldüğü gibi %70 metanol ekstresi en yüksek verimde elde edilmiştir. Hekzan ekstrelerinde verim düşük bulunmuştur. *Mentha spicata* ssp *spicata* örneğinde toplam ekstre verimi % 16.3 olarak bulunurken, bu oran *Mentha spicata* ssp *tomentosa* örneğinde % 18.8 olarak bulunmuştur.

Fraksiyonlamalar sonucunda elde edilen ekstrelerde ise sulu ekstrenin fraksiyonlanması sonrası elde edilen sulu kısım en yüksek verimi vermiştir.

Çizelge 7. *Mentha spicata* alttürlerinden elde edilen ekstrelerin % verimleri

Kodu *	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11
S	2.01	1.93	12.42	5.14	12.10	0.21	2.31	32.53	0.53	0.91	43.24
T	2.70	3.20	12.94	9.82	12.04	0.32	1.12	24.80	0.41	1.52	51.10

*(S) *Mentha spicata* ssp. *spicata* (T) *M.spicata* ssp. *tomentosa*, (E1) hekzan; (E2), etil asetat; (E3), % 70 metanol; (E4), sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E6) % 70 metanol hekzan fraksiyonu; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E9) sulu ekstre hekzan fraksiyonu; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısmına ait ekstrelerin bitkide % miktarları



Şekil 11. Toplam fenol miktar tayininde kullanılan gallik asite ait kalibrasyon grafiği.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 8. *Mentha* ekstrelerinin toplam fenol ve toplam flavonoit miktarları

Ekstre	Toplam fenol[a]		Toplam flavonoit[b]	
	S	T	S	T
(E1)*	78±4	27±3	34±0.7	22±1
(E2)	116±5	78±2	60±3	36±2
(E3)	202.2±4	226±7	32±2	30±2
(E4)	153±5	143±2	21±0.5	25±1
(E5)	261±3	273±8	41±2	38±2
(E6)	-	-	-	-
(E7)	118±1	137±7	50±1	51±1
(E8)	194±1	229±2	31±2	37±2
(E9)	-	-	-	-
(E10)	113±1	125±1	24±1	27±2
(E11)	160±1	187±1	28±1	31±1

[a] mg_{GAE}/g_{ekstre}; [b] mg_{RE}/g_{ekstre};

*(S) *Mentha spicata* ssp. *spicata* (T) *M.spicata* ssp. *tomentosa*, (E1) hekzan; (E2), etil asetat; (E3), % 70 metanol; (E4), sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E6) % 70 metanol hekzan fraksiyonu; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E9) sulu ekstre hekzan fraksiyonu; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısmına ait ekstrelerin

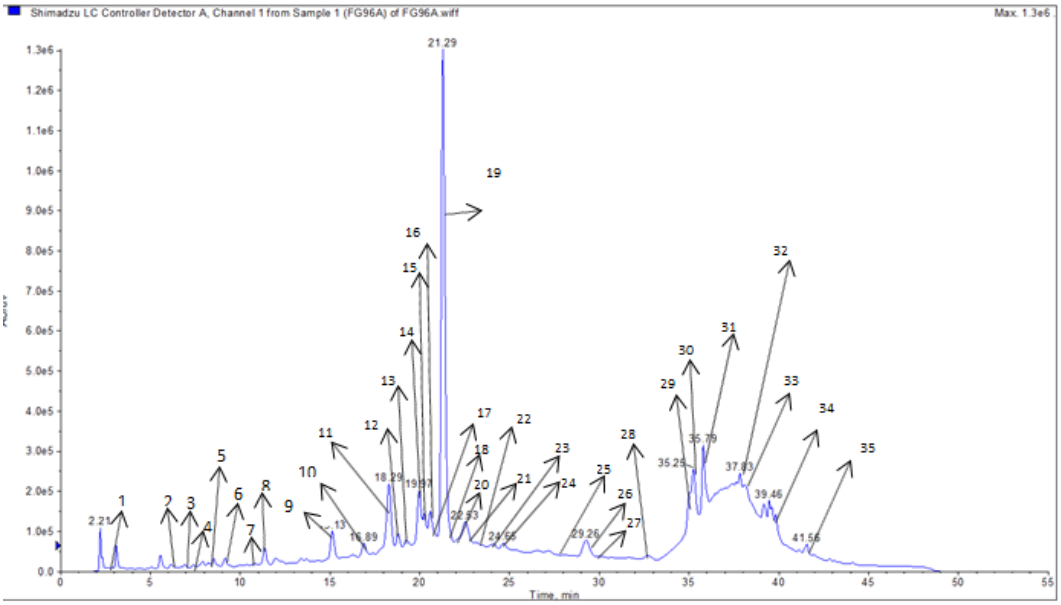
Ekstrelerin YBSK sistemi ile yapılan analizlerinde KS dedektör kullanılmış ve miktar tayinleri Moleküler iyon pikleri ve temel pikler üzerinden yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge.10'da verilmiştir. Ekstrelerin içerisindeki tanımlanan bileşiklerin miktar tayinleri için standart maddelerden hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılmış, sonuçlar Çizelge 9 da verilmiştir.

Ekstrelerin YBSK analizleri sonuçları Çizelge 10'da verilmiştir. Asit hidroliz ile hazırlanan ekstrenin fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu bulunmuştur. Hekzan ekstresi dışında tüm ekstrelerde ana bileşik olarak rozmarinik asit tespit edilmiştir. Naringenin rutinozit, salvianolik asit B, kafeik asit ve hesperidin ise ekstrelerin diğer önemli bileşikleri olarak bulunmuştur.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 9. YBSK analizlerinde kullanılan standartlara ait kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

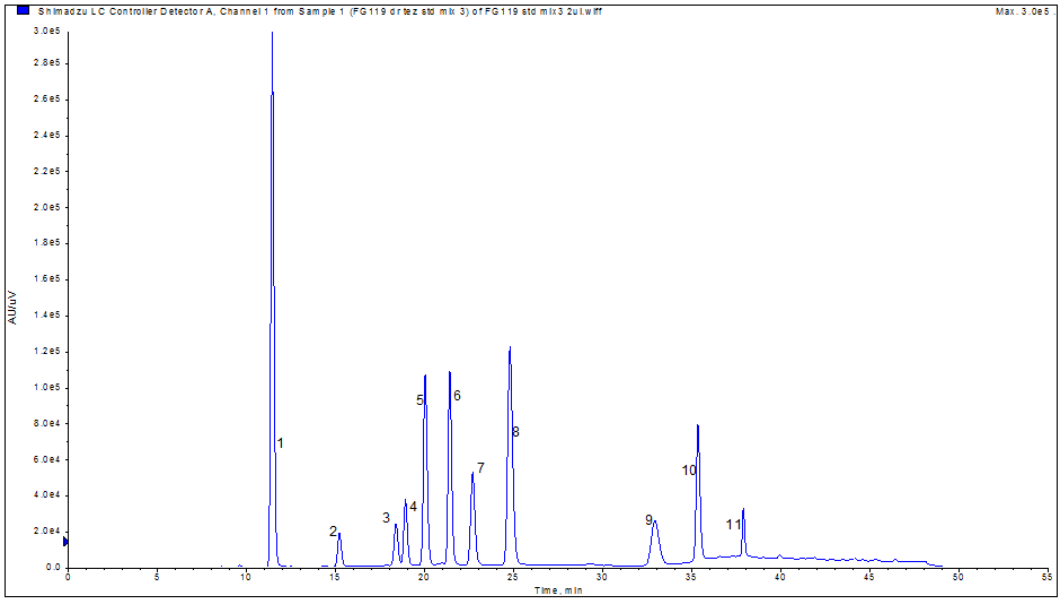
Bileşik	Kalibrasyon denklemi [y = ax + b]	Korelasyon katsayısı [r^2]
Apigenin	8.31e+004x+929	0.9937
Kafeik asit	5.06e+004x+5220	0.9993
Eriositrin	7.98e+003x+4510	0.9974
Narirutin	4.46e+003x+784	0.9939
Rozmarinik asit	3.99e+004x+1890	0.9985
Salvianolik asit b	1.87e+004x+2370	0.9959
Naringenin	3.55e+004x+2040	0.9991
Luteolin	1.36e+005x+11000	0.9996
Hesperidin	1.08e+003x+1030	0.9993
Eriodiktiyol	1.1e+005x+6950	0.9933



1: stakioz, 2: 3-kafeoilkinik asit, 3: protokateşik asit hekzozit, 4: kafeik asit türevi, 5: bilinmeyen *m/z*409, 6: 5-kafeoilkinik asit 7:ikarisit B_5, 8: kafeik asit , 9: eriositrin 10: salvianolik asit E, 11: naringenin rutinozit, 12: luteolin rutinozit, 13: luteolin 7 glikozit, 14: hesperidin, 15:hesperitin glukozit, 16:luteolin glukronid, 17: salvianolik asit C türevi, 18: izosalvianolik asit A, 19: rozmarinik asit, 20: apigenin rutinozit, 21: ikarisit glukozit, 22: salvianolik asit B, 23: diosmin, 24: eriodiktiyol, 25: metil rozmarinat, 26: izosakuranetin rutinozit, 27: luteolin glukuronit, 28:naringenin, 29: salvianolk asit C türevi, 30: luteolin, 31: bilinmeyen salvinolik asit türevi (*m/z*713-533-335), 32: apigenin, 33: diosmetin, 34: izosakuranetin, 35: genkvanin

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Şekil 12: % 70 Metanol ekstresinin diklorometan fraksiyonunun, YBSK-KS/KS ile tanımlaması yapılan bileşikleri



Şekil 13. Miktar tayininde kullanılan standartlara ait örnek kromatogram: 1: kafeik asit, 2: eriositrin, 3:narirutin, 4:luteolin 7 glikozit, 5:hesperidin, 6:rozmarinik asit, 7: salvianolik asit B, 8: eriodiktiyol, 9: naringenin, 10: luteolin, 11: apigenin

YBSK-KS/KS analizi sonucunda standart kullanılmayan 72 tane bileşiğin yapısı kaynak bilgileri ışığında spektrumlar yorumlanarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Şekil 12 de örnek bir kromatogram üzerinde ayrımlar ve Şekil 13'te standartlara ait karışımın kromatogramı verilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 10. Ekstrelerin YBSK analiz sonuçları

Mentha spicata ssp. *spicata* (S)								
mg/g ext	**E2**	**E3**	**E7**	**E8**	**E4**	**E10**	**E11**	**E5**
apigenin	0.36 ± 0.01	0.18 ± 0.05	1.91 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.04 ± 0.00	1.18 ± 0.09	0.11 ± 0.00	0.36 ± 0.00
kafeik asit	0.46 ± 0.02	1.17 ± 0.03	0.60 ± 0.03	1.26 ± 0.03	0.99 ± 0.13	0.99 ± 0.10	0.56 ± 0.05	4.23 ± 0.15
eriositrin	0.93 ± 0.04	2.85 ± 0.06	1.64 ± 0.04	4.53 ± 0.14	1.71 ± 0.10	1.96 ± 0.05	2.39 ± 0.09	2.89 ± 0.01
narirutin	1.641 ± 0.01	3.15 ± 0.12	0.45 ± 0.08	5.19 ± 0.62	1.10 ± 0.07	1.58 ± 0.02	1.26 ± 0.14	0.21 ± 0.01
rozmarinik asit	18.26 ± 0.11	61.91 ± 0.70	4.36 ± 0.01	74.74 ± 0.11	38.63 ± 0.34	18.27 ± 0.66	35.50 ± 0.54	19.79 ± 1.13
salvianolik asit b	0.82 ± 0.00	5.67 ± 0.27	0.93 ± 0.04	5.88 ± 0.09	1.82 ± 0.05	2.05 ± 0.15	3.74 ± 0.23	2.79 ± 0.12
naringenin	1.67 ± 0.10	3.57 ± 0.03	12.25 ± 0.03	2.23 ± 0.17	-	7.5 ± 0.20	3.59 ± 0.02	5.40 ± 0.01
luteolin	0.38 ± 0.01	-	1.458 ± 0.04	1.22 ± 0.03	0.93 ± 0.01	-	1.59 ± 0.02	1.92 ± 0.08
hesperidin	3.48 ± 0.10	4.33 ± 0.01	0.89 ± 0.03	5.91 ± 0.01	4.01 ± 0.01	1.86 ± 0.07	3.55 ± 0.15	0.21 ± 0.00
eriodiktiyol	0.47 ± 0.01	1.95 ± 0.06	2.89 ± 0.02	2.04 ± 0.01	1.71 ± 0.01	-	-	3.07 ± 0.01

(E1) hekzan; (E2), etil asetat; (E3), % 70 metanol; (E4), sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E6) % 70 metanol hekzan fraksiyonu; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E9) sulu ekstre hekzan fraksiyonu; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısmına ait ekstrelerin

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 10 (devam). Ekstrelerin YBSK analiz sonuçları

	Mentha spicata ssp. *tomentosa* (T)							
mg/g ext	**E2**	**E3**	**E7**	**E8**	**E4**	**E10**	**E11**	**E5**
apigenin	0.24 ± 0.01	0.15 ± 0.01	1.51 ± 0.13	0.39 ± 0.00	0.78 ± 0.01	2.64 ± 0.03	1.36± 0.11	0.77 ± 0.02
kafeik asit	0.25 ± 0.02	1.56 ± 0.01	0.56 ± 0.01	1.47 ± 0.04	1.12 ± 0.03	0.25± 0.02	2.18± 0.02	4.52 ± 0.04
eriositrin	0.35 ± 0.01	1.18 ± 0.01	1.46 ± 0.01	1.44 ± 0.01	2.217± 0.11	0.88 ± 0.02	1.32± 0.01	-
narirutin	0.10 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.31 ± 0.04	0.19± 0.01	0.07± 0.00	0.12 ± 0.01	-
rozmarinik asit	12.86 ± 0.01	77.39 ± 0.18	1.28 ± 0.03	73.70 ± 1.46	42.19 ± 0.34	0.44± 0.01	27.05± 0.53	15.28 ± 0.07
salvianolik asit b	0.79 ± 0.11	9.62 ± 0.05	0.57 ± 0.01	8.48 ± 0.17	3.99 ± 0.18	0.27 ± 0.00	3.91± 0.40	-
naringenin	0.87 ± 0.20	1.91 ± 0.01	3.08 ± 0.02	1.74 ± 0.01	2.06 ± 0.01	-	2.49 ± 0.08	2.56 ± 0.04
luteolin	0.35 ± 0.01	0.82 ± 0.00	1.19 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.21 ± 0.01	-	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.02
hesperidin	1.01 ± 0.02	1.13 ± 0.04	0.09 ± 0.01	1.1 ± 0.11	0.84± 0.01	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.02	-
eriodiktiyol	0.35 ± 0.00	1.55 ± 0.02	2.45 ± 0.03	1.43 ± 0.01	1.59± 0.00	0.92 ± 0.01	1.33 ± 0.03	1.37 ±0.07

(E1) hekzan; (E2), etil asetat; (E3), % 70 metanol; (E4), sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E6) % 70 metanol hekzan fraksiyonu; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E9) sulu ekstre hekzan fraksiyonu; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısmına ait ekstrelerin

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 11. YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlaması yapılan bileşikler

Madde no	MA	RT	(M-H)	Temel Pik	Diğer iyonlar	Muhtemel yapı	Bulunduğu ekstreler
				Hidroksisinnamik asit türevleri			
1.	354	6.0	353	191	179, 135	3-kafeoilkinik asit *	E8(ST),E4(S,T) E3(ST)
2.	316	6.4	315	108, 109	152, 153	protokateşik asit hekzozit	E8(ST),E4(S),E2(ST), E3(ST)
3.	476	7.4	475	161	179, 135	kafeik asit türevi	E8(ST), E4(T),E3(ST)
4.	338	8.1	337	163	191,119	3-*p*-kumaroilkinik asit	E4(T)
5.	354	9	353	191	173, 135	5-kafeoilkinik asit	E4(S,T),E8(S),E5(S)
6.	354	9.2	353	173	191, 135	4-kafeoilkinik asit	E8(T),E2(S,T),E3 (ST),
7.	180	11.2	179	135		kafeik asit*	E2(ST) E3(ST) E4(ST) E7(ST) E8(ST) E11(ST) E10(ST) E5(ST)
8.	338	12	337	173	163	4-*p*-kumaroilkinik asit	E3(ST)
9.	368	12.1	367	161	135	feruloilkinik asit izomeri	E5(S)
10.	368	14.2	367	135	179	feruoilkinik asit izomeri	E5(S)
11.	260	18.7	259	135	179	kafeik asit sülfat tuzu	E3(T),E8(T)
12.	488	22.4	487	323	161,179, 221, 133, 119	kafeik asit türevi	E4(T)
13.	354	22.6	353	321	179, 161, 133, 135	kafeoilkinik asit türevi	E5(T)
14.	508	24	507	161	299, 284, 133	kafeik asit türevi	E2(S), E5(S),E3(S)
15.	324	24	323	179	161 135 207	kafeoil glukoz	E5(T)
16.	208	29	207	135	179, 161, 133	etil kafeat	E5(ST)
				Salvianolik asit türevleri			
17.	396	5.5	395	197	179, 135	danşensu dimer	E5(ST)
18.	212	7.1	211	167	123, 93	metil danşensu	E5(S)
19.	212	8.8	211	179	151, 123	metil danşensu	E5(ST)
20.	226	12.8	225	123	179	danşensu dimetil eter	E5(ST)
21.	718	16.9	717	475	519, 339, 321, 243, 229, 365, 431, 409	salvianolik asit E	E3(ST), E8(ST), E2(S), E4(T), E11(T), E7(S)
22.	552	18	551	353	321,519, 293	metil litospermat	E5(T)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 11 (devamı) YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlaması yapılan bileşikler

23.	716	20.5	715	285	553, 535, 465, 311, 241, 179, 135	salvianolik asit C türevi	E8(ST), E3(ST)
24.	494	21	493	295	313, 185, 267, 179, 135	izosalvianolik asit A	E8(ST), E4(S), E3(ST)
25.	718	22.6	717	321	537, 519, 339, 295, 279	salvianolik asit B *	E2(ST), E3(ST) E4(ST), E7(ST) E8(ST), E11(ST) E10(ST)
26.	520	24.1	519	339	321, 295, 267, 251	salvianolik asit B türevi	E4(S)
27.	552	25	551	353	321, 519, 293	metil litospermat	E5(S), E3(T)
28.	492	28.4	491	311	267, 179, 135	salvianolik asit C	E4(T), E3(T)
29.	552	31	551	193	161, 135, 359, 133, 179, 519, 221,	metil litospermat	E5(S)
30.	494	32.4	493	161	359, 197, 179, 135	salvianolik asit A	E8(T), E4(ST), E3(T)
31.	566	34	565	353	217, 327, 293, 243, 321	dimetil litospermat	E5(ST)
32.	716	35	715	293	535, 517, 491, 337, 311, 267, 197, 179, 135	salvianolik asit C türevi	E8(ST), E3(ST)
33.	746	35.4	745	533	321, 339, 295, 507, 203, 371, 277	dimetil litospermat B	E5(ST)
34.	314	36.7	313	161	133	salvianolik asit F	E3(TS)
					Flavonoit glikozitler		
35.	594	12.1	593	353	473, 395, 383, 339, 297	apigenin-6,8-C diglukozit	E8(T), E4(T)
36.	450	14.8	449	287	151, 135	eriodiktiyol 7 glikozit*	E5(S)
37.	596	15.3	595	287	151	eriositrin*	E2(ST), E3(ST), E4(ST), E7(ST) E8(ST), E11(ST) E10(ST), E5(ST)
38.	580	18.4	579	271	417, 313, 181, 151	naringenin 7 rutinozit	E2(S), E3(ST), E4(S), E7(S), E8(S), E10(S), E11(S)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 11 (devamı) YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlaması yapılan bileşikler

39.	594	18.9	593	285	327, 447, 285, 133, 256, 199, 175, 151, 133	luteolin rutinozit	E2(ST), E8(ST), E4(S), E3(ST)
40.	448	19.2	447	285	327, 285, 255, 226, 211, 199, 133	luteolin 7 glukozit *	E2(ST), E3(ST) E4(ST), E7(ST) E8(ST), E11(ST) E10(ST), E5(ST)
41.	610	19.9	609	301	343, 325, 286, 242, 151, 134, 125	hesperidin*	E2(ST), E3(ST) E4(ST), E7(ST) E8(ST), E11(ST) E10(ST), E5(ST)
42.	464	20.2	463	300/ 301	287, 271, 151	hesperetin glukozit	E8(ST), E5(S), E3(T)
43.	578	21.7	577	269	269, 225, 183, 159, 117, 107	apigenin rutinosit *	E2(ST), E8(ST), E3(ST)
44.	432	22.4	431	268	269, 238, 211, 183, 171, 117, 107	apigenin glukozit*	E2(ST), E8(ST), E5(ST)
45.	608	22.8	607	299	284	diosmetin rutinozit (diosmin)	E3(S), E8(S), E2(S)
46.	594	29.4	593	285	351, 327, 309, 285, 270, 243, 226, 164, 151	izosakuranetin-7-O-neohesperosit, (ponsirin)	E2(ST), E4(ST), E3(T)
					Flavonoit glukronitler		
47.	462	20.4	461	285	357, 327, 299, 161, 133	luteolin glukuronit veya molekül ağırlığı 300 olan bir flavanoit ile (diosmetin, kamferit, krisoeriol) kafeik asit birleşmesi	E2(S), E8(ST), E4 (ST), E3(ST)
48.	476	26.7	475	284	299, 256	diosmetin glukuronit	E5(ST)
49.	446	23,7	445	269	117, 107, 113	apigenin glukuronit	E11(T)
50.	462	30.1	461	285	175, 153, 133	luteolin glukuronit	E8(S)
51.	624	36.3	623	285	447, 461, 323, 299, 221, 179, 161, 135	luteolin glukuronit ve hekzoz birleşmesi veya molekül ağırlığı 300 olan bir flavon ile (diosmetin,kamferit, krisoeriol vs) hekzoz birleşmesi	E2(S), E8(ST), E4 (ST), E3(ST)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 11 (devamı) YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlaması yapılan bileşikler

					Flavonoit asetilglikozitler		
52.	490	22.5	489	285	447, 429	luteolin asetilglukozit	E5(S)
53.	490	31.5	489	285	175, 327	izosakuranetin asetilglukozit	E5(S)
54.	474	36.3	473	268	478, 268, 239, 211, 167, 117, 183	apigenin7-*O* asetilglukozit olabilir	E5(ST)
					Rozmarinik asit türevleri		
55.	720	17.9	719	161	359, 197, 179, 135	sagerinik asit	E3(T), E4(T)
56.	360	21.3	359	161	197, 179, 135	rozmarinik asit*	E2(ST), E3(ST) E4(ST), E7(ST) E8(ST), E11(T) E10(ST), E5(T)
57.	374	28.1	373	179	135, 161, 107	metil rozmarinat	E2(S),E4(T),E5(ST),E3 (S)
58.	568	23	567	373	193, 179, 135	metil rozmarinat ve kinik asit esterleşmesi olabilir	E5(T), E2(S)
59.	440	35	439	161	359, 259, 179, 197, 161, 135	rozmarinik asit sülfat tuzu olabilir	E8(T), E4(T), E3(T)
60.	388	35	387	179	135	dimetil rozmarinat	E5(ST)
					Flavonoit aglikonlar		
61.	302	35	301	301	286, 257, 242, 199, 151, 108	hesperetin	E4(S), E8(S)
62.	306	19.5	305	225	147, 97	12-hidroksijasmonat sülfat	E8(ST), E2(S), E4(ST), E3(ST)
63.	288	24.7	287	135	151, 107	eriodiktiyol*	E8(S), E3(S)
64.	272	33	271	271	177, 151, 119, 107	naringenin *	E2(ST), E3(ST)E4(ST), E7 E8(ST), E11(T) E10(ST), E5(T)
65.	300	34.7	299	284	255, 227, 186, 137	Molekül ağırlığı 300 olan metoksiflavanoit (diosmetin, kamferit, pratensein, farresol vs)	E5(ST), E2(T),
66.	638	35.1	637	283	268	asetatin veya genkvanin türevi	E8(T)
67.	286	35.3	285	133	241, 199, 175, 151, 133, 107	luteolin *	E2(S), E4(ST), E5(S), E8(S), E3(T)
68.	284	36.0	283	268	239,167	asesatin	E8(T), E5(ST), E3(ST)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 11 (devamı) YBSK-KS/KS analizi sonucu tanımlaması yapılan bileşikler

69.	410	36.3	409	329	314, 299	trisin sülfat veya hidroksi -trimetoksi flavon türevi sülfat tuzu	E8(T), E3(T)
70.	270	37.0	269	117	225, 151, 107	apigenin*	E2(ST), E4(ST), E5(T), E3(S)
71.	330	37.2	329	299	314, 271	330amu'luk hidroksi -dimetoksi flavon örn: timusin	E2(ST), E5(S)
72.	360	37.4	359	344	329	timonin (5,6,4' trihidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavon) veya bir başka trihidroksi-trimetoksi flavon	E2(ST), E5(ST), E3(S)
73.	346	33.5	345	330	315, 215 187	spikatosit B veya tetrahidroksi-dimetoksi flavon türevi olabilir	E2(ST)
74.	300	38.3	299	284	255, 227, 211, 200, 151, 134	diosmetin veya 300amu diğermetoksi flavonoitler: krisoeriol,kamferit, hispidulin, geraldol, pratensein vs	E2(S), E8(ST), E4(ST), E5(S), E3(ST)
75.	360	39.2	359	329	344, 314, 286, 174, 133	sideritiflavon (5,3,4'-trihidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavon) veya bir başka trihidroksi-trimetoksiflavon (mentoköbanon, timonin)	E2(ST), E5(ST)
76.	286	40.0	285	164	136, 151, 243, 270	Molekül ağırlığı 286 olan O-Metoksi flavanoit: izo sakuranetin veya sakuranetin	E2(S), E4(T), E5(T)
77.	284	41.6	283	268	211, 195, 117	genkvanin	E2(ST), E8(ST), E4(T), E5(T), E3(ST)
					Megastigman glikozitler		
78.	388	11	387	207	341, 163, 101	ikarisit B_5	E8(ST), E2(ST), E4 (ST), E3(ST)
79.	550	22.5	549	387	489, 207, 179, 161, 135	İkarisit B_5 glukopiranosit	E8(ST), E3(ST)
					Karbonhidratlar		
80.	666	2.4	665	503	545, 341, 413, 293, 203	stakioz	E2(ST), E3(ST), 8(ST), E4(ST), E11(S)

*(S) *Mentha spicata* ssp. *spicata ;* (T) *M. spicata ssp. tomentosa*, (E2) etilasetat; (E3) %70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) %70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) %70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu faza ait ekstreler.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

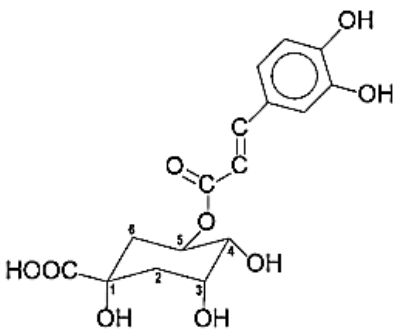
Tabloda verilen moleküllerden bazıları standart kullanılarak belirlenmiştir (*). Diğer tanımlamalar kaynak bilgileri ışığında spektrumlar yorumlanarak yapılmıştır.

Tablodaki bütün maddelerin Sinyal/Gürültü oranı 3 den büyüktür ve tanımlama sırasında izlenen yol her molekül için tablo sonrasında detaylı olarak anlatılmıştır. Burada verilen sonuçların sadece kütle spektrumu sonuçları olduğunu ve standart kullanılmayan maddeler için kesin bir isimlendirmenin ancak diğer spektroskobik tekniklerinde kullanılarak yapılması gerekliliği kabul edilmiştir.

YBSK-KS/KS Analizi Sonucu Elde Edilen Spektrumların Değerlendirilmeleri

Hidroksisinnamik asit türevleri

Hidroksisinnamik asit türevleri bitkilerde çok yaygın olarak bulunurlar. En çok bilinenleri 3,4-dihidroksisinnamik asit (kafeik asit), 3-metoksi-4-hidroksisinnamik asit (ferulik asit), 4-hidroksisinnamik asit (*p*-kumarik asit) olarak sıralanabilir. Çoğu zaman başka asitlerle konjugasyon yapabilirler. Konjugasyonu genellikle kinik asitler ile yaparlar. 3-kafeoilkinik asit (klorojenik asit) en çok bilinen konjugasyon şeklidir. Kafeik asitlerin kinik asitlerle olan esterleri kinik asite bağlı 3, 4 veya 5 numaralı karbondaki OH grupları üzerinden gerçekleşmekte ve bu esterler 3-kafeoilkinik asit, 4-kafeoilkinik asit veya 5-kafeoilkinik asit olarak adlandırılmaktadır ve *m/z*353[M-H] moleküler iyon pikine sahiptirler. Kafeik asitlerin, ferulik asitlerin ve kumarik asitlerin kinik asitler ile konjugasyonu sonucu oluşan moleküllerin kütle spektrumları ile ilgili olarak Clifford ve arkadaşlarının yapmış oldukları ayrıntılı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların kafeoilkinik asitler için olan kısmını özetlemek gerekirse: 3 ve 5 kafeoilkinik asitlerde temel pik 191 (kinik asit) olarak gözlenirken 4-kafeoilkinik asitlerde temel pik *m/z*173 olarak gözlenmektedir. Diğer bir ayrıntı ise *m/z* 179 pikinin bağıl yoğunludur. Bu pik 5-kafeoilkinik asitlerde hiç görülmezken (veya çok az gözükürken) 3-kafeoilkinik asitlerde belirgin olarak görülmektedir (Clifford ve ark., 2003).



Şekil 14. Hidroksisinnamik asitlerin isimlendirilmesi (5-kafeoilkinik asit) (Clifford, 1999)

Aynı çalışmaya göre benzer bir sınıflandırma ferulik asitlerin kinik asitler ile olan konjugasyonları sonucu oluşan *m/z* 367[M-H] moleküler iyon pikine sahip feruloilkinik asitler için de kullanılabilir. 3-Feruloilkinik asitler de temel pik *m/z*

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

193 olarak gözlenirken, 4-feruloilkinik asitlerde temel pik *m/z* 173 olarak, 5-feruloilkinik asitlerde ise temel pik *m/z* 191 olarak gözlenmektedir.

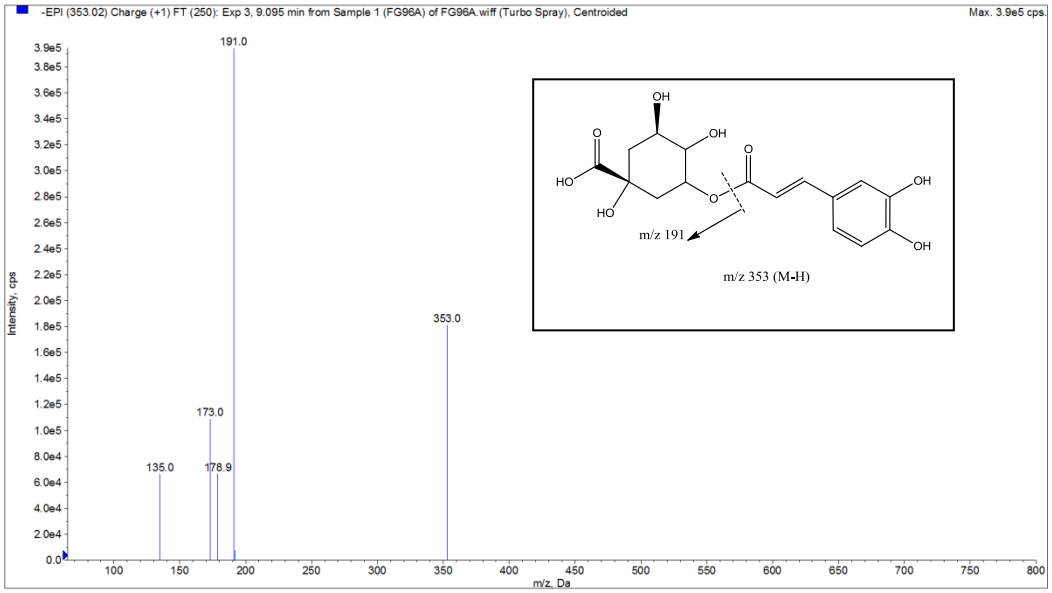
Kumarik asitlerin kinik asitlerle yaptıkları konjugasyon sonucu oluşan *m/z* 337 [M-H] moleküler iyon pikine sahip kumaroilkinik asitler içinde durum benzerdir. 3-kumaroilkinik asitlerde temel pik *m/z* 163 iken 4-kumaroilkinik asitlerde temel pik *m/z* 173, 5-kumaroilkinik asitlerde ise temel pik *m/z* 191 olarak gözlenmektedir (Clifford ve ark., 2003).

Bu gruptaki maddelerin tanımlamalarında bu kurallar göz önünde bulundurulmuştur.

Kafeoilkinik asit türevleri:

m/z 353 [M-H] moleküler iyon piki bitkide 3 farklı tutunma zamanında gözlenmiştir.

1 numaralı madde: 5. dakikada kolonu terk eden, *m/z* 353[M-H] moleküler iyon pikinin yanında bağıl yoğunluğu en çok olarak görülen *m/z* 191(kinik asit) temel pikli spektrum üzerinde yapılan incelemeler sonucu moleküler iyon piki ve temel pik arasındaki farkı oluşturan -162 amu'luk fark ilk bakışta bir hekzoz (glukoz veya galaktoz) kopmasını çağrıştırsada spektrum dikkatli incelendiğinde 179 ve 135 pikleri de görülmektedir. Bu pikler sırasıyla kafeik asit ve kafeik asit–CO_2 pikleridir. Bu bilgiler ışığında 5. dakika da kolonu terk eden madde 3-kafeoilkinik asit (klorojenik asit) olarak tanımlanmıştır (Clifford ve ark., 2003). (Şekil 15).



Şekil 15. 3-Kafeoilkinik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması

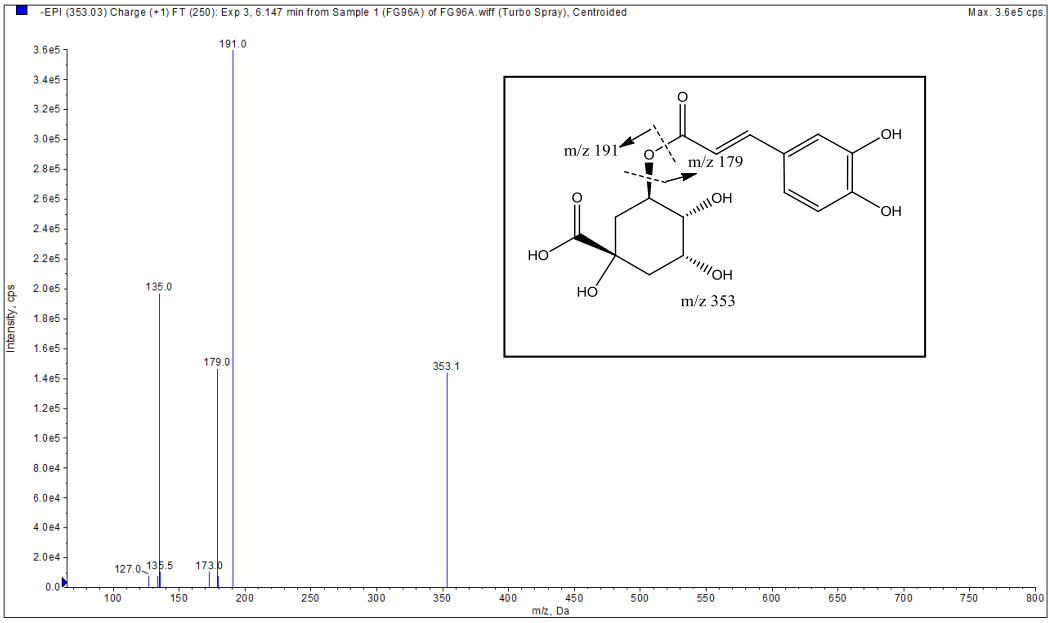
5 numaralı madde: 9. dakika da kolonu terk eden ve *m/z* 191 temel pikinin yanında *m/z* 173 ve *m/z* 135 parçalanmaları da gözlenen madde 5-kafeoilkinik asit olarak adlandırılmıştır (Şekil 16) (Clifford ve ark., 2003).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

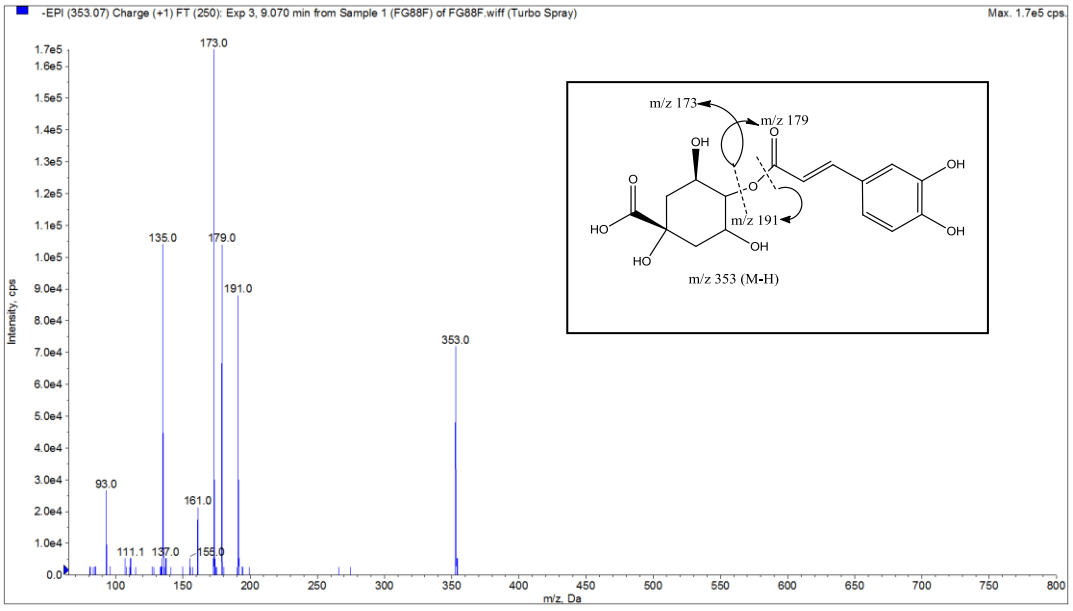
6 numaralı madde: 9.2. dakika da kolonu terk eden ve *m/z* 173 temel pikinin yanında 191 ve 135 parçalanmaları da gösteren madde 4-kafeoilkinik asit olarak adlandırılmıştır (Şekil 17) (Clifford ve ark., 2003).

Kumaroilkinik asit türevleri

m/z 337[M-H] moleküler iyon pikine sahip maddeye 2 farklı tutunma zamanında rastlanmıştır. Tanımlanmalarında kullanılan metot yukarıdan bahsedildiği için bu kısımda tekrar edilmemiştir.



Şekil 16. 5-Kafeoilkinik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması

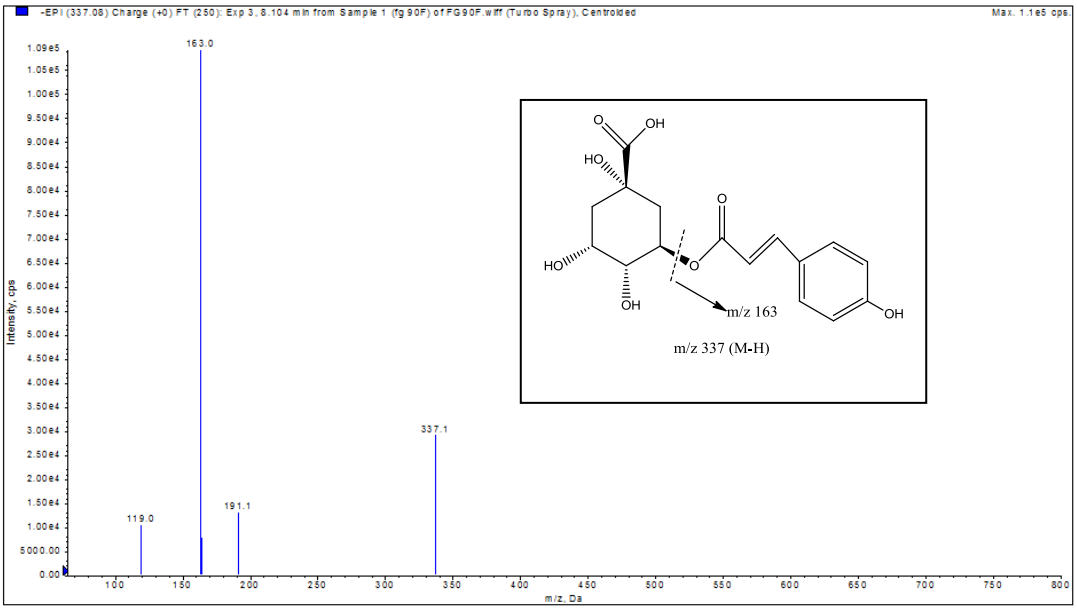


Şekil 17. 4-Kafeoilkinik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması

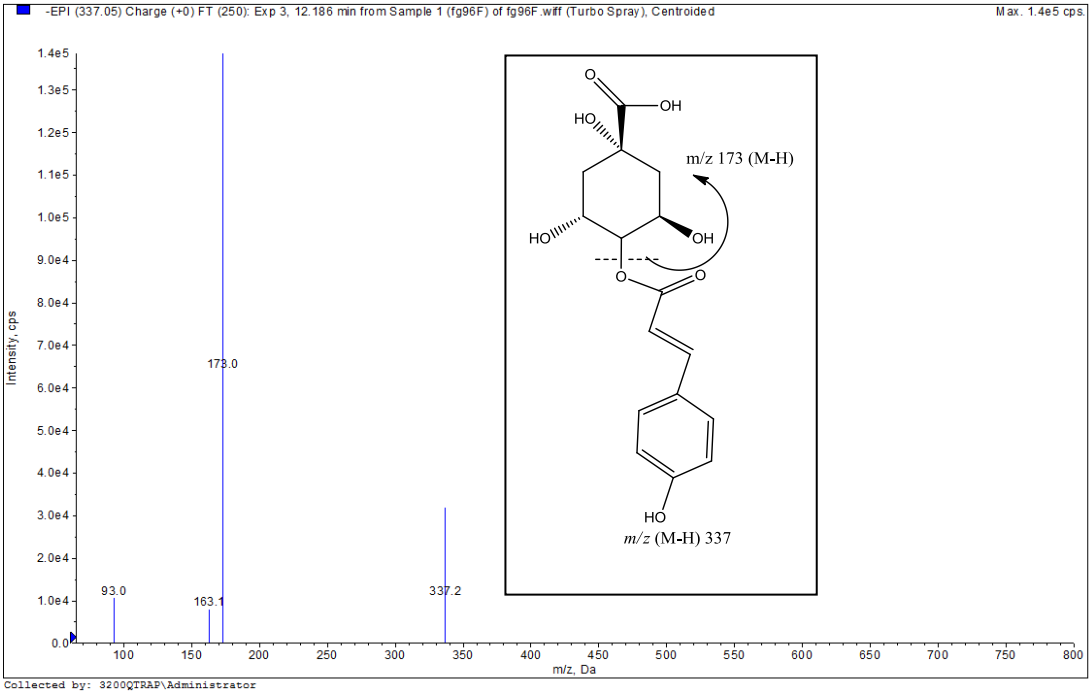
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

4 numaralı madde: Tutunma zamanı 8.1 olan *m/z* 337moleküler iyon pikli ve *m/z* 163 temel pikli kütle spektrumu (Şekil 18) incelendiğinde 337 ve 163 pikleri dikkat çekmektedir. *m/z* 337 molekül ağırlıklı ve *m/z* 163 temel pikli olan bu madde 3-*p*-kumaroilkinik asit olarak belirlenmiştir (Clifford ve ark., 2003).

8 numaralı madde: 12. dakika da kolunu terk eden, *m/z* 337 moleküler iyon pikli ve *m/z* 173 temel pikli madde (Şekil 19) yukardaki bilgiler ışığında 4 kumaroilkinik asit olarak belirlenmiştir (Clifford ve ark., 2003).



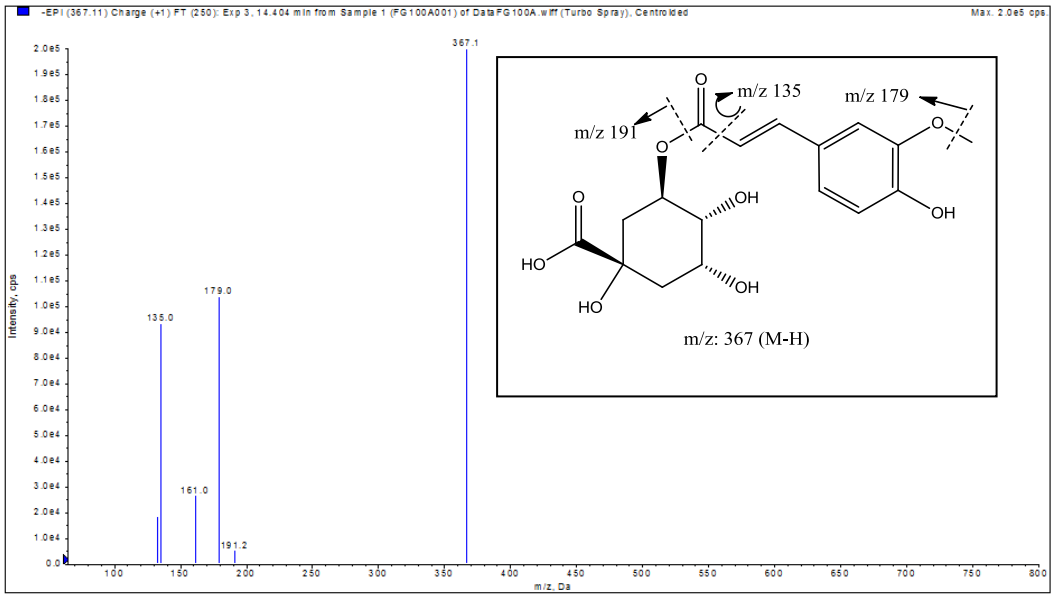
Şekil 18. 3-Kumaroilkinik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması



Şekil 19. 4-Kumaroilkinik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

9 numaralı ve 10 numaralı maddeler: *m/z* 367 moleküler iyon pikli maddeye tutunma zamanı 12 ve 14 olarak iki farklı zamanda rastlanmıştır. 14. dakikada kolonu terk eden (10 numaralı madde) *m/z* 367 [M-H] moleküler iyon pikinin yanında *m/z* 179 temel piki ve *m/z* 191 kinik asit piki görülmüştür (Şekil 20): *m/z* 191 piki ve moleküler iyon piki arasındaki 176 amu'luk fark bir feruloil grubuna işaret etmektedir. *m/z* 191'ise bir kinik asit grubudur. Bu durumda madde feruloilkinik asit olarak tanımlanmıştır. *m/z* 179 piki kinik asit grubu ayrıldıktan sonra metil grubunun kopması ile *m/z* 135'in ise karboksilik asit kısmından CO_2 çıkışı sonrası oluştuğu düşünülmektedir. Elde edilen bulgular kaynaklar ile uyumludur (Ruiz ve ark., 2013). Fakat bağlanma pozisyonları ile ilgili bir bilgi elde edilememiştir. 9 numaralı madde ise benzer parçalanmalar göstermiş fakat temel piki *m/z* 161 olarak bulunmuştur. Her iki madde de feruloilkinik asit izomeri olarak bulunmuş fakat kinik asit ve ferulik asitin bağlanma pozisyonları tespit edilememiştir.



Şekil 20.Feruloilkinik asitin kütle spektrumu ve parçalanması

Kafeik asit ve diğer türevleri

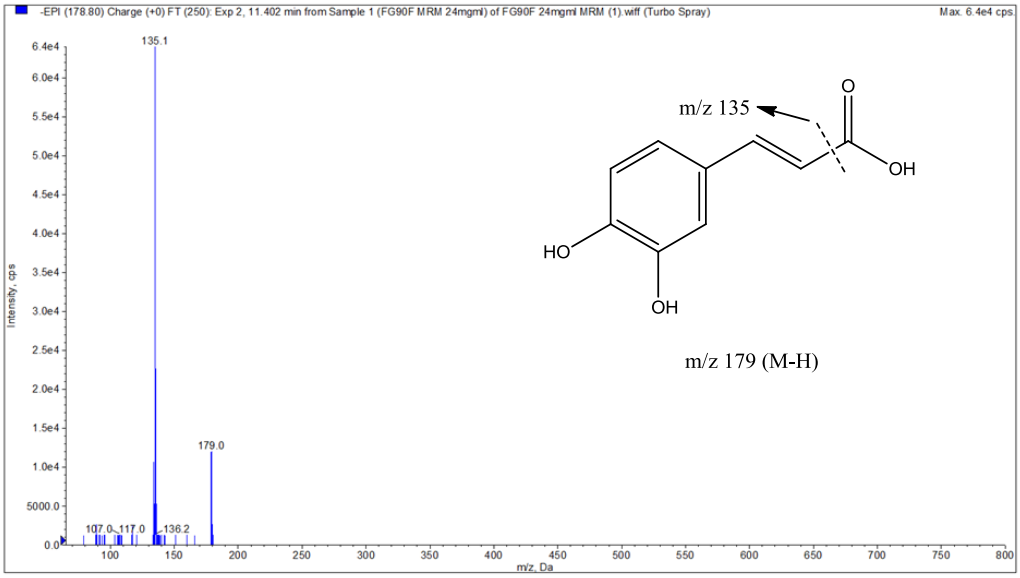
7 numaralı madde: 11. dakikada kolonu terk eden, *m/z* 179 molekül ağırlıklı ve *m/z* 135 temel pikli madde üzerinde yapılan çalışmalarda (Şekil 21) kafeik asit olduğu anlaşılmıştır. Bu maddenin doğruluğu standart kafeik asit kullanılarak da doğrulanmıştır.

15 numaralı madde: Tutunma zamanı 24.2 olan *m/z* 323 molekül ağırlıklı ve *m/z* 135 temel pikli madde üzerinde yapılan incelemede (Şekil 22) molekülün bir kafeik asit türevi olduğu dikkat çekmektedir. Moleküler iyon piki *m/z* 323 'ün kafeik asit molekül ağırlığından 162 amu fazla oluşu bir glukoz ile esterleşmeyi düşündürmektedir. Kaynak taramaları da bu durumu doğrular niteliktedir ve kaynaklarda kafeoil glukoz olarak adlandırılan aynı molekül ağırlıklı ve aynı parçalanmalara sahip maddeye rastlanmıştır (Bastos ve ark., 2007; Chen ve ark.,

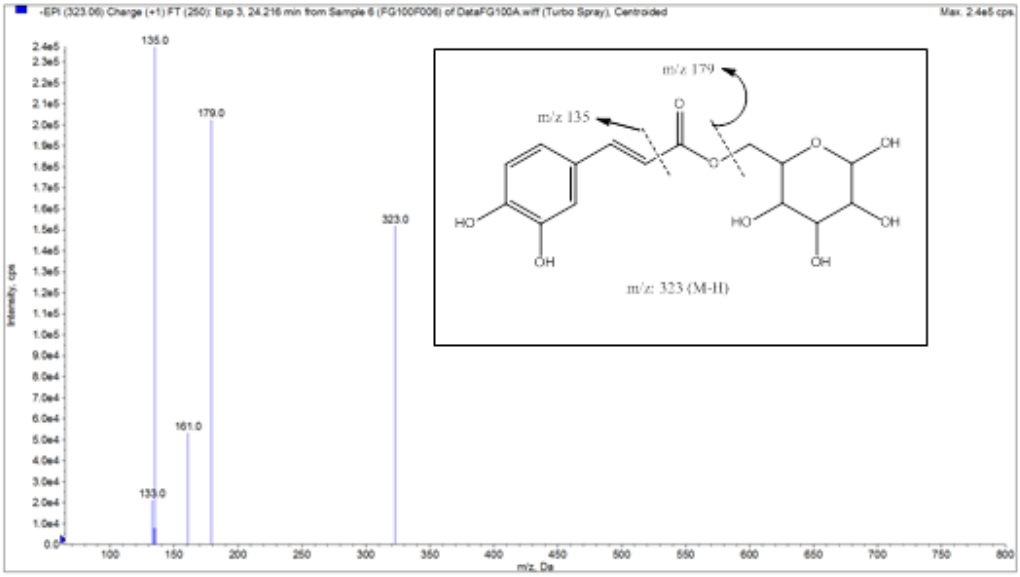
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

2011). Fakat kafeoil ünitesinin glukozun hangi karbonu (OH) üzerinde bulunduğu tespit edilememiştir.

16 numaralı madde: Tutunma zamanı 28.7 olan *m/z* 207 molekül ağırlıklı ve *m/z* 135 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 23) maddenin bir kafeik asit türevi olduğu hemen göze çarpmaktadır. Kafeik asit parçalanmaları *m/z* 179 ve *m/z* 135 in yanında *m/z* 133 ve *m/z* 161 pikleri de görülmektedir. Moleküler iyon piki *m/z* 207 ve kafeik asit molekül ağırlığı arasında 28 amu'luk bir fark görülmektedir. Bu fark bir etil kopmasını işaret etmektedir. Madde bu hali ile kafeik asit etil esteri (etil kafeat) olarak tanımlanmıştır



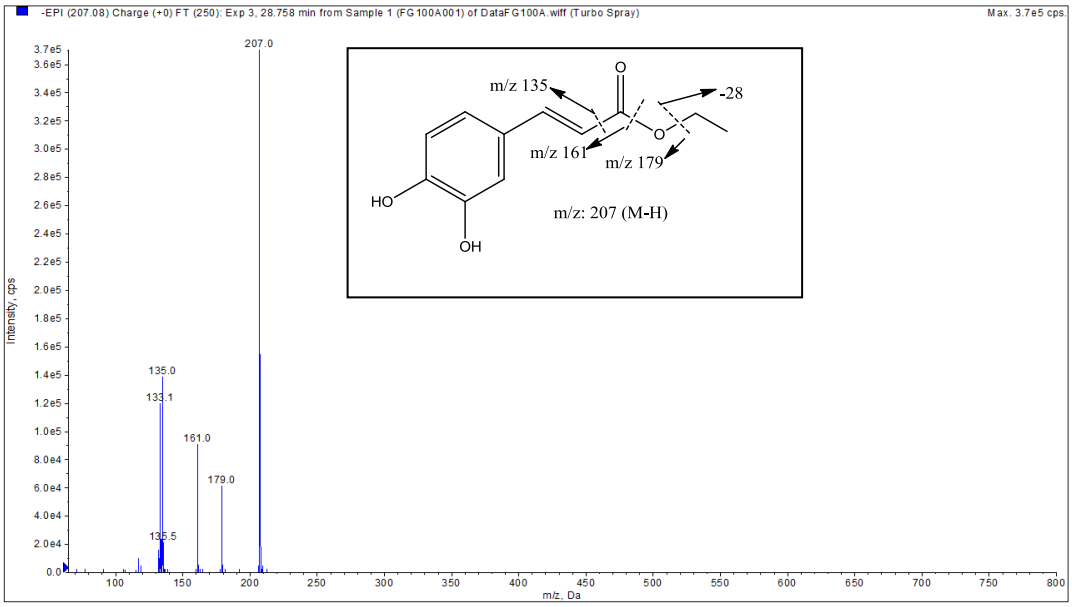
Şekil 21. Kafeik asite ait kütle spektrumu ve parçalanması



Şekil 22. Kafeoil glukozun kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

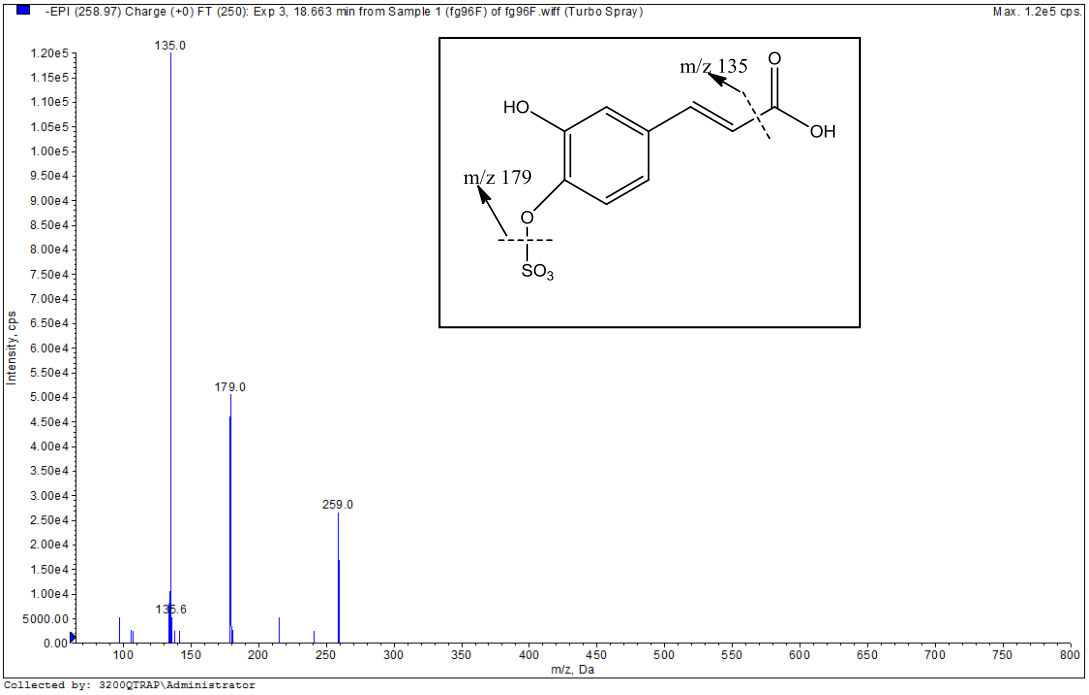
Metil etil gibi alt grupların maddenin polaritesine olan etkisinden dolayı tutunma zamanlarında ciddi farklılıklar görülmektedir (Chen ve ark., 2011). Sadece asit ekstresinde rastlanan bu maddenin *m/z* 549 [M-H] molekülünün parçalanması sonucu ortaya çıktığı veya hidroliz prosedürü sonucu oluştuğu düşünülmektedir zira asit hidrolizi işlemi sonrası etil asetat ile fraksiyonlama yapılmıştır. Madde etil kafeat olarak kaynaklarda da kayıtlıdır (Celli ve ark., 2007; Pellati ve ark., 2011).



Şekil 23. Etil kafeatın kütle spektrumu ve parçalanması

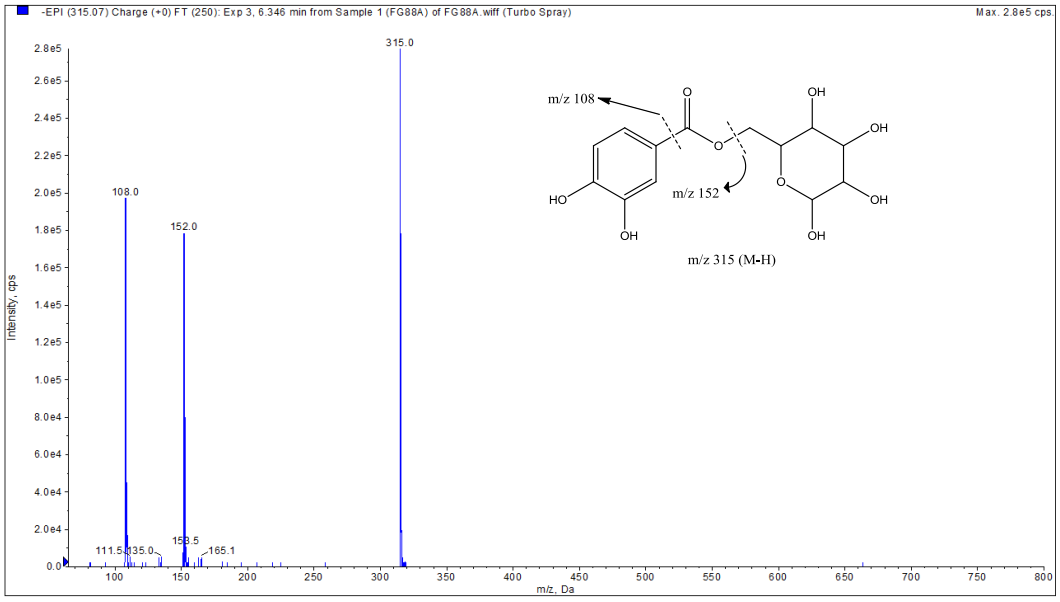
11 numaralı madde: 18.6 tutunma zamanı ile kolonu tek eden ve *m/z* 259 [M-H] moleküler iyon pikli ve *m/z* 135 temel pikli madde üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 24) moleküler iyon piki ve *m/z* 179 olarak görülmekte ve bağıl yoğunluğu ikinci en çok olan pik arasında 80 amu'luk fark görülmektedir. Bu fark sülfat grubu ile açıklanabilmektedir. *m/z* 179 ve beraberinde parçalanma ürünü olan *m/z* 135 karakteristik kafeik asit parçalanmalarıdır. Bu bilgiler ışığında molekül kafeik asit sülfat tuzu olarak adlandırılmıştır (Nakazawa ve ark., 1998; Zhou ve ark., 2006; Stalmach ve ark., 2009). Sülfatın bağlı olduğu pozisyon tutunma zamanını etkiliyen faktörlerden birisi olmuştur. 44 amu'luk CO_2 çıkışının görülmesi sülfatlanmanın fenil halkası üzerinde 3 veya 4 pozisyonlarından olduğunu düşündürmektedir. *m/z* 215 [M-H] iyonuda bu teoriyi doğrulamaktadır ve moleküler iyon piki *m/z* 259 dan CO_2 çıkışı ile oluşmuştur.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 24. Kafeik asit sülfat tuzunun kütle spektrumu ve parçalanması

2 numaralı madde: 6.4'üncü dakikada kolonu terk eden *m/z* 315 molekül ağırlıklı madde üzerinde yapılan incelemelerde; maddede *m/z* 152 [M-H] protokateşik asit (3,4 dihidroksibenzoik asit) veya gentisik asit (2,5 dihidroksibenzoik asit) olduğu görülmüştür. *m/z* 108 ise CO_2 çıkışıyla oluşmuştur. Protokateşik asit ve gentisik asit UV spektrumlarından kolayca ayrılabilir. Protokateşik asit 320 nm de gentisik asitten daha yüksek absorbans verir (Moran ve ark., 1998) 320 nm de verdiği absorbansın düşük olması bu molekülün protokateşik asit olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 25. Protokateşik asit hekzozitin kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

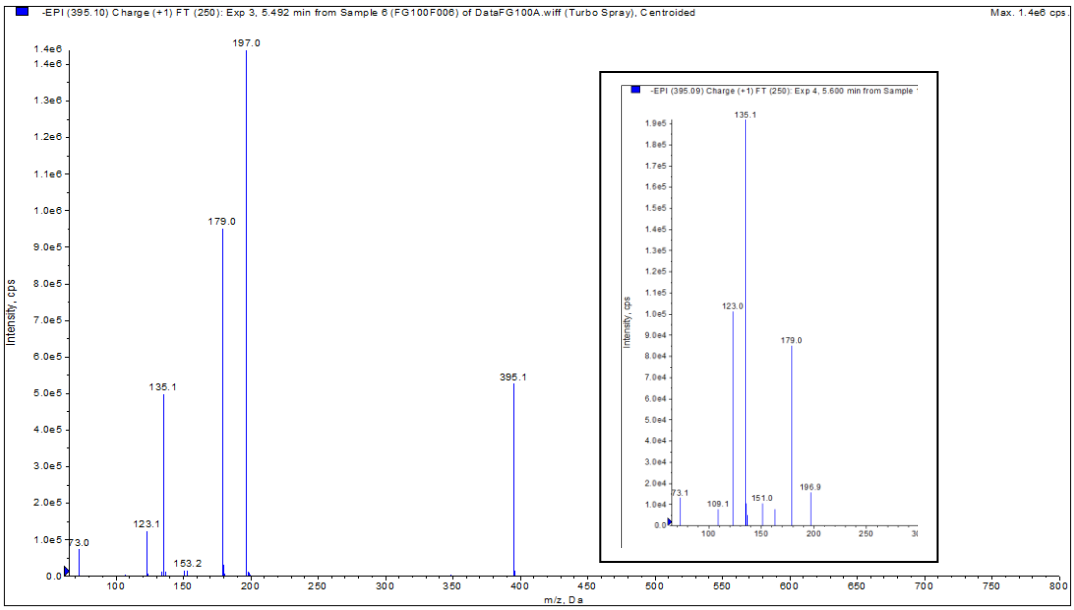
Moleküler iyon piki ile *m/z* 152 arasındaki 162 amu'luk farkın bir hekzozdan geldiği anlaşılmaktadır. Bu durumda madde protokateşik asit hekzozit (muhtemelen glukozit) olmalıdır (Şekil 25) (N. Fang ve ark., 2002; Cádiz-Gurrea ve ark., 2013). Bu madde *Mentha spicata* da ilk kez tanımlanmasına rağmen daha önce diğer *Mentha* türlerinde rastlanmıştır (Kapp ve ark.2013).

Salvianolik asit türevleri

Salvianolik asit ve rozmarinik asit türevleri aslında kafeik asit (KA) türevleridir. Genel olarak ifade etmek gerekirse: rozmarinik asit iki kafeik asitin birleşmesinden (kafeik asit dimeri), litospermik asit ve salvianolik asit C üç kafeik asitin birleşmesinden (kafeik asit tirimeri), litospermik asit B (salvianolik asit B) ve salvianolik asit E ise dört kafeik asit birleşmesinden (kafeik asit tetrameri) oluşmaktadır. Kütle spektrumlarındaki parçalanmalarında *m/z* 179 kafeik asit ve/veya *m/z* 197 danşensu (3,4-dihidroksifenil laktik asit) kopmaları şeklinde gözlenmektedir. CO_2 ve CH_3 çıkışlarına da sıklıkla rastlanmaktadır. Kütle spektrumlarında bu kopmaları görmek mümkün olsa da sadece kütle spektroskopisi yöntemleri kullanarak bu kopmaların hangi kafeik asit veya danşensu kaynaklı olduğunu belirlenememiştir (Zeng ve ark., 2006).

17 numaralı madde: Tutunma zamanı 5.5 'inci dakika olan, *m/z* 395 moleküler iyon pikli ve 197 temel pike sahip madde üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 26) *m/z* 179, 135 ve 123 iyonlarına da rastlanmıştır.

m/z 395 iyonunun iki molekül danşensu kondensasyonu sonucu oluştuğu görülmektedir ve maddenin ayrıntılı kütle spektrumunda danşensu 197 [M-H] iyonu da görülmektedir. Kaynak taramaları bu tespiti doğrular nitelikte olup aynı molekül ağırlıklı ve aynı parçalanmalar danşensu dimeri olarak adlandırılmıştır (Chen ve ark., 2011).



Şekil 26. Danşensu dimeri'ne ait kütle spektrumu

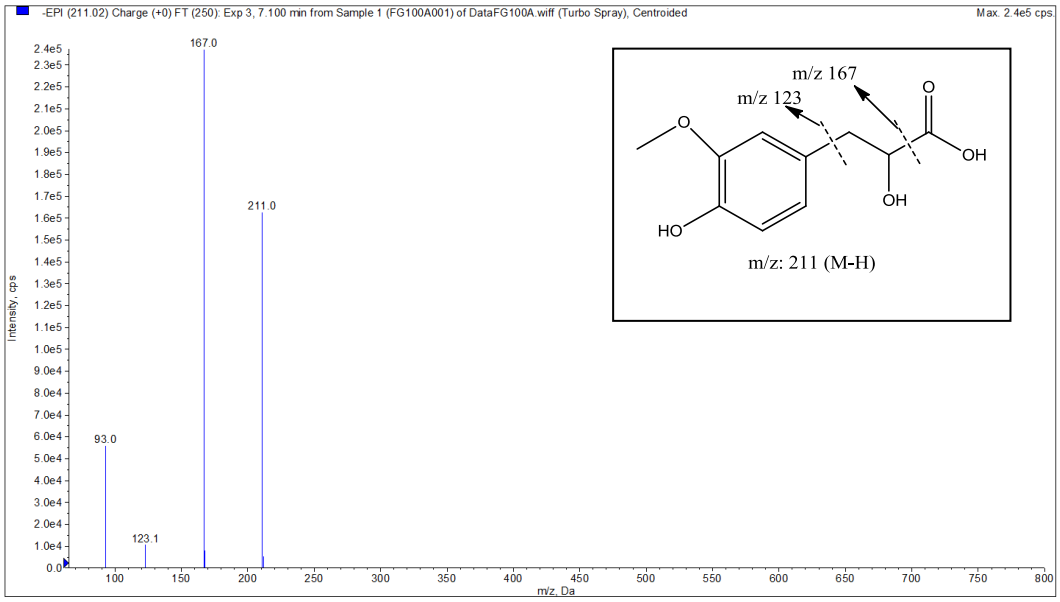
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Yapılan analizler de asit hidrolizi ekstrelerinde 2 farklı tutunma zamanında aynı molekül ağırlıklı 2 farklı maddeye rastlanmıştır (18 ve 19 numaralı maddeler):

18 numaralı madde: 7.1 tutunma zamanı ile kolonu terk eden ve *m/z* 211 moleküler iyon pikli *m/z* 167 temel pikli madde üzerinde yapılan analizler sonucu (Şekil 27) *m/z* 123 ve *m/z* 93 iyonlarına rastlanmıştır. Moleküler iyon pikinin danşensu *m/z* 197 [M-H] den 14 fazla olduğu görülmüştür ve bu durum akıllara danşensu metil esterini getirmiştir. Ancak *m/z* 167 iyonunun karboksilik asitten CO_2 çıkışı ile olduğu, benzer şekilde fenil halkasının yan zincirden kopması ile de *m/z* 123 iyonunun oluştuğu düşünülmektedir ve daha önce açıklandığı üzere (danşensu dimeri) bu maddelerin salvianolik asit parçalanmaları sonucu oluştuğu varsayılarak kaynak bilgileri ışığında metil grubunun fenil halkasındaki OH gruplarından birinin üzerinde olduğu anlaşılmıştır. Madde metil danşensu olarak tanımlanmıştır.

19 numaralı madde: 8.5 tutunma zamanı ile gelen bir diğer *m/z* 211 moleküler iyon pikli madde üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 28) temel pik olarak *m/z* 123 molekülüne ve eser miktarda *m/z* 179 iyonuna rastlanmıştır. 179 iyonunun danşensu dan (M-H-H_2O) çıkışı ile oluştuğu düşünülmektedir. 8,5 tutunma zamanı ile kolonu terk eden maddenin parçalanma ürünleri Chen ve arkadaşlarının elde ettiği danşensu metil kütle spektrumu sonuçları ile uyum göstermektedir. Bu bilgiler ışığın da bu molekül metil danşensu olarak tanımlanmıştır (Liu ve ark., 2007; Chen ve ark., 2011).

Metillenmenin farklı pozisyonlardan gerçekleşmiş olması 2 molekül arasında görülen tutunma zamanı farklılığını açıklamaktadır fakat tam olarak metillenme pozisyonları belirlenememiştir. 7.1 tutunma zamanı ile gelen madde de *m/z* 123 iyonunun oluşması metillenmenin halka üzerinde olduğu zaman gerçekleşeceğinden muhtemelen bu madde danşensu 4 metil ester veya danşensu 5 metil ester iken tutunma zamanı 8.5 olan madde de *m/z* 167 iyonunun görülmemiş olması metillenmenin karboksilik asit üzerinde olduğu fikrini uyandırmıştır. Bu teoriyi destekleyen bir başka unsur ise moleküler iyon piki *m/z*

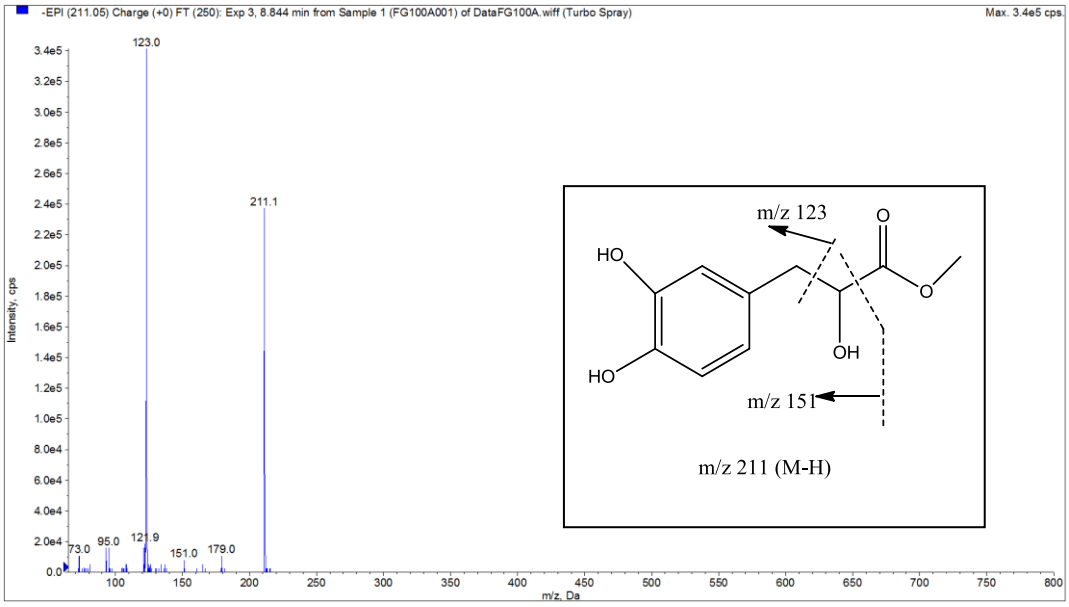


Şekil 27. Metil danşensunun kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

211 ve *m/z* 179 arasında görülen 32 amu'luk farktır ki bu bir metanol kopmasını işaret etmektedir.

Böylesi bir kopma metillenmenin karboksilik asit üzerinde olduğunu gösteren bir diğer unsurdur. Muhtemel parçalanma şekilleri bu bilgiler üzerinden çizilmiştir.



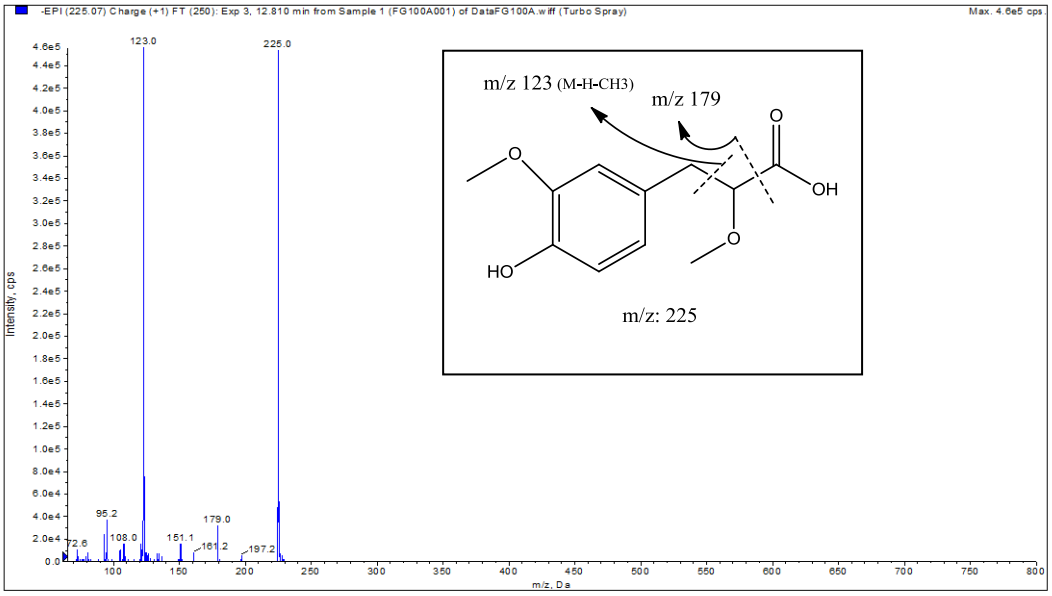
Şekil 28. Metil danşensunun kütle spektrumu ve parçalanması

20 numaralı madde: 12.8'inci dakikada kolonu terk eden ve *m/z* 225[M-H] moleküler iyon pikli ve *m/z* 123 temel pikli spektrum üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 29): ilk dikkat çeken parçalanma *m/z* 123 ve 179 parçalanması olmuştur. Bu parçalanmalar daha önce bahsettiğimiz metil danşensu parçalanması ile oluşmaktaydı (Chen ve ark., 2011). Bu durumda bu madde üzerinden hareket edilerek *m/z* 225 [M-H] molekül ağırlığının metil danşensu dan 14 fazla olduğu görülmüştür ve maddenin dimetil danşensu olabileceği üzerinde durulmuştur. Chem draw üzerinde yapılan çizimlerde spektruma uyan parçalanmalarında görülmesi molekülün dimetil danşensu olarak adlandırılmasını sağlamıştır.

21 numaralı madde: 16. dakikada kolonu terk eden, *m/z* 717 [M-H] molekül ağırlıklı, *m/z* 475 temel pikli (şekil 30) 280 ve 320 nm lerde kuvvetli absorbans veren madde üzerinde yapılan incelemeler sonucu: *m/z* 519 ve *m/z* 321 iyonunun molekülden danşensu (-198) *m/z* 339 ve eser miktarda görülen *m/z* 537 iyonunun ise kafeik asit (-180) kopmaları sonucu oluştuğu görülmüştür. *m/z* 475 temel pikinin ise *m/z* 519 dan CO_2 çıkışı ile oluştuğu görülmüştür. Danşensu ve kafeik asit kopmaları bu molekülün bir kafeik asit türevi, molekül ağırlığı da dikkate alındığında bir kafeik asit tetrameri olduğu görülmektedir. Molekül ağırlığı *m/z* 718 olarak bilinen 3 salvianolik asit türevi vardır. Bunlar: salvianolik asit B, salvianolik asit E ve salvianolik asit L dir (Barros ve ark., 2013). Bunlar arasındaki ayırım kolondan çıkış sırasına göre yapılabilir. Ters faz kolonda bu maddeler salvianolik asit E, salvianolik asit B, salvianolik asit L sıralaması ile

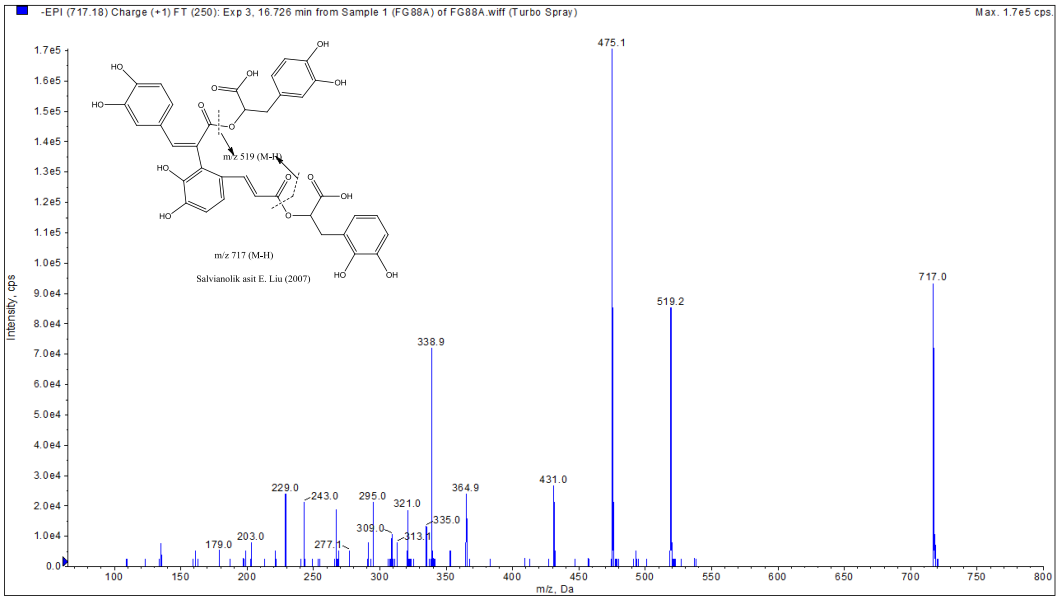
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

kolonu terk ederler (Liu ve ark., 2007). Bazı yayınlarda ise bu sıralamada salvianolik asit B ve E nin yerleri tam tersi olarak verilmiştir (Miron ve ark., 2013). Fakat bu yayınlarda ortak olan nokta salvianolik asit L nin kolonu rozmarinik asitten ve diğer iki izomerinden sonra terk ettiği yönündedir.



Şekil 29. Dimetil danşensunun kütle spektrumu ve parçalanması

Bu maddenin doğruluğu standart salvianolik asit B kullanılarak yapılmıştır. Alıkonma zamanının salvianolik asit B den ve rozmarinik asitten erken olmasından dolayı bu madde salvianolik asit E olarak tanımlanmıştır (Ferreres ve ark., 2013; Miron ve ark., 2013).



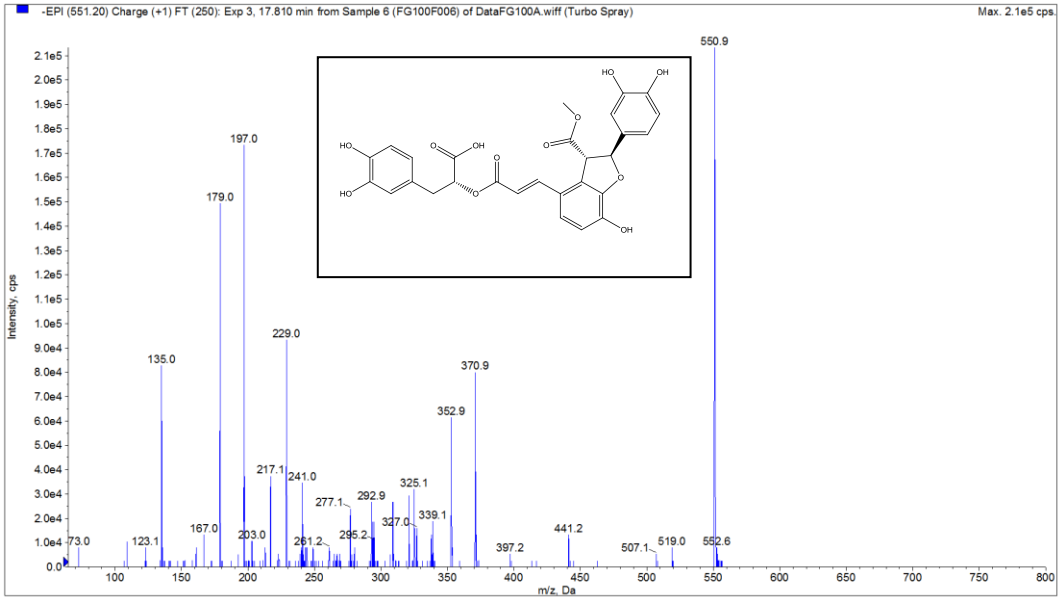
Şekil 30 Salvianolik asit E'nin kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

22 numaralı madde: Tutunma zamanı 17.8 olan ve *m/z* 551[M-H] moleküler iyon piki ve *m/z* 197 temel pike sahip spektrum üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 31): Moleküler iyon piki *m/z* 551 den sonra *m/z* 519, *m/z* 371, *m/z* 353, *m/z* 339, *m/z* 321 iyonları görülmektedir. *m/z* 551 ve *m/z* 519 arasındaki 32 amu'luk fark metanol kopmasına işaret etmektedir. Bu durumda molekülde en az bir metoksi grubundan söz edebiliriz. *m/z* 551 ve *m/z* 371 arasındaki 180 amu'luk fark ise kafeik asit grubunu işaret eder. *m/z* 551 ve *m/z* 353 arasındaki 198 lik fark bir danşensudan ileri gelmiş olmalıdır. Danşensu ve kafeik asit birleşmelerine genel olarak litospermik ve salvianolik asit türevlerinde rastlanmaktadır ve her ikiside kafeik asit türevleridir. *m/z* 551 ve *m/z* 339 arasındaki 212 amu'luk fark da bir kafeik asit veya danşensu ile ilintili olmalıdır nitekim 212 amu'luk farkın kafeik asit ve MeOH kopması sonucu 180+32 oluştuğu sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde *m/z* 551 ve *m/z* 321 arasındaki 230 luk farkda kafeik asit veya danşensu ile ilgili olacağından inceleme bu yönde yapılmış ve sonuç olarak *m/z* 232 nin danşensu ve MeOH 198 +32 birleşmesinden oluştuğu anlaşılmıştır. Temel pik olarak görülen *m/z* 197 [M-H] ise danşensunun kendisidir ve takip eden pikleri *m/z* 179 ve *m/z* 135 ise sırasıyla su ve karbondioksit çıkışları sonucunda oluşmuştur.

Molekül ağırlığı dikkate alınacak olursa *m/z* 551[M-H] litospermik asit *m/z* 537 [M-H] den bir metil grubu fazla olarak görülecektir ki MeOH kayıplarıda bu metillenme dolayısı ile gerçekleşmektedir. Bu bilgiler ışığında molekülümüz monometil litospermat olarak adlandırılmıştır ve kaynak bilgileri ile uyumludur (Zeng ve ark., 2006).

Metillenme pozisyonu için değerlendirme yapmak gerekirse hem danşensu hem de kafeik asit ile etkileşime girecek bir noktada bulunmalıdır ki her iki durumdada 32 MeOH kopmaları gözlenebilsin. Bu durumda en uygun pozisyon furan halkasındaki karboksilik asitin hidroksil grubu olarak görülmektedir. Bu madde için parçalanma şeması çizilmemiştir. Çünkü litospermik asitler belli bir düzen içinde parçalanma göstermemektedirler.

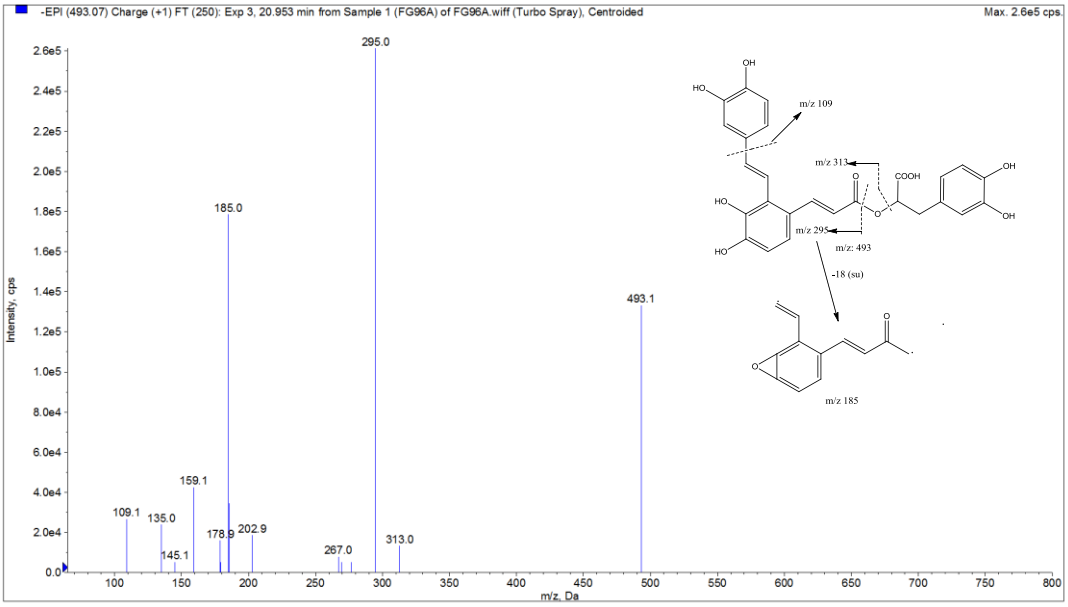


Şekil 31 Monometil litospermat kütle spektrumu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

23 numaralı madde: Salvianolik asit C türevi ayrıntılı açıklamalar bir diğer salvianolik asit C türevi olan 32 numaralı madde için yapılmıştır.

24 numaralı madde: Rozmarinik asitten hemen önce gelen *m/z* 493[M-H] molekül ağırlıklı (Şekil 32) ve karakteristik parçalanma ürünleri olan kafeik asit kaybı (-180amu) ile oluşan *m/z* 313 ve danşensu kaybı (-198 amu) ile oluşan 295 lik parçalanma ürünleri bu maddenin bir kafeik asit trimeri olduğunu göstermektedir. *m/z* 185 iyonu 295 iyonundan 3,4 dihidroksifenil (-110) halkasının kopması (Zeng ve ark., 2006; Liu ve ark., 2007) ve *m/z* 313 den su ve 3,4 dihidroksifenil (-110) halkası kopması sonucu 2 ayrı kaynaktan oluşmaktadır. Bu durum 185'in bağıl yoğunluğunun neden yüksek olduğunu açıklamaktadır. Yapılan kaynak taramaları bu maddenin salvianolik asit A izomeri olduğunu göstermektedir. Parçalanma şeması Liu ve arkadaşlarının çalışması kullanılarak çizilmiştir (Kapp ve ark.2013, Barros ve ark., 2012).



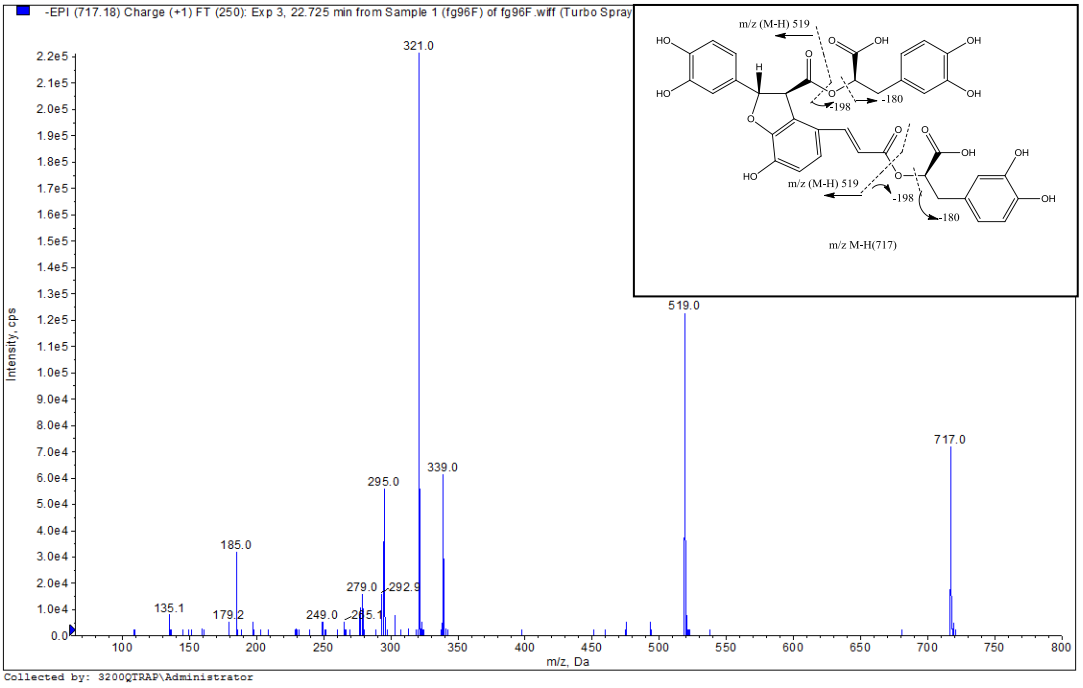
Şekil 32. İzosalvianolik asit A kütle spektrumu ve parçalanması

25 numaralı madde: Rozmarinik asitten hemen sonra kolonu terk eden ve *m/z* 717[M-H] molekül ağırlıklı molekül üzerinde yapılan analizler sonucu (Şekil 33): ana molekülden danşensu (-198) ve kafeik asit (-180) kopmaları gözlenmiştir. Bu kopmalar salvianolik asit türevlerini düşündürmektedir. Molekül ağırlığı 718 olan salvianolik asitlerden bilinenleri salvianolik asit E ve salvianolik asit L ile birlikte salvianolik asit B dir (Barros ve ark., 2013). Elimizde mevcut olan standart salvianolik asit B ile yapılan çalışmalarda tutunma zamanının ve parçalanma ürünlerinin de aynı olduğu gözlenmiş ve molekül salvianolik asit B olarak adlandırılmıştır.

26 numaralı madde: Bu madde üzerinde yapılan incelemeler *m/z* 519 [M-H] moleküler iyon pikinin yanında *m/z* 339 temel piki gözlenmiştir. Spektrumda gözlenen diğer iyonlar sırasıyla *m/z* 321-295-267 ve 251 olmuştur. Bu maddenin değerlendirilmesi bu veriler ışığında mümkün olmamış fakat spektrum incelendiğinde maddenin salvionolik asit B den 1 molekül danşensu (197 amu)

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

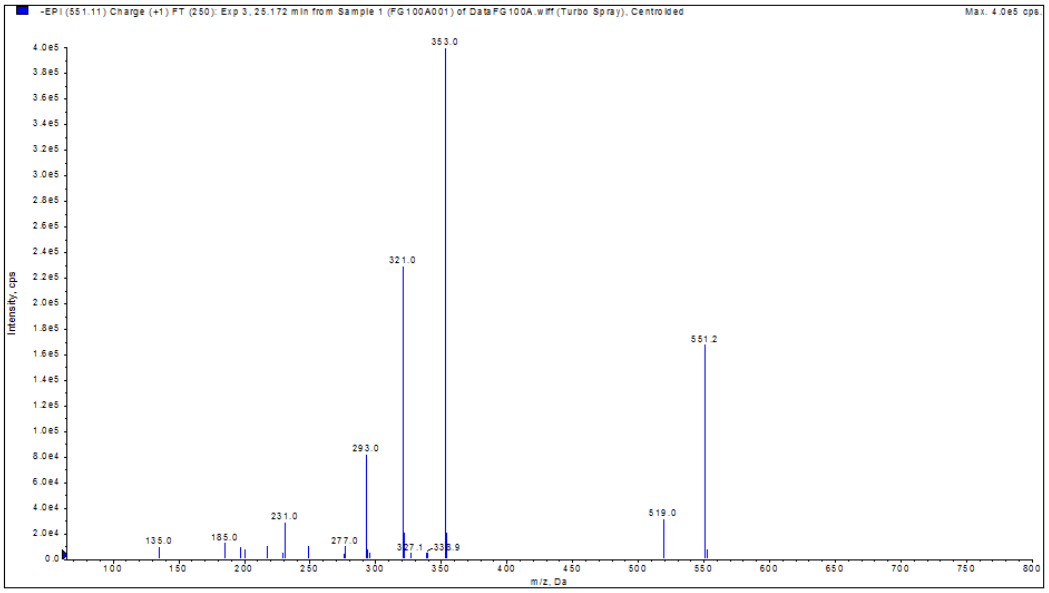
eksik olarak görülmüştür. Moleküler iyon piki ve temel pik arasındaki 180 amu'luk luk fark ise 1 kafeik asit olmalıdır. Madde bu haliyle salvionalik asit B den danşensu kopması şeklinde görünmektedir. Bulunduğu ekstrenin bir asit hidrolizi ekstresi olduğu da düşünülecek olursa 26 numaralı maddenin salvionalik asit B' nin parçalanması sonucu oluştuğu düşünülebilir.



Şekil 33. Salvianolik asit B kütle spektrumu ve parçalanması

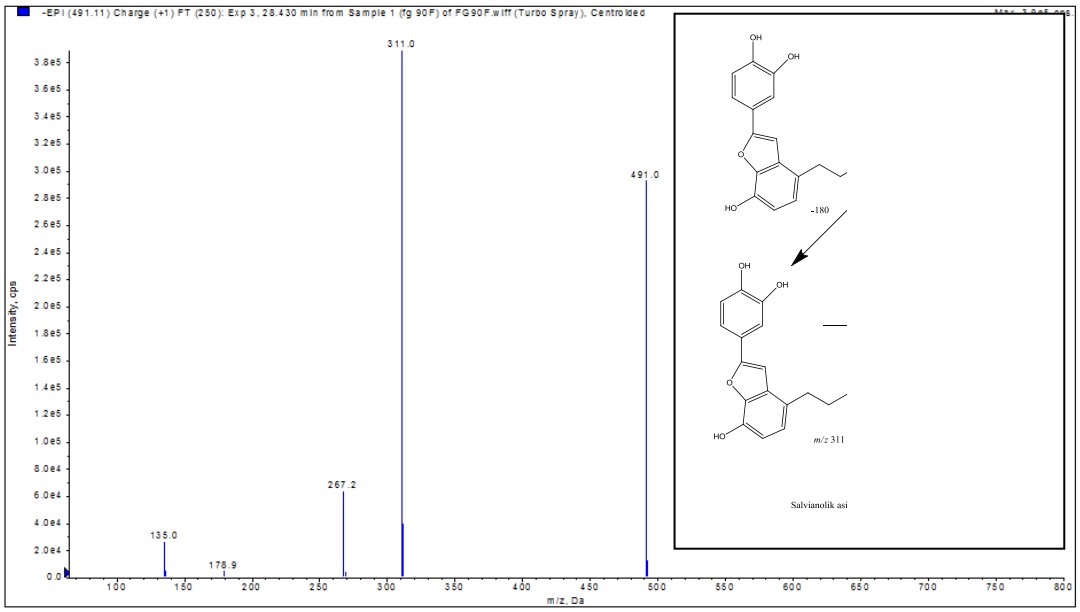
27 numaralı madde: Tutunma zamanı 25.17 olan ve *m/z* 551 [M-H] moleküler iyon piki ve *m/z* 551 temel pike sahip spektrum üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 34): Moleküler iyon piki *m/z* 551 den sonra *m/z* 519, *m/z* 353, *m/z* 321 iyonları görülmektedir. *m/z* 551 ve *m/z* 519 arasındaki 32amu'luk fark metanol kopmasına işaret etmektedir. Bu durumda molekülde en az bir metoksi grubundan söz edebiliriz. *m/z* 551 ve *m/z* 353 arasındaki 198'lik fark bir danşensudan ileri gelmiş olmalıdır. *m/z* 551 ve *m/z* 321 arasındaki 230 amu'luk fark bir danşensu ve metanol kopması (198 +32) sonucu oluşmuş olmalıdır. Bu ve benzeri parçalanmalara tutunma zamanları 17,8 (22 numaralı madde) ve 31 (29 numaralı madde) olan monometil litospermat molekülünde de rastlanmıştır. Aynı molekül ağırlıklı ve benzer parçalanmalar gösteren bu moleküller de monometil litospermat olarak adlandırılmıştır. İki farklı zamanda alıkonan bu moleküllerde tutunma zamanını etkileyen faktörün metillenme pozisyonlarında ki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir. Kaynaklarda monometil litospermat ve ayrıntılı kütle spektrumu sonuçları da kayıtlıdır (Zeng ve ark., 2006).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 34 Monometil litospermat izomeri ne ait kütle spektrumu

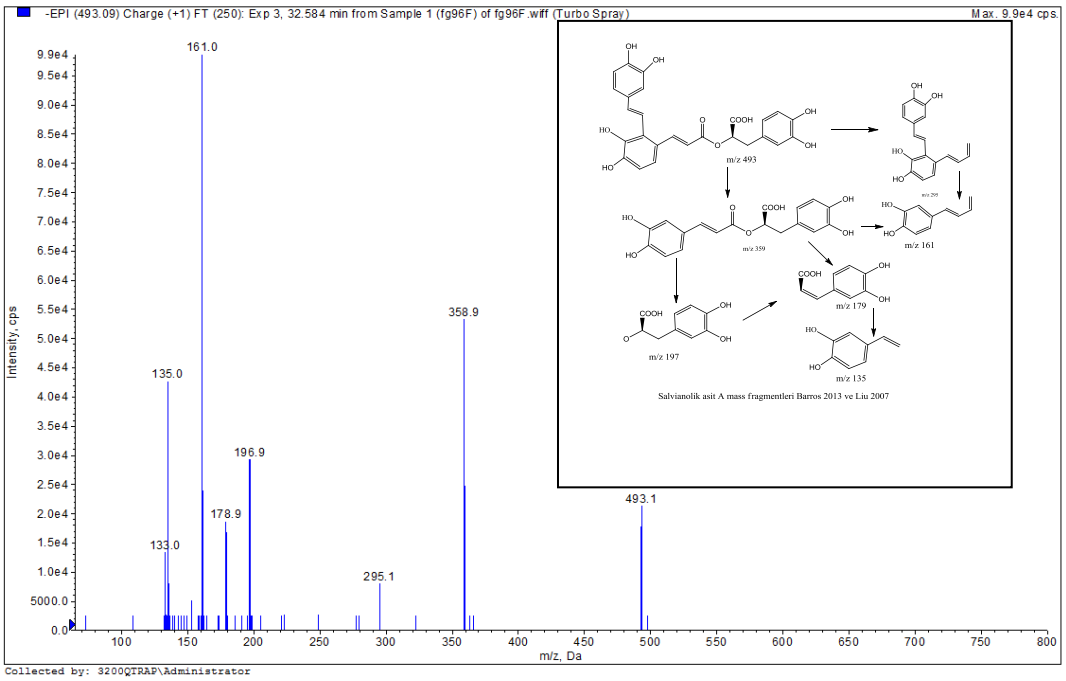
28 numaralı madde: 28.5 tutunma zamanı ile kolonu terk eden *m/z* 491 [M-H] moleküler iyon pikli ve *m/z* 311 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 35): moleküler iyon piki ve temel pik arasındaki 180 amu'luk fark bir kafeik asit kopması *m/z* 311 ve *m/z* 267 arasındaki 44 amu'luk fark CO_2 çıkışını, *m/z* 179 kopan kafeik asite ait [M-H] piki ve *m/z* 135 ise kafeik asit- CO_2 pikidir. Molekül ağırlığı, ve kafeik asit türevi göz önüne alındığında bir salvianolik asit türevi olduğu anlaşılmaktadır. Kaynaklara göre bu molekül ağırlığı ve parçalanmalar salvianolik asit C'ye aittir (Liu ve ark., 2007; Barros ve ark., 2013; Ferreres ve ark., 2013; Miron ve ark., 2013). Molekül salvianolik asit C olarak adlandırılmıştır.



Şekil 35. Salvianolik asit C ye ait kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

30 numaralı madde: 32.7'inci dakikada gelen *m/z* 493 [M-H] molekül ağırlıklı madde ve karakteristik parçalanma ürünleri olan *m/z* 359, 295,197,161 ve 135 lik parçalanma ürünleri bu maddenin bir kafeik asit trimeri ve dolayısıyla bir rozmarinik asit türevi (kafeik asit dimeri) olduğunu göstermektedir (Şekil 36). Yapılan kaynak araştırmalarında bu maddenin salvianolik asit A olduğunu göstermektedir (Lu ve ark., 2002; Barros ve ark., 2013). Aynı kaynaklara göre bu madde yüksek miktarda antioksidan etkilidir ve stabilitesi de oldukça düşüktür ve derhal *m/z* 491 molekül ağırlıklı salvianolik asit C ye dönüşebilir ki yapılan analizlerde 28.5'inci dakikada kolonu terk eden *m/z* 491, 311, 197 parçalanma ürünlerine sahip bir maddeye de rastlanmıştır. Kaynaklara göre bu madde salvianolik asit C olmalıdır (Zeng ve ark., 2006; Chen ve ark., 2011). Bu maddenin doğal olarak bulunabileceği gibi salvianolik asit A nın bozulması ile de oluştuğu rapor edilmiştir (Barros ve ark., 2013). Eğer bu molekül tamamen salvianolik asit A 'nın bozulması ile oluşuyor olsa idi kaynak taramalarında ve yaptığımız analizlerde salvianolik asit A ve salvianolik asit C ye aynı anda rastlamamız imkan mümkün olmayacaktı fakat kaynak taramaları her ikisinin de bir arada bulunduğu analizleri rapor etmişlerdir (Chen ve ark., 2011)



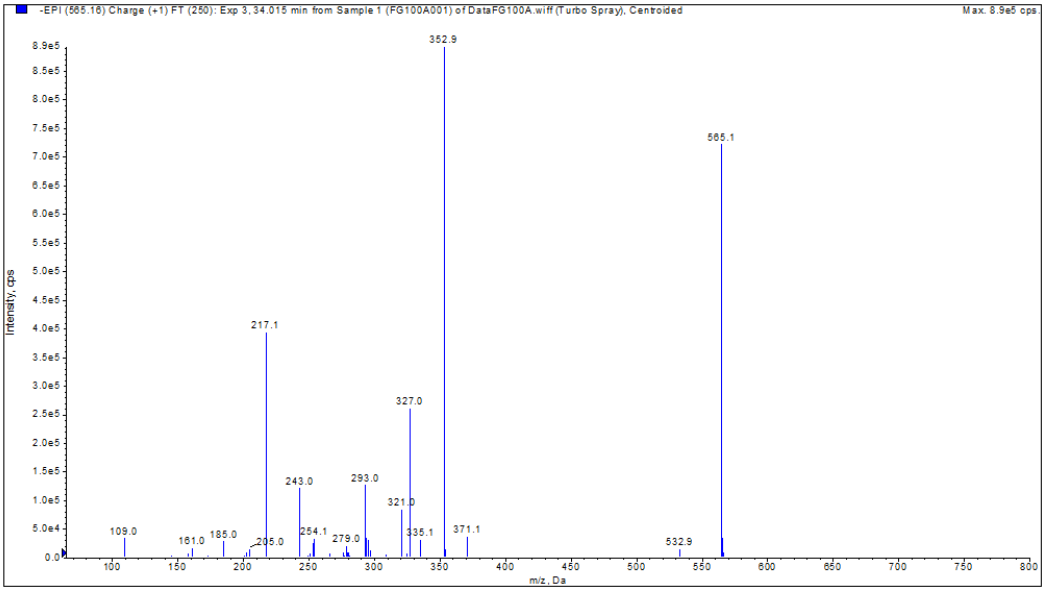
Şekil 36. Salvianolik asit A ya ait kütle spektrumu ve parçalanması

31 numaralı madde: Tutunma zamanı 34 olan ve *m/z* 565 [M-H] moleküler iyon piki ve *m/z* 353 temel pike sahip spektrum üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 37): Moleküler iyon piki *m/z* 565 den sonra *m/z* 533, *m/z* 353, *m/z* 371 iyonları görülmektedir. *m/z* 565 ve *m/z* 353 arasındaki 212 amu'luk fark danşensu ve metil kopması (198+14), 533 ve 353 arasındaki 180 amu ise bir kafeik asit kopmasını göstermektedir. *m/z* 565 ve *m/z* 371 arasındaki 194'lük fark kafeik asit ve metil kopmasını (180 +14) göstermektedir. 565 ve 335 arasındaki 230 amu'luk fark bir danşensu ve metanol kopması (198 +32) sonucu oluşmuş olmalıdır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Bu ve benzeri kopmalara monometil litospermat molekülünde de rastlanmıştı ve ilgili yerlerde bu molekül ile ilgili de ayrıntılı açıklamalarda bulunulmuştu.

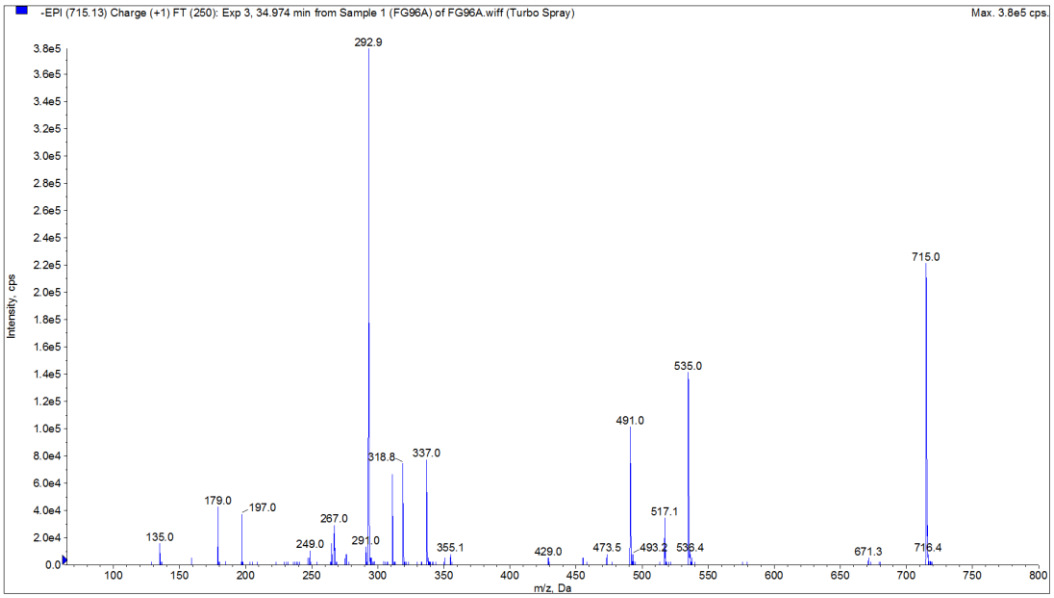
Molekül ağırlığı 551 olarak bulunan monometil litospermat ve molekül ağırlığı *m/z* 565 olarak bulunan bu molekül arasındaki 14 amu'luk fark bir metil grubunu daha işaret eder. Bu durumda molekülümüz dimetil litospermat olmalıdır. Metillenme pozisyonları ile ilgili olarak bu bilgiler ışığında bir şey söylemek çok doğru olmasada 32 amu'luk metanol çıkışları göz önününe alındığında metillerden en az birinin karboksilik asit üzerinde olduğunu düşünebiliriz. Moleküle kaynaklarda raslanmıştır (Zeng ve ark., 2006).



Şekil 37. Dimetil litospermat kütle spektrumu

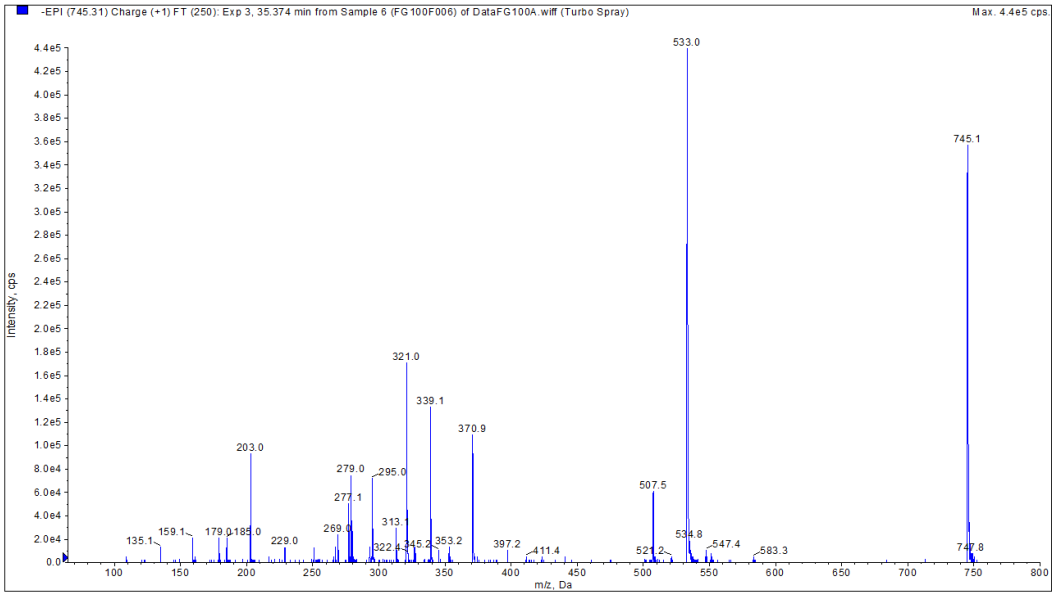
32 numaralı madde: *m/z* 715 molekül ağırlıklı *m/z* 293 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 38) moleküler iyon piki *m/z* 715 ve 535 arasındaki 180 amu'luk fark molekülden bir kafeik asit koptuğunu göstermektedir. Maddenin kafeik asit türevi olduğu 179 ve 135 molekül ağırlıklı piklerden de anlaşılabilmektedir. Salvianolik asit C *m/z* 491 molekül ağırlıklı olduğunu daha öncede tartışmıştık. Parçalanmalar incelendiğinde *m/z* 535 parçalanmasının salvianolik asit C den 44 amu fazla olduğu görülecektir ki bu bir karboksil grubunu işaret eder. Bu maddenin ne olduğu tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat salvianolik asit C türevi olarak adlandırılmıştır. Bu maddeye son yıllarda yapılan 2 çalışmada da rastlanmış fakat yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır (Barros ve ark., 2012; Miron ve ark., 2013).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 38. Salvianolik asit C türevi maddeye ait kütle spektrumu

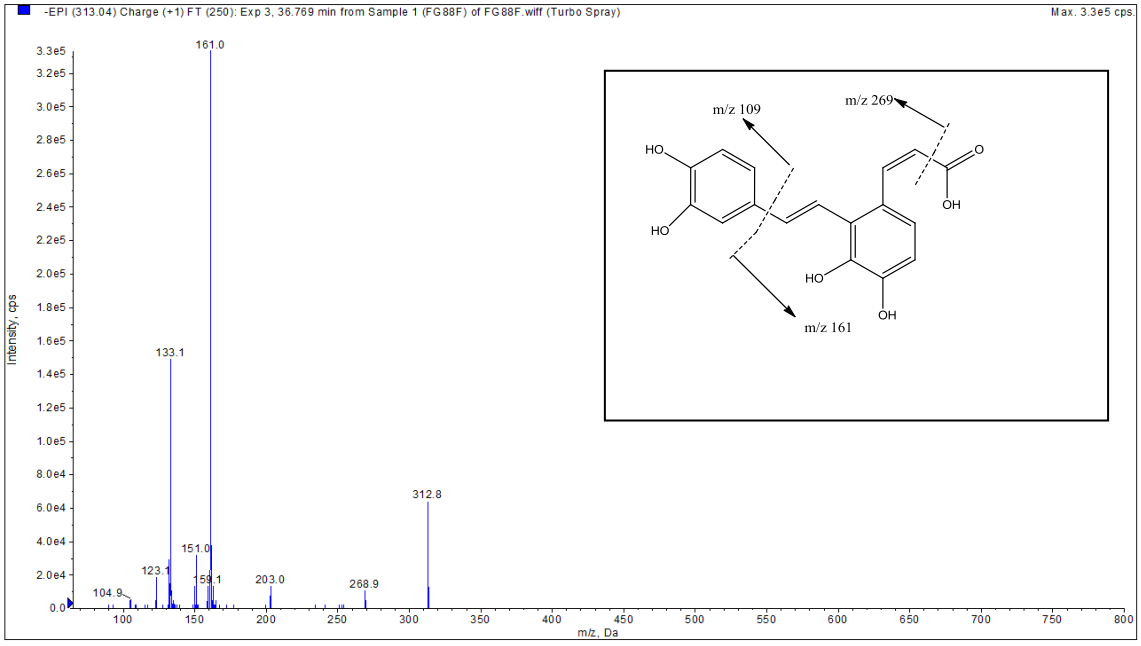
33 numaralı madde: Tutunma zamanı 35.3 olan *m/z* 745 moleküler iyon pikli ve *m/z* 533 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 39): moleküler iyon piki 745 ve temel pik 533 arasındaki ve de 533 ile 321 arasındaki 212 amu'luk fark danşensu ve metil kopması (198+14), 533 ve 339 arasındaki 194 lük fark kafeik asit ve metil kopmasını (180 +14) 339 ve 159 arasındaki 180 amu ise bir kafeik asit kopmasını göstermektedir. Bu durumda bazıları metillenmiş kafeik asit ve danşensu parçalanmalarını irdelemek gerekmiştir. Bu madde bir salvianolik asit türevinin metil esteri olmalıdır. *m/z* 745 molekül ağırlığı bakımından en yakın olan *m/z* 717 ile salvianolik asit B dir ve *m/z* 745 ile arasındaki 28 amu'luk fark dimetil grubunu işaret eder. Bu bilgiler ışığında madde Dimetil salvianolik asit B (dimetil litospermik asit B) olarak adlandırılmıştır.



Şekil 39. Dimetil litospermik asit B kütle spektrumu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

34 numaralı madde: *m/z* 313 [M−H] molekülü üzerinde yapılan çalışmalar sonucu (Şekil 40): Kütle spektrumunda, 313 ve 133 iyonları arasındaki 180 amu'luk fark dikkat çekmiştir ve bunun bir kafeik asit kopması olduğunu düşündürmüştür. 313 ve 269 arasındaki farktan ileri gelen 44 amu CO_2 çıkışı ile meydana gelmiştir. Salvianolik asitlerin kafeik asit türevi olmaları araştırmaların salvianolik asitler üzerine yoğunlaşmasını sağlamış ve yapılan kaynak araştırmaları sonucu salvianolik asit F'nin aynı molekül ağırlıkta olduğu görülmüştür. Chem Draw üzerinde yapılan parçalamalar ve kaynak destekli fragmentler sonucu 161 molekül ağırlıklı iyonunda dihidroksi benzen kopmasından ileri geldiği anlaşılmıştır ve molekül salvianolik asit F olarak tanımlanmıştır. (Liu ve ark., 2007a ve b). Bu molekül hakkında şüphe uyandıran tek şey alıkonma zamanının rozmarinik asitten sonra olmasıdır. Bu konudaki yayınlarda rozmarinik asitten önce geldiği (Chen ve ark., 2011) ve bazı yayınlarda ise rozmarinik asitten sonra geldiği (Barros ve ark., 2013) ile ilgili bilgiler mevcuttur. Barros ve arkadaşları bu durumu yayınlarında belirtmişler ve molekülü salvianolik asit F izomeri olarak adlandırmışlardır.



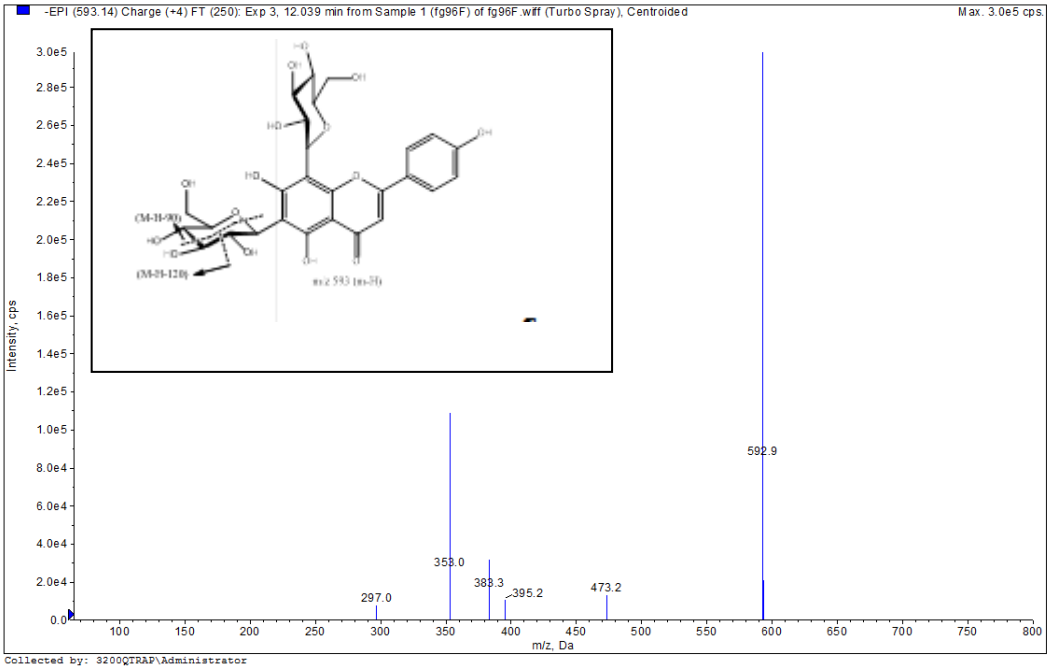
Şekil 40 Salvianolik asit F ye ait kütle spektrumu ve parçalanması

Flavonoit glikozitleri

Flavonoit glikozitlerin kütle spektrumlarının incelenmesinde aglikona ait iyon pikinin belirlenmesi ve bu pik ile moleküler iyon piki ile arasındaki farkın (glikonun) yorumlanmasına yönelik incelemelerde bulunulmuştur. Bu yöntem O glikozitlerinde yorum yapılmasına olanak sağlasada C glikozitlerinde geçerliliğini yitirmiştir. Böylesi durumlarda glikon kısmına ait yapı önce belirlenmiş ve moleküler iyon piki ile arasındaki fark (aglikon) belirlenerek yapı aydınlatılmaya çalışılmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

35 numaralı madde: Tutunma zamanı 12. dakika olan ve molekül ağırlığı 593[M-H] bağıl yoğunluğu en yüksek parçalanma ürünü *m/z* 473 olan ve devamında *m/z* 383 ve *m/z* 353 parçalanmaları gösteren madde üzerinde yapılan çalışmalar sonucu (Şekil 41): Spektrum incelendiğinde ilk bakışta molekül ile ilgili bir ipucu elde edilememiştir. Bu durumda molekülün bir C-glikoziti olma ihtimali üzerinde durulmuştur. C-C bağlarının kolayca parçalanamaması sebebiyle C glikozitlerinin kütle spektrumlarında glikoziti oluşturan aglikon kısımlarına rastlanamamaktadır. Buna karşın şeker molekülünde bulunan C-O bağlarının birbirinden ayrılması ile oluşan 90 amu ve 120 amu'luk karakteristik kopmalar gözlenmektedir (Parejo ve ark., 2004a). *m/z* 473(M-H-120) *m/z* 353 (M-H-120-120) ve *m/z* 383 (M-H-120-90) bu şekilde parçalanmalar göstermişlerdir. Bu bilgiler ışığında bileşiğin 2 hekzoz içerdiğini (glukoz veya galaktoz) söyleyebiliriz. İki glukozun molekül ağırlığı 324 amu yapar. Bu glikozitin glikon kısmı ise aglikon kısmı 593-324=269 dur. *m/z* 269[M-H] karakteristik apigenin molekül ağırlığıdır. Apigenin'in formülüne bakacak olursak C'na bağlanacak muhtemel bağlanma yerlerinin de 6 ve 8 numaralı karbonlar olduğu görülecektir. Dolayısıyla bu madde 6-8 dihekzozil apigenin (apigenin 6,8-C diglukozit) olarak tanımlanmıştır ve kaynak bilgilerine uygundur (Parejo ve ark., 2004b).



Şekil 41. 6,8-Dihekzozil Apigeninin kütle spektrumu ve parçalanması

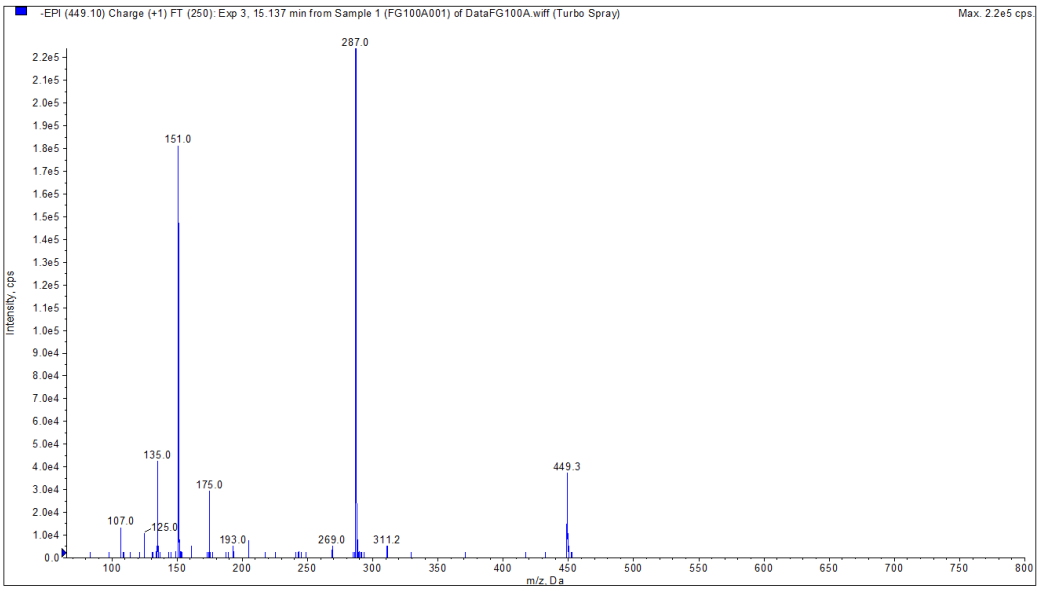
36 numaralı madde: 15.3 tutunma zamanı ile kolonu terk eden, *m/z* 449 [M-H] moleküler iyon piki ile birlikte *m/z* 287 temel piki gözlenen spektrum üzerin de yapılan incelemelerde (Şekil 42) ilk dikkati çeken temel pik olmuştur. *m/z* 287 eriodiktiyole ait molekül ağırlığıdır ve takip eden parçalanmalar da eriodiktiyol parçalanmalarıdır. Moleküler iyon piki *m/z* 449 ile temel pik eriodiktiyol arasındaki 162 amu'luk fark bir glukoz molekülünü işaret etmekte molekülün çok kuvvetli bir olasılıkla eriodiktiyol glukozit olduğunu düşündürmektedir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Daha sonra değineceğimiz bir başka molekül olan eriodiktiyol 7-O-rutinozit de benzer bir tutunma zamanı ile kolonu terk etmiştir ve rutinozların glukoz ve ramnoz kondensasyonundan oluştuğu düşünülecek olursa muhtemeldir ki asit hidroliz esnasında eriodiktiyol rutinozitten bir molekül ramnoz kopmuş ve eriodiktiyol glukozit oluşmuştur.

Burada çelişki yaratan bir durum varsa oda maddenin tutunma zamanıdır: Her ne kadar eriodiktiyol rutinozit ile aynı tutunma zamanında gelmiş olsada bu maddenin tutunma zamanı, polaritesi ve kullanılan kolon göz önüne alındığında erodiktiyol rutinozitden biraz daha yüksek olması beklenirdi.

Tutunma zamanındaki bu farklılık asitliğin polariteyi arttırmış ve tutunma zamanını öne çekmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir veya aglikon olarak eriodiktiyol yerine eriodiktiyol ile aynı molekül ağırlıklı olabilecek hidroksi apigenin, fustin gibi diğer moleküllerle oluşmuş bir glikozitten bahsediyor olabiliriz ki bu ihtimalde asit hidrolizi ve diğer ekstrelerde birden fazla *m/z* 287 molekülü görülmesini gerektirirdi. Bu ihtimali göz ardı eden unsur ise şu olmuştur: *m/z* 287 tüm bitkide bir tane bulunmuş ve oda eriodiktiyol olarak standart ile teyit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında madde eriodiktiyol glukozit olarak adlandırılmıştır.

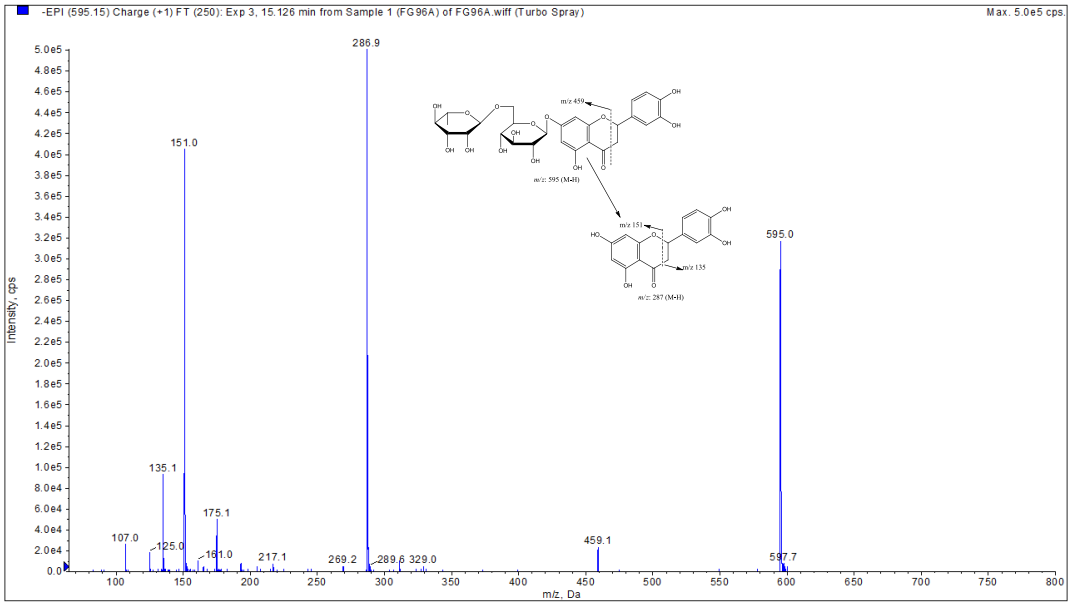


Şekil 42. Eriodiktiyol glukozit kütle spektrumu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

37 numaralı madde: 15.3'üncü dakikada kolonu terk eden bileşiğin *m/z* 595 (M - H) molekül ağırlıklı ve bir rutinoz kaybı ile oluşan, *m/z* 287 temel pikli (M - H-308) olduğu görülmüştür (şekil 43). Bu durum molekülün eriodiktiyol rutinozit olasılığını düşündürmüş ve *m/z* 287 temel pikine ait diğer parçalanmalar incelenmiştir. Parçalanmaların *m/z* 269 *m/z* 151 ve *m/z* 135 olarak görülmesi standart eriodiktiyol parçalanmaları olduğunu doğrulamıştır. Böylece molekül eriodiktiyol rutinozit olarak ve standart eriositrin kullanılarak yapılan çalışmalar ile de molekül eriodiktiyol-7-rutinozit (eriositrin) olarak adlandırılmıştır. Bu sonuç kaynak bilgileri ile de doğrulanmıştır (Gattuso ve ark., 2006) .

38 numaralı madde: 18.3'üncü dakikada kolonu terk eden ve *m/z* 579 [M-H] molekül ağırlıklı ve *m/z* 271 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 44): temel pikten sonra bağıl yoğunluğu en çok olarak görülen *m/z* 417 (y_1) pikinin moleküler iyon pikinden 162 kayıpla (gukoz kaybı) oluştuğu, temel pik olan 271(y_0) in ise glukoz kopması ardından 146 (ramnoz) kaybı ile ortaya çıktığı görülmüştür. Bu durumda molekülün aglikon kısmı glikoz ve ramnoz dan oluşan bir disakkarit olmalıdır. Yani rutinoz veya neohesperidoz olmalıdır. Bu 2 disakkarit de glukoz ve ramnoz kondensasyonundan oluşur ve molekül ağırlığı 308'dir fakat birbirlerine bağlanma pozisyonları farklıdır (rutinozda: ramnoz ve glukoz (1-6) şeklinde bağlanırken neohesperidozda: ramnoz ve glukoz (1-2) glikozitik bağları ile birbirlerine bağlanırlar).



Şekil 43. Eriositrine ait kütle spektrumu ve parçalanması

Rutinozitlerin ve hesperiozitlerin birbirinden ayırt edilmeleri konusunda iki farklı görüş vardır: ilk görüşe göre, moleküler iyon piki ve temel pik arasında başka parçalanma görülmemesi (disakkarit parçalanması olmaması) molekülünün bir rutinoz olduğunu göstermektedir (Sánchez-Rabaneda ve ark., 2003a). İkinci bir görüşün sahibi olan Cuykens ve arkadaşları durumun tam tersi şeklinde olduğunu, rutinozitlerin parçalanmalarının neohesperiozit lerden daha fazla olduğunu

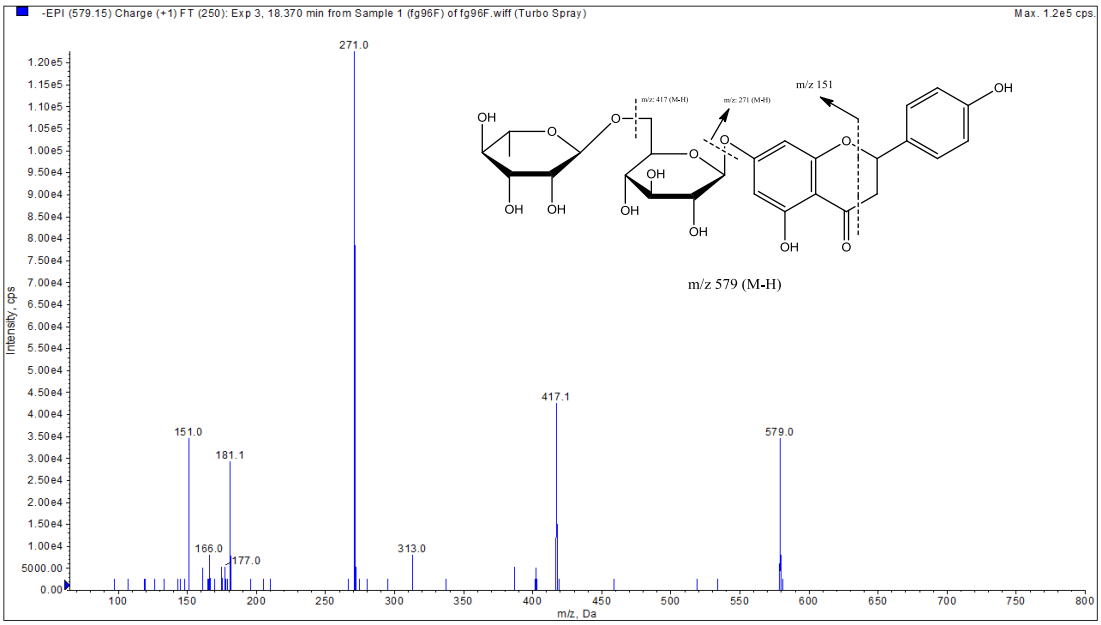
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

belitmektedirler (Cuyckens ve ark., 2004). Standart olarak kullanılan rutinozitlerden yola çıkarak oluşturduğum şahsi görüşüm ise: bu konuda Cuyckens ve arkadaşlarının genel olarak haklı olduğu rutinozitlerde parçalanmanın daha fazla olacağı yönündedir (y_0/y_1 oranının neohesperozit lerde daha büyük olacağı) fakat hesperidin (hesperetin rutinozit) gibi bazı rutinozitlerde ise Sanches ve arkadaşlarının görüşüne göre parçalanma görülmüştür. Bundan sonraki değerlendirmelerde eğer standart kullanılmadıysa bu iki görüş de doğru kabul edilmiş ve rutinozitler ve neohesperozitler arasında bir ayrım yapılmamıştır.

Aglikon olarak görülen *m/z* 271 iyonu ise karakteristik naringenin parçalanmaları göstermiştir. (*m/z* 181 ve *m/z* 151) ve yukardaki açıklamalar ışığında (düşük y_o/y_1 oranı) molekül naringenin-7-O-rutinozit (narirutin) olarak adlandırılmıştır. Bu sonuç kaynak bilgileri ile de uyumludur (Parejo ve ark., 2004b). Standart narirutin kullanılarak yapılan çalışmalarda sonucu doğrulamaktadır.

Yapılan analizlerde *m/z* 593[M-H] molekül ağırlıklı ve *m/z* 285 temel pike sahip 2 adet moleküle rastlanmıştır (Şekil 45).

39 numaralı madde: Tutunma zamanı 18.8 olan ilk molekülün ayrıntılı kütle spektrumu analizlerinde (Şekil 46) *m/z* 285 iyonunun 256, 227, 199, 133, 107 parçalanmaları gözlenmiştir ki bu parçalanmalar luteolinin karakteristik parçalanmalarıdır (Gates ve ark., 2012). Fakat benzer parçalanmalar molekül formülünde bir OH grubunun yer değiştirmesi ile oluşan kamferol için de geçerlidir.



Şekil 44. Naringenin rutinozite ait kütle spektrumu ve parçalanması

Moleküler iyon piki ve temel pik arasında oluşan 308'lik fark ise, bir ramnoz ve glukoz birleşmesinden oluşan, rutinoz veya neohesperiodoz olmalıdır bu 2 disakkarit arasında ki tek fark ise ramnoz ve glukozun bağlanma pozisyonlarından kaynaklanmaktadır. Moleküler iyon piki ve aglikon piki arasında parçalanma görülmemiş olması (yüksek y0/y1 oranı) molekülün

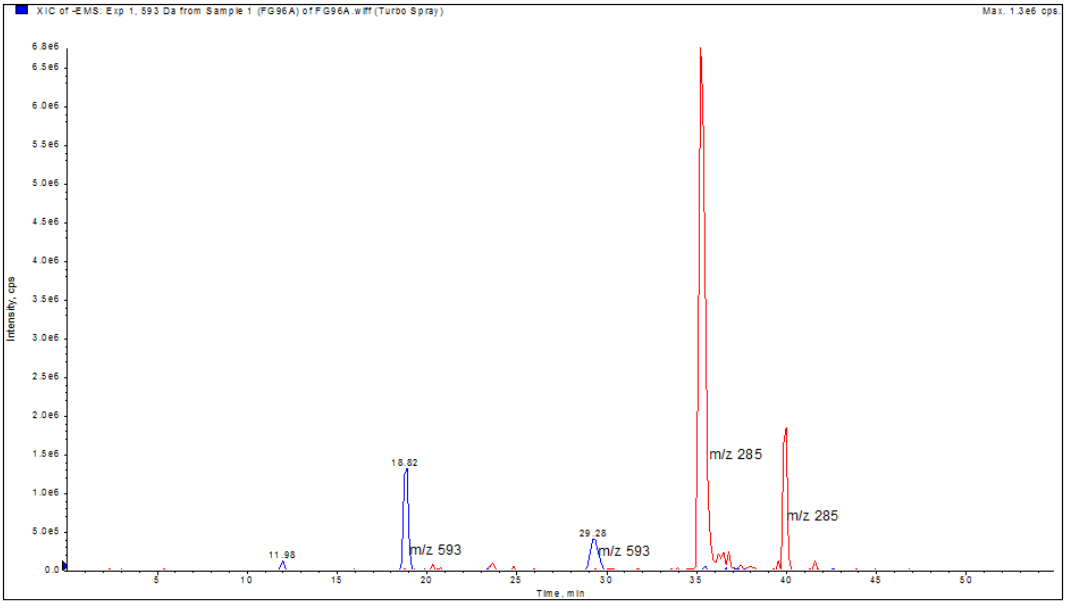
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

luteolin/kamferol neohesperiosid (veya bir başka görüşe göre rutinozit) olabileceğini düşündürmüştür. m/z 285 ağırlıklı moleküle bitkide iki yerde rastlanıldığı göz önüne alındığında ise (şekil 45) molekül luteolin rutinosit olarak adlandırılmıştır.

46 numaralı madde: *m/z* 593 molekül ağırlık bir başka pik ise 29.1 tutunma zamanı ile kolonu terk eden ve *m/z* 285 temel pikli moleküldür. *m/z* 285 iyonunun ayrıntılı parçalanmaların da (Şekil 47) ise *m/z* 270, 243, 226 ve 164 iyonları gözlenmiştir. Bu parçalanmalar dikkatli incelendiğinde 270 iyonu göze çarpmaktadır. Bu durum madde de bir metil grubu olduğunu göstermektedir. Şartlar böyle iken yapısında metil taşıyan ve molekül ağırlığı 285 olan glikonlar arasında sakuranetin (7-metil naringenin) ve izosakuranetin (4'-metilnaringenin) (şekil 48) bulunmaktadır. Naringeninin bitkide aglikon olarak da bulunması sakuranetin veya izosakuranetin ihtimallerini oldukça arttırmıştır.

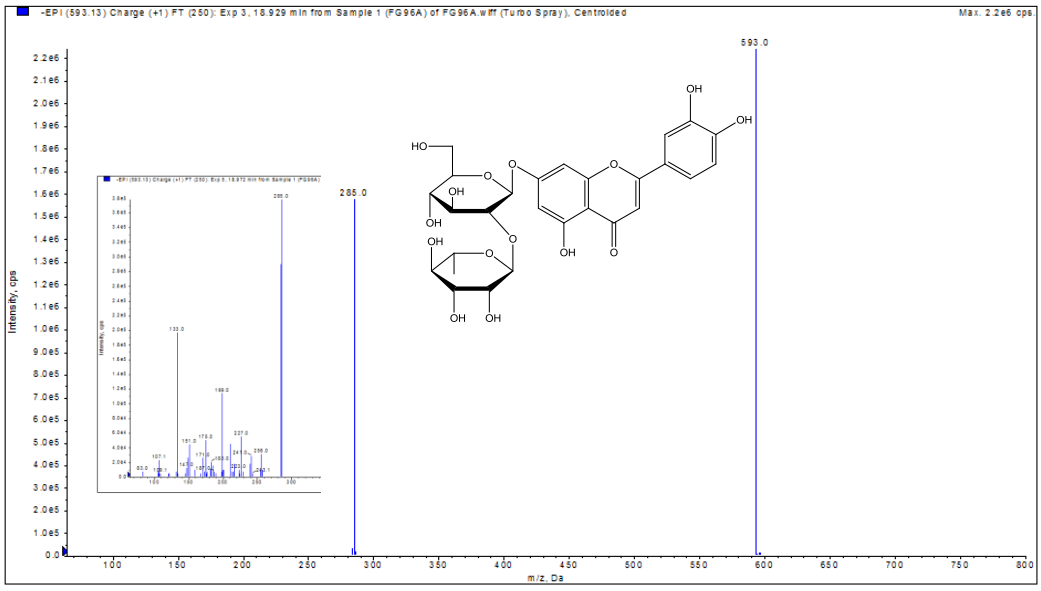
Sakuranetin'in metillenmeyi 7 nolu karbon üzerinden yapmış olması bir glikonla bağlanma oranını düşürmüştür. Bu durumda ilgi izosakuranetin üstünde yoğunlaşmıştır. Kaynaklar da bu durumu doğrular niteliktedir. *m/z* 270, 243, 226 ve 164 karakteristik izosakuranetin parçalanmalarıdır (Fabre ve ark., 2001; Silberberg ve ark., 2006). Moleküler iyon piki *m/z* 593 ve temel pik *m/z* 285 arasındaki 308 amu'luk fark rutinoz veya neohesperidoz olmalıdır. Cuyckens ve arkadaşlarının görüşüne göre 327 ve 309 luk parçalanmalar görülmesi, y_1 iyonunun görülmemesi y_o/y_1 oranını arttırdığından, molekülünün bir neohesperidoz olarak tanımlanmıştır (Cuyckens ve ark., 2004). Bu durumda 29.1 tutunma zamanı ile kolonu terk eden molekül izosakuranetin-7-neohesperosit (ponsirin) olarak adlandırılmıştır.

Bu moleküllere ait aglikonlarda kolonu 35. dakikada luteolin (Şekil 49) ve 40.dakikada izosakuranetin (Şekil 50) olarak terk etmişlerdir.

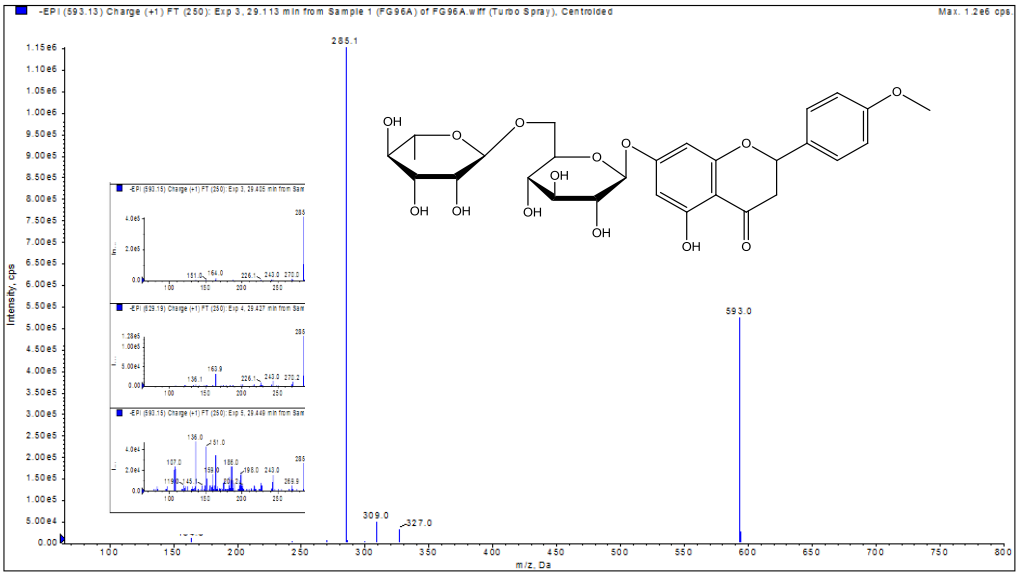


Şekil 45. ***m/z*** **593[M-H] ve** ***m/z*** **285 [M-H] moleküllerini gösterir bir iyon kromatogramı**

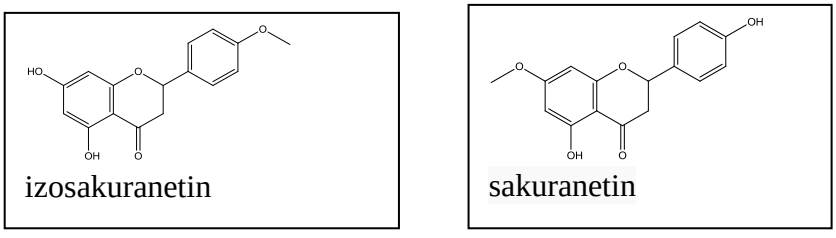
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 46 Luteolin neohesperosit kütle spektrumu

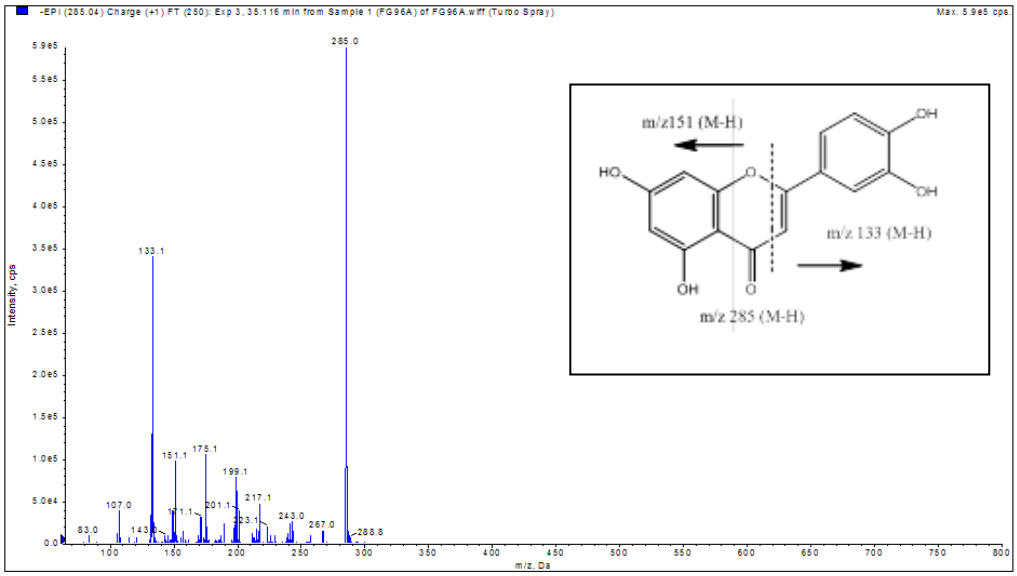


Şekil 47 izosakuranetin-7-rutinozit kütle spektrumu

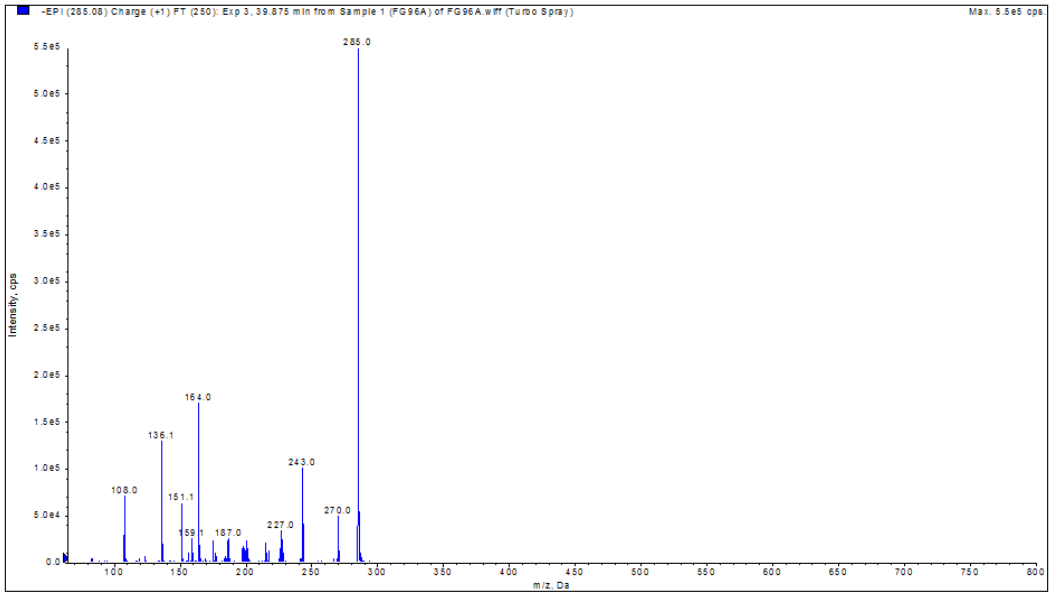


Şekil 48 izosakuranetin ve sakuranetin'e ait formüller

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



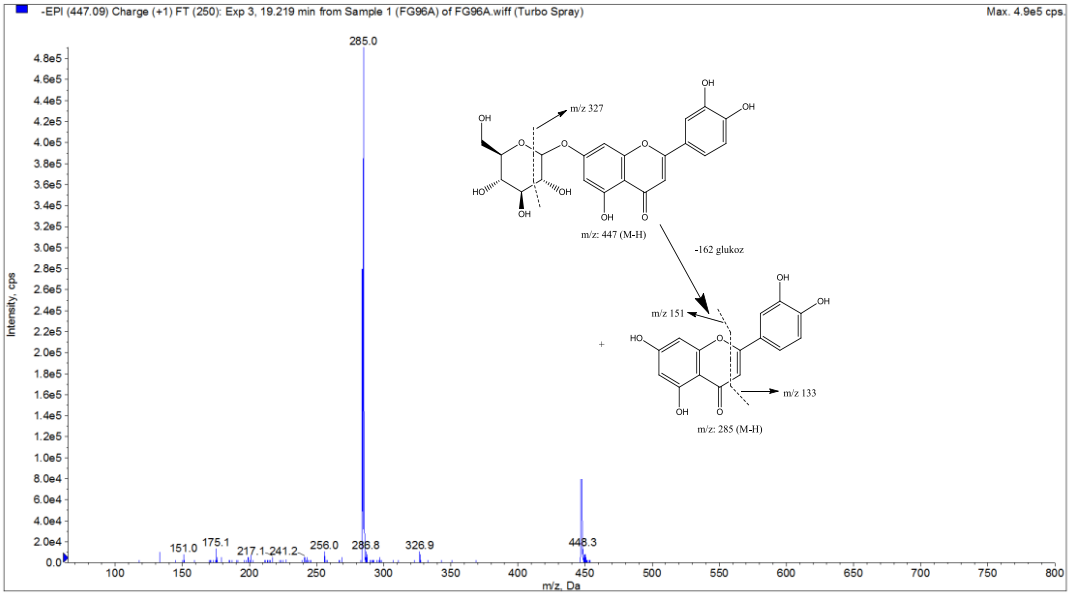
Şekil 49. Luteoline ait kütle spektrumu ve parçalanması



Şekil 50. izosakuranetine ait kütle spektrumu

40 numaralı madde: *m/z* 447 [M-H] moleküler iyon pikli ve bağıl yoğunluğu en fazla olan *m/z* 285 (luteolin) parçalanma ürünlü molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu *m/z* 285 parçalanmasının ana molekülden bir hekzoz ve büyük bir ihtimalle glukoz (-162) kopması ile oluştuğu anlaşılmıştır. Bu durumda molekül luteolin glukozit olarak tanımlanmıştır. Standart madde kullanılarak bu molekülün Luteolin-7-O glukozit olduğu anlaşılmıştır (Şekil 51) (Fu ve ark., 2010)

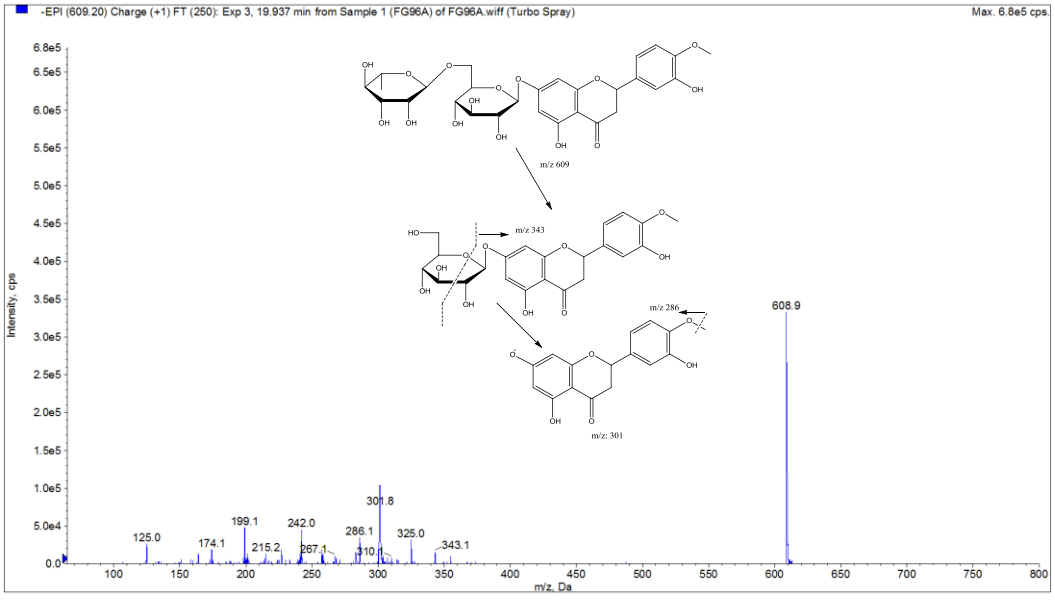
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 51. Luteolin glukoziti kütle spektrumu ve parçalanması

41 numaralı madde: *m/z* 609 [M-H] moleküler iyon pikli ve bağıl yoğunluğu en fazla olan *m/z* 301 parçalanma ürünlü molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 52) *m/z* 301 parçalanmasının ana molekülden bir rutinoz veya neohesperidoz kopması sonucu oluştuğu görülmektedir. Temel pik olan *m/z* 301'in bir kersetin olduğu yanılgısına çok çabuk düşülebilir. Bu durumda aynı molekül ağırlıklı bir diğer molekül olan hesperetin de düşünülmelidir. Hesperetin molekül formülünde bir metil grubu varken kersetinde böyle bir grup yoktur dolayısıyla metil kopması öncelikli olarak gözlenecektir. Aşağıdaki spektrumda da *m/z* 286 olarak gözüken bu pik kersetin de görülmeyecektir.

Bu bilgiler ışığında molekül hesperetin-7-O-rutinozit (hesperidin) olarak tanımlanmış ve standart hesperidin kullanılarak da doğruluğu teyit edilmiştir.

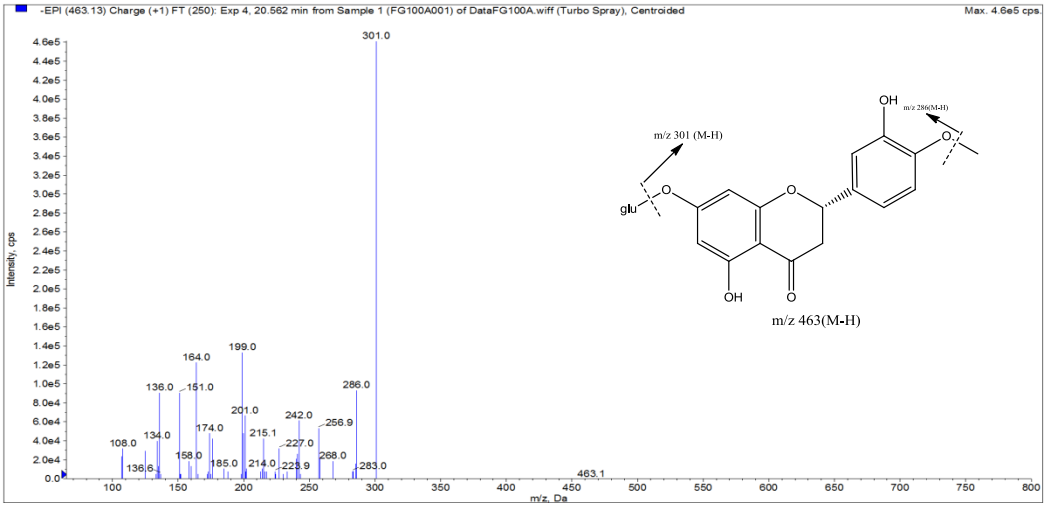


Şekil 52. Hesperidinin kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

42 numaralı madde: *m/z* 463 molekül ağırlıklı ve 301 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 53) moleküler iyon piki ve temel pik arasındaki 162 amu'luk fark bu molekülün bir glukozit veya galaktozit olduğunu göstermektedir. Temel pik *m/z* 301 ve *m/z* 286 arasındaki 15 amu'luk fark bir metil grubunu işaret etmektedir. Hesperetin yapısında metil bulunan ve 302 amu ağırlıklı bir flavanondur. Elimizde standart hesperetin olmamasına rağmen standart hesperidin (hesperetin-7-rutinozit) bulunmaktadır. Hesperidin'nin rutinoz kopması sonrası oluşan *m/z* 301 (hesperetin) parçlanmaları ile bu molekülün *m/z* 301 parçalanmaları birebir uyuşmaktadır.

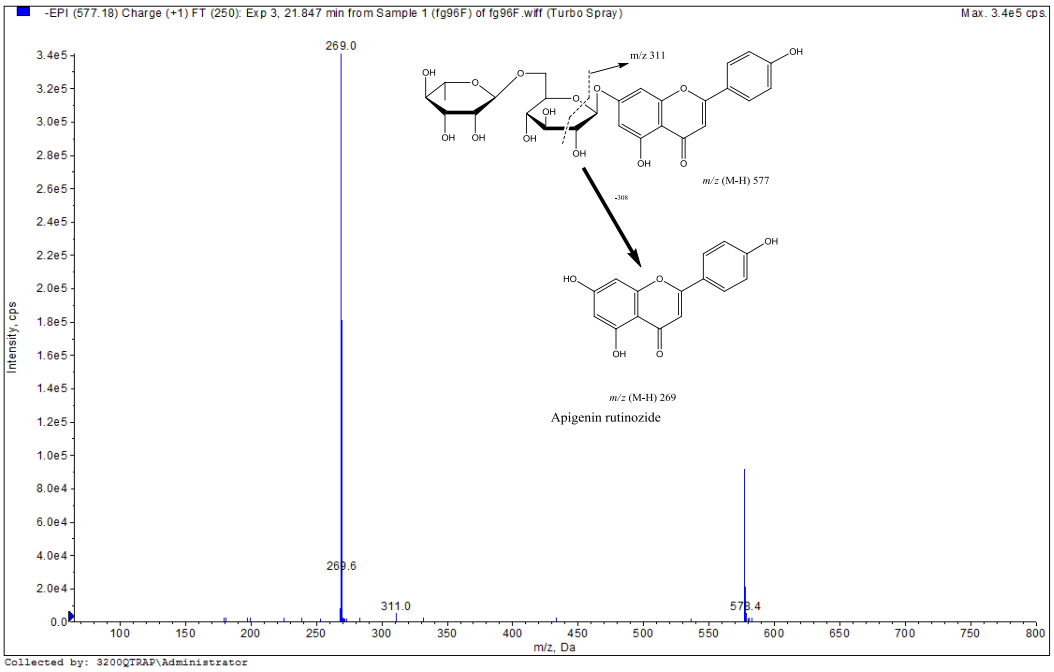
Bu bilgiler ışığında molekül hesperetin glukozit (veya galaktozit) olarak tanımlanmıştır.



Şekil 53. Hesperetin glukozitin kütle spektrumu ve parçalanması

43 numaralı madde: 21.8'inci dakikada gelen *m/z* 577([M - H]) molekül ağırlıklı madde ve ([M - H]-308)'lik bir kayıpla oluşan karakteristik parçalanma ürünü olan *m/z* 269 luk temel pik (Şekil 54) bu maddenin bir apigenin türevi olduğunu göstermektedir. Oluşan *m/z* 308 lik fark ise rutinoz kaybından ileri gelmektedir (Sánchez-Rabaneda ve ark., 2003a). Bu madde apigenin rutinozit (izoroifolin) olarak tanımlanmıştır. Bu maddeye ait doğrulama işlemi eldeki standartları kullanarak yapılmıştır.

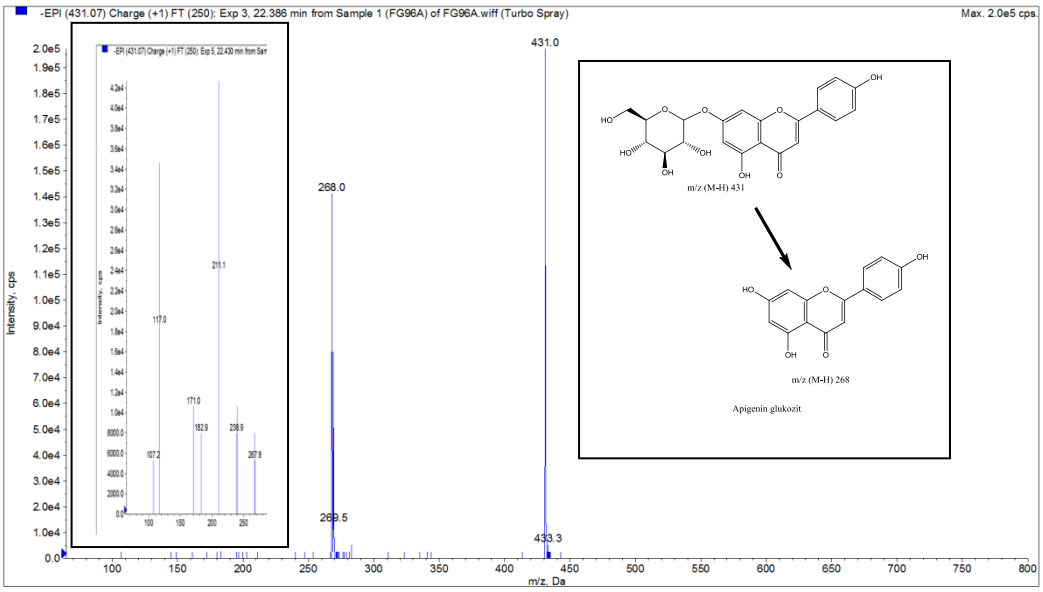
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 54 Apigenin rutinozit ait kütle spektrumu ve parçalanması

44 numaralı madde:

Molekül ağırlığı *m/z* 431 ve temel piki *m/z* 269 (apigenin) olan molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 55) moleküler iyon piki ve temel pik arasında görülen 162 amu'luk farkın glukoz veya galaktoz molekülünden geldiği anlaşılmaktadır. Standart madde kullanılarak yapılan incelemelerde molekülün apigenin glukozit olduğu anlaşılmıştır. Bu molekül ve spektrum verileri kaynak bilgileri de uyumludur (Sánchez-Rabaneda ve ark., 2003b).



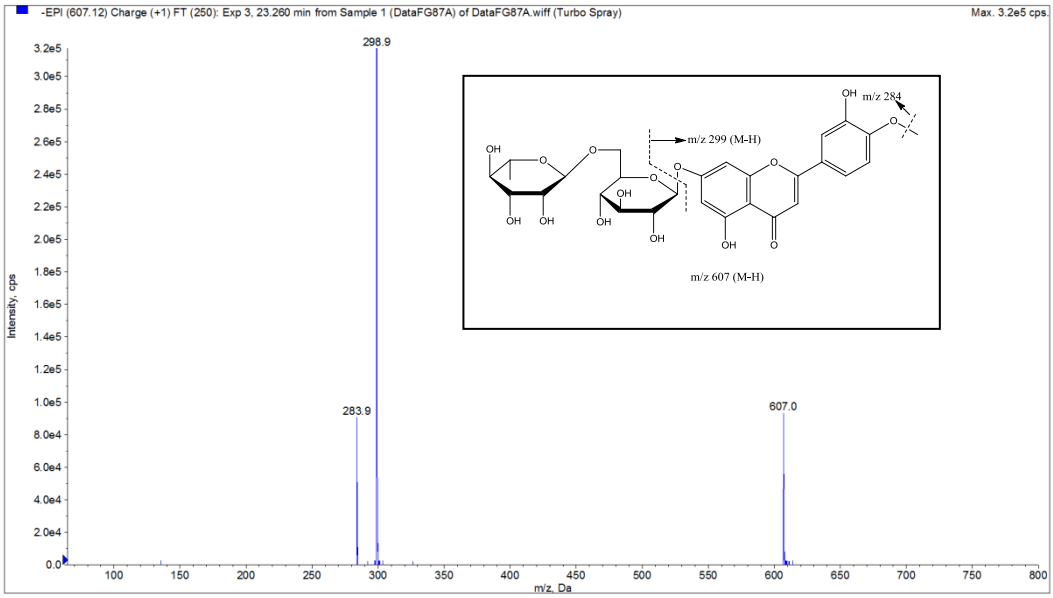
Şekil 55. Apigenin glukozit kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

45 numaralı madde: Tutunma zamanı 23.3 olan *m/z* 607 molekül ağırlıklı ve *m/z* 299 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemede (Şekil 56): Moleküler iyon piki olarak görülen *m/z* 607 ve temel pik *m/z* 299 arasındaki 308amu'luk fark bir rutinoz kaybı ile oluşmuş olmalıdır. O halde aglikonu 300 amu olan bir molekül ile rutinoz birleşmesi söz konusudur.

Aglikon olarak molekül ağırlığı 300 amu olan ve bir metoksi grubu taşıyan: 5,7,4'-trihidroksi-3'-metoksi-flavone (krisoseriol) ve luteolin 4' metil eter (diosmetin) 3',5,7-trihidroksi-4'-metoksizoflavon (pratensein), 4',5,7-trihidroksi-6,8-dimetilflavanon (farresol), geraldol, kamferol 4'-metil eter (kamferit). vb moleküller bu tanımlamalara uymaktadır ve benzer parçalanmalar göstermektedir (Justesen, 2000; Wang ve ark., 2008; Hossain ve ark., 2010).

Biyosentetik olarak düşünüldüğünde bu molekülün luteolin türevi olması kuvvetli bir ihtimal olarak görülmektedir. Zira ayni ekstrede luteolin'in diğer türevlerine de rastlanmıştır. Bu bilgiler ışığında madde diosmetin (luteolin 4' metil eter) rutinozit bilinen bir başka adıyla diosmin olarak adlandırılmıştır.



Şekil 56. Diosmin ait kütle spektrumu ve parçalanması

Flavonoit glukuronitleri

Bazı flavonoitlerin yapısında şeker olarak hekzoz oksidasyon ürünü uronik asitler yer alır. En sık rastlanan uronik asit ise glukuronik asittir. Glukuronik asitin flavonoitler ile birleşmesi sonucu flavonoit glukronitler oluşmaktadır ve bu grup moleküllerde moleküler iyon piki ve temel pik arasında karakteristik olarak 176 amu (glukuronik asit – H_2O) fark görülmektedir.

m/z 461 moleküler iyon piki gözlenen ve 285 temel pikli moleküle iki farklı tutunma zamanında (20.5 ve 30.1) rastlanmıştır (Şekil 57).

47 numaralı madde: 20.5 de gelen *m/z* 461 molekül ağırlıklı ve *m/z* 285 ve 161 ana fragmentli madde üzerinde yapılan çalışmada (Şekil 58) 2 farklı ihtimal üzerinde durulmuştur:

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

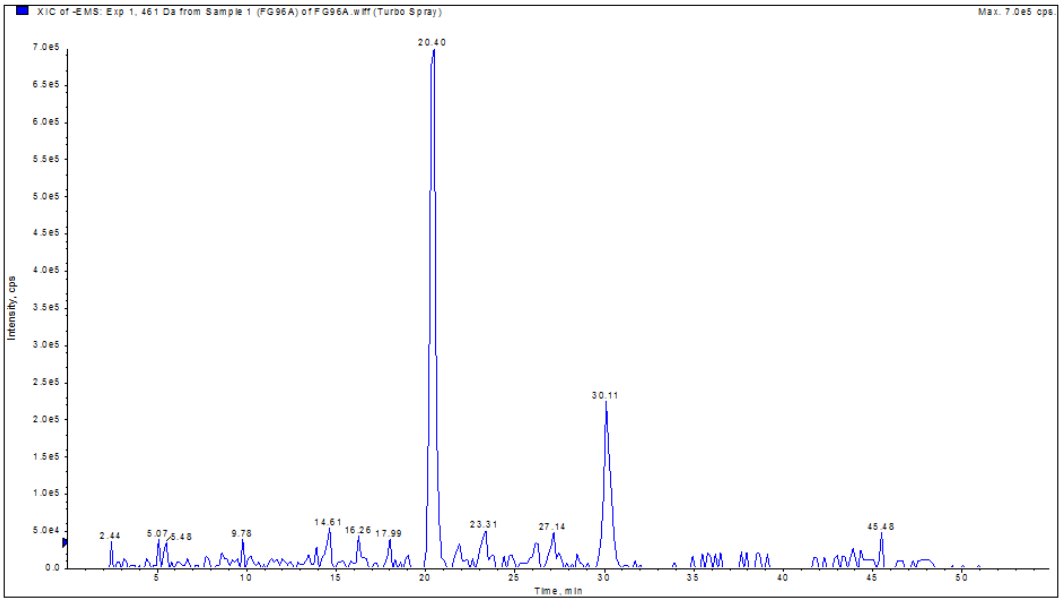
1. Olasılık: 461'den kopan 176 lık kayıp glukuronik asit ve *m/z* 285 molekül ağırlıklı maddenin de luteolin veya kamferol olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla *m/z* 461 kamferol veya luteolin glukronit olacaktır. Fakat moleküler iyon piki ve temel pik kullanılarak yapılan bu değerlendirme de *m/z* 161 ve *m/z* 179 iyonları luteolin ve kamferol karakteristik parçalanma pikleri değildir. Şurası da unutulmamalıdır ki flavonoit parçalanmaları aynı molekül için farklı şekiller de görülebilir (Justesen, 2000). Negatif iyonlaşma modu kullanıldığında çok kesin kurallar için de parçalanmalar görülememektedir. Her ne kadar çok alışıla geldik olmasa da, *m/z* 161 ve *m/z* 299 pikleri sırasıyla $^{1.4}B^-$ ve $^{1.4}A^-$ parçalanmaları sonucu oluşmuş olabilir).

2. Olasılık: Moleküler iyon piki *m/z* 461 ve *m/z* 299 arasında oluşan 162 amu'luk farktır. İlk bakışta bu fark bir glukoz veya galaktoz olarak düşünülsede *m/z* 179 ve *m/z* 161 parçalanmaları bir kafeik asit türevini dolayısı ile 162 lik farkın bir kafeoil kopması olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla bu molekül molekül ağırlığı 300 amu olan (diosmetin, kamferit, krisoeriol) bir flavon ile kafeik asit birleşmesi ile de oluşmuş olabilir. Fakat bu ihtimal de *m/z* 299 pikinin bağıl yoğunluğunun düşüklüğü ile şüphe uyandırmaktadır

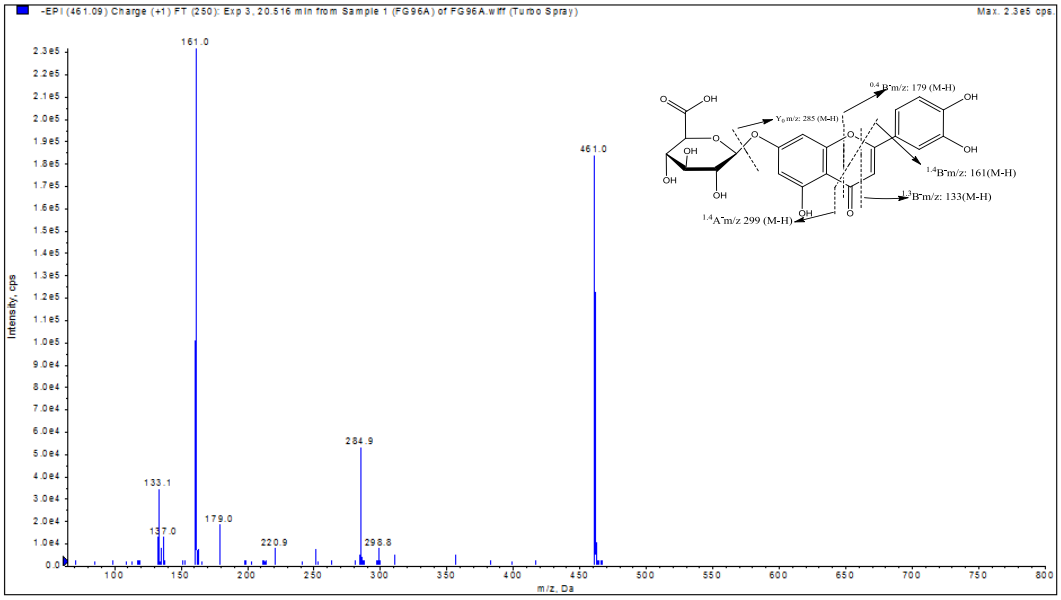
47 numaralı maddenin tam olarak doğru değerlendirilmesi ancak maddenin asetatlı (vb) bir formunun oluşturulması ve oluşan pikin molekül ağırlığı üzerinden yorum yapılarak olabilecektir. Fakat bu çalışma için bu mümkün olamamıştır.

50 numaralı madde: 30.1 de görülen diğer *m/z* 461 moleküller iyon pikli ve 285 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 59) 461 den kopan 176'lık kayıp glukronik asit ve *m/z* 285 molekül ağırlıklı maddenin de luteolin veya kamferol olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla *m/z* 461 kamferol veya luteolin glukronit olacaktır. Fakat aglikonun kamferol olma ihtimali oldukça düşüktür. Çünkü ekstre üzerinde yapılan incelemelerde molekül ağırlığı 285 olan 2 ayrı moleküle rastlanmıştır (Şekil 45). Bunlardan biri standart luteolin kullanılarak tespit edilen luteolin diğeri ise izosakuranetin olarak belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda **51 numaralı madde** luteolin glukuronit olarak belirlenmiştir. 30.1'inci dakikada kolonu terk eden molekülde karakteristik izosakuranetin parçalanmaları görülmemesi (metil kopmasına rastlanmaması) molekülün luteolin glukuronit olduğunu göstermektedir. Rozmarinik asitten sonra gelmesi ise, 50 numaralı maddenin luteolin 3'-O glukuronit yapısında olduğu düşüncesini güçlendirmektedir (Barros ve ark., 2013).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

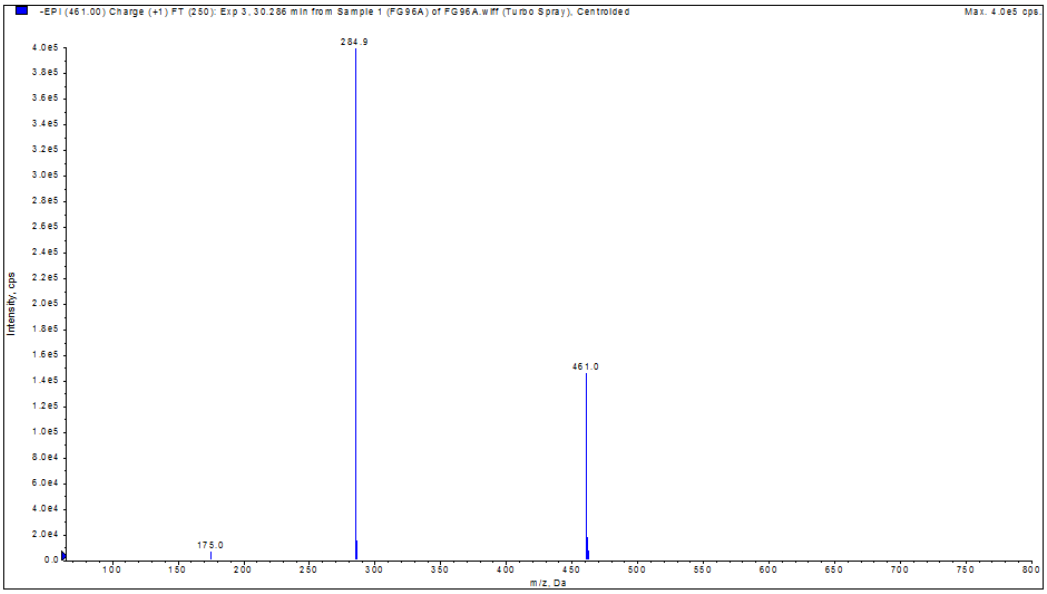


Şekil 57. *m/z* 461 molekül ağırlıklı moleküllerin seçilmiş iyon kromatografisi



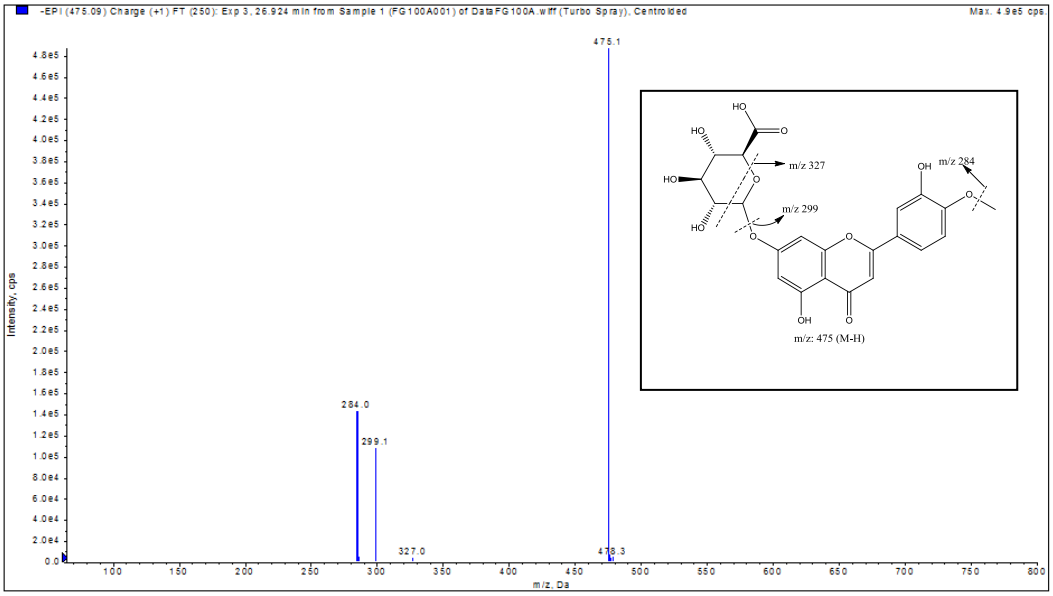
Şekil 58. 47 numaralı maddeye ait *m/z* 461 kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 59. Luteolin glukuronit kütle spektrumu

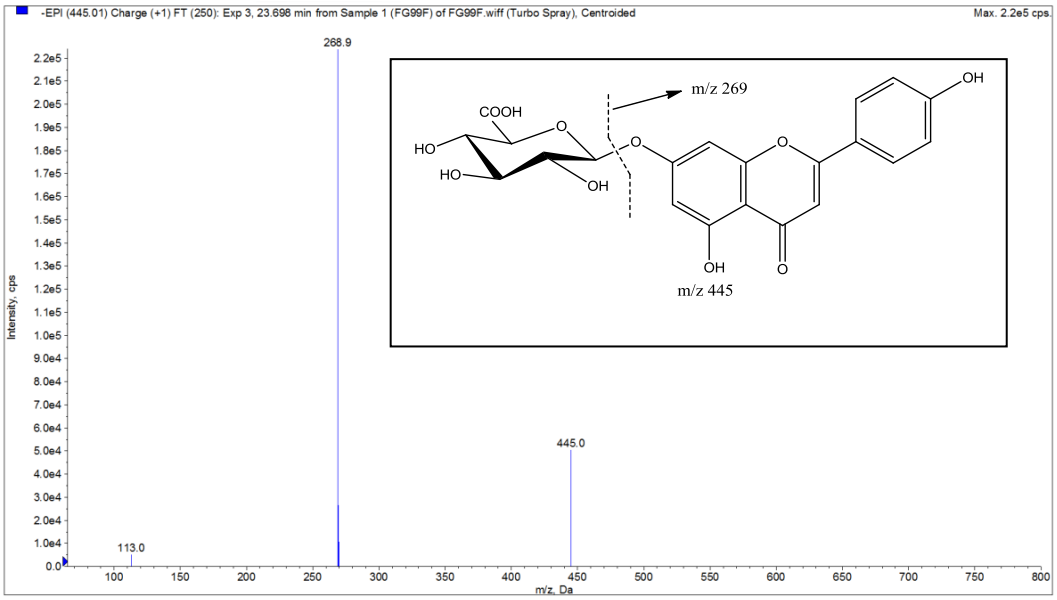
48 numaralı madde: Tutunma zamanı 26.9 olan ve *m/z* 475 [M-H] moleküler iyon piki ve *m/z* 284 temel pike sahip spektrum üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 60): Spektrumda ilk dikkat çeken *m/z* 299 ve *m/z* 284 pikleri olmuştur. Bu iki pik arasındaki 15 amu'luk fark bir metil grubundan kaynaklanmaktadır. Moleküler iyon piki *m/z* 475 ve *m/z* 299 arasındaki 176 amu'luk fark glukronik asit kaybından ileri gelmektedir. *m/z* 327 parçalanmasının glukronik asitin 0,2 bağ kopması sonucu oluştuğu düşünülmüştür. O halde aradığımız madde molekül ağırlığı 300 olan (diosmetin, kamferit, krisoeriol, Artokarpetin vb) ve bir metoksi grubu taşıyan bir aglikon ve bir glukronik asit birleşmesinden meydana gelmiştir. Ekstrede diosmetine (luteolin 4' metil eter) rastlanmış olması bu molekülünde diosmetin glukuronit olma ihtimalini güçlendirmektedir.



Şekil 60. Diosmetin glukuronit kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

49 numaralı madde: Tutunma zamanı 23.7 olan *m/z* 445 molekül ağırlıklı ve *m/z* 269 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemede (Şekil 61): moleküler iyon piki ve temel pik arasındaki 176 amu'luk fark bir glukuronik asit kopmasını işaret etmektedir. 269 ve ayrıntılı spektrumda görülen 117, 107, 151 ve 113 iyonları apigenine ait olmalıdır. Bu hali ile molekül apigenin glukuronid olarak adlandırılmıştır (176 amu bir galaktronik asit kopmasıda olabilir ama çok sık rastlanmayan bu durum göz ardı edilmiştir).



Şekil 61. Apigenin glukuronit parçalanma şeması ve kütle spektrumu

Flavonoit asetilglukozitleri

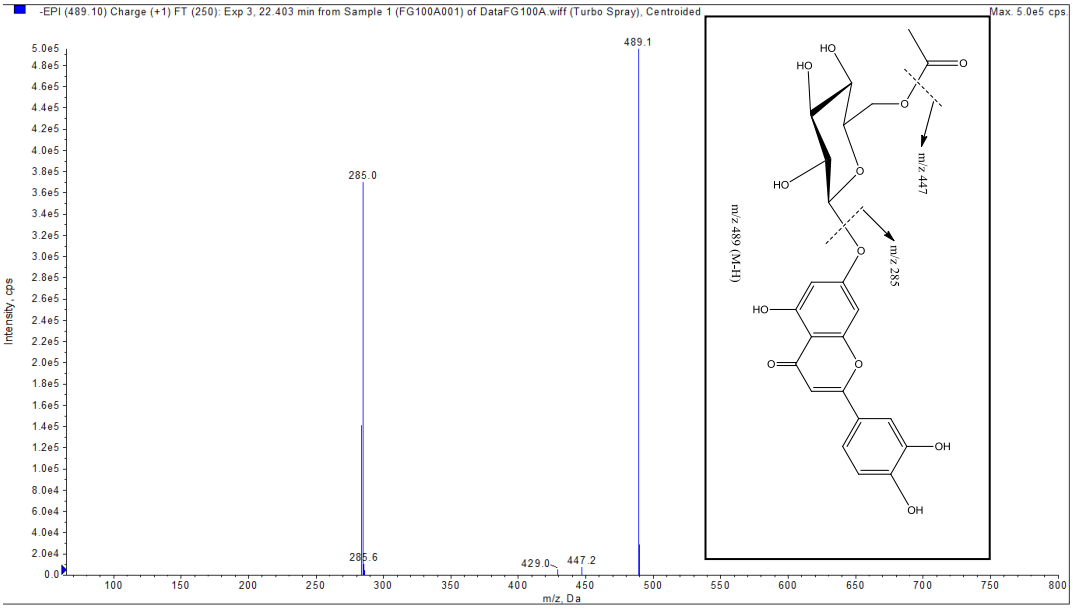
Flavonoit glikozitleri bazen şekerleri üzerinden asetillenebilirlerBu durum kütle spektrumunda 42 amu fark ile ortaya çıkar.

52 numaralı madde: Kolonu 23. dakikada terk eden *m/z* 489 molekül ağırlıklı ve *m/z* 285 temel pikli moleküller üzerinde yapılan incelemede (Şekil 62a): Kütle spektrumu luteolin glukozit kütle spektrumu ile oldukça benzerlik göstermektedir. Moleküler iyon piki *m/z* 489 ile luteolin glikozit *m/z* 487 arasında 42 amu'luk bir fark bulunmaktadır. Bu farkın bir asetil grubu olduğu düşünülmektedir ve molekülden de hemen ayrıldığı *m/z* 447 piki ile görülmektedir. *m/z* 429'un ise su çıkışı ile olduğu görülmektedir molekül bu hali ile aglikonu 286 amu olan bir flavonoit ile bir asetilglukozit birleşmesi ile meydana gelmiş olmalıdır. O halde madde ekstremizde aglikon olarak bulunan 285 [M-H] molekül ağırlığına sahip flavonoitlerden, luteolin veya sakuranetin (veya izosakuranetin) asetil glukozit olmalıdır. Fakat daha önce de üzerinde bahsedildiği gibi sakuranetin veya izosakuranetin ile ilgili olabilecek herhangi metil kopmasına rastlanmamış olması aglikonun luteolin olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Bu bilgiler ışığında madde luteolin asetil glukozit olarak tanımlanmıştır ve kaynaklarda luteolin-7-O-6"-asetilglukosid adıyla kayıtlı bir türüde bulunmuştur(Lin ve ark., 2010). Fakat şu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

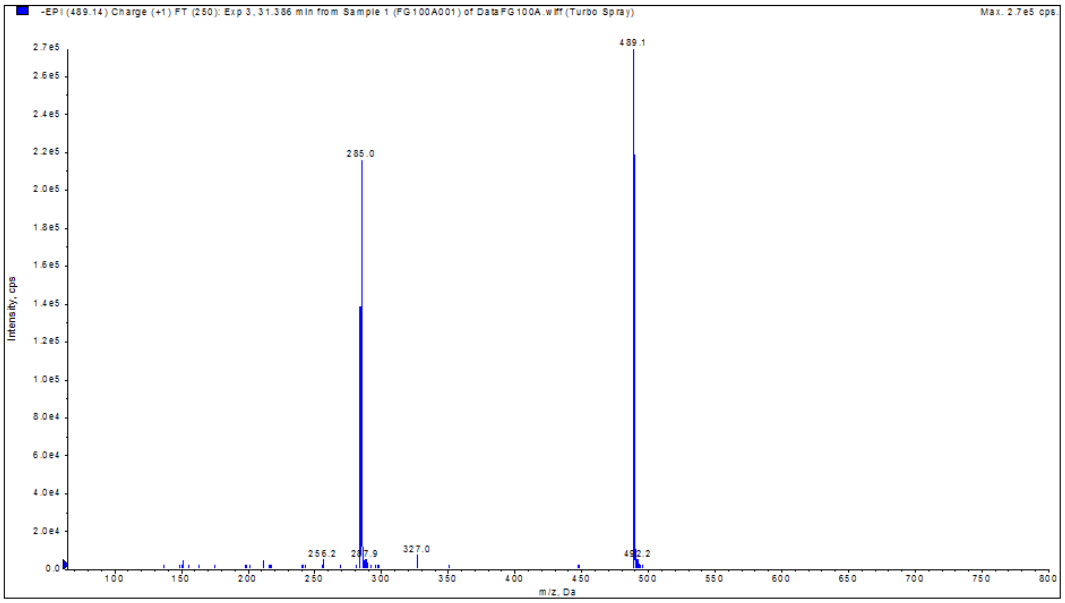
hali ile asetillenmenin, glukozun hangi (OH)'ı üzerinden olduğunu belirlemek mümkün olmamıştır.

53 numaralı madde: Kolonu 32. dakikada terk eden ve aynı molekül ağırlıklı ve aynı temel pike sahip bir diğer spektrum üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 62b) yukardaki açıklamalarla birebir örtüşen ve molekül ağırlığı 285 [M-H] olan bir aglikon ile bir asetil glukozit birleşmesi görülmektedir. Bu spektrum incelendiğinde izosakuranetine ait olabilecek bir parçalanmanın işaretleri görülmüştür: Buna göre molekülden metil grubu kopmuş ve ardından $^{0,4}A^-$ parçalanması oluşmuştur. Böylelikle *m/z* 327 iyonu oluşmuştur. (Metil grubunun önce kopması aglikonda *m/z* 270 iyonunun görülmesini engellemiş olmalıdır). Bu bilgiler ışığında molekül izosakuranetin 7-O asetilglukozit olarak tanımlanmıştır. Bu değerlendirme yapılırken sadece bu spektrum üzerinden değil bitkinin aglikon olarak taşıdığı *m/z* 285[M-H] moleküllerine ait spektrumların ve tutunma zamanlarının da dikkate alındığını belirtmek gereklidir.



Şekil 62a. Luteolin-7-O-asetilglukosit'e ait kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



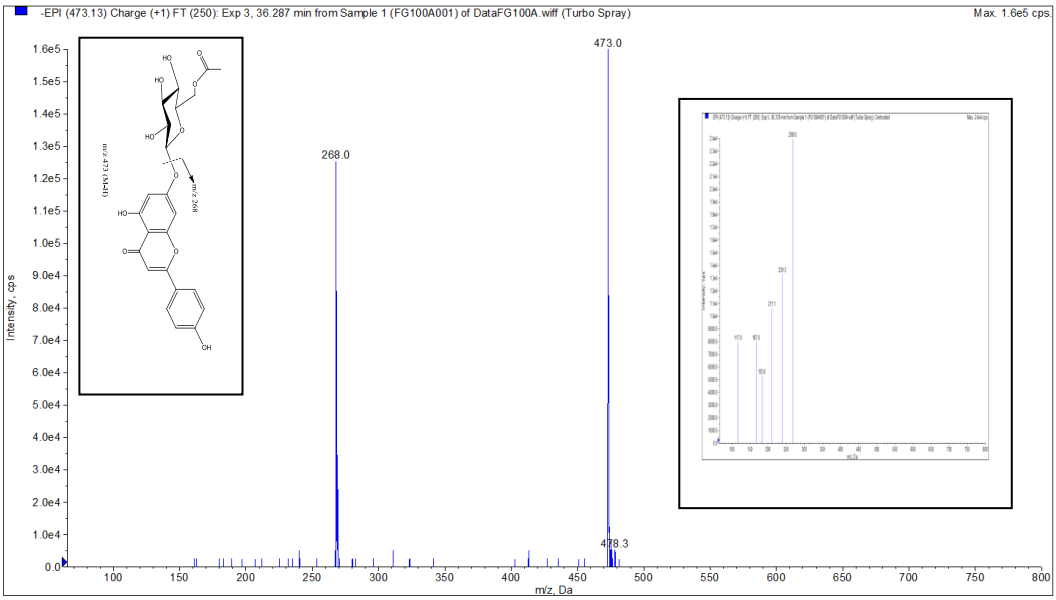
Şekil 62b. izosakuranetin asetilglukozit

54 numaralı madde: Tutunma zamanı 36.3 olan ve *m/z* 473 [M-H] moleküler iyon pikli ve *m/z* 268 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 63) maddenin bir apigenin türevi olduğu *m/z* 268 $(Y–H)^{\bullet-}$ apigenin radikali iyonundan anlaşılmaktadır. Bu pikin hemen yanında *m/z* 269 apigenin pikide belirmiştir.

Moleküler iyon piki *m/z* 473 ve apigenin arasındaki 204 amu'luk fark glikoz ve asetil grubundan kaynaklanıyor olmalıdır (162+42) bu durumda molekül apigenin asetil glukozit olmalıdır ki bu molekül kaynaklarda da kayıtlıdır (Lin ve ark., 2010).

Kütle spektrumunda *m/z* 269 apigenin iyon pikinin belirgin olarak görülememesi ve ayrıntılı kütle spektrumunda apigenine ait olabilecek parçalanmalardan sadece *m/z* 117 iyonunun görülmesi spektrum yorumlanırken bu molekül için yapılan tanımlamayı eksik bırakan taraflar olarak görülmüştür.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



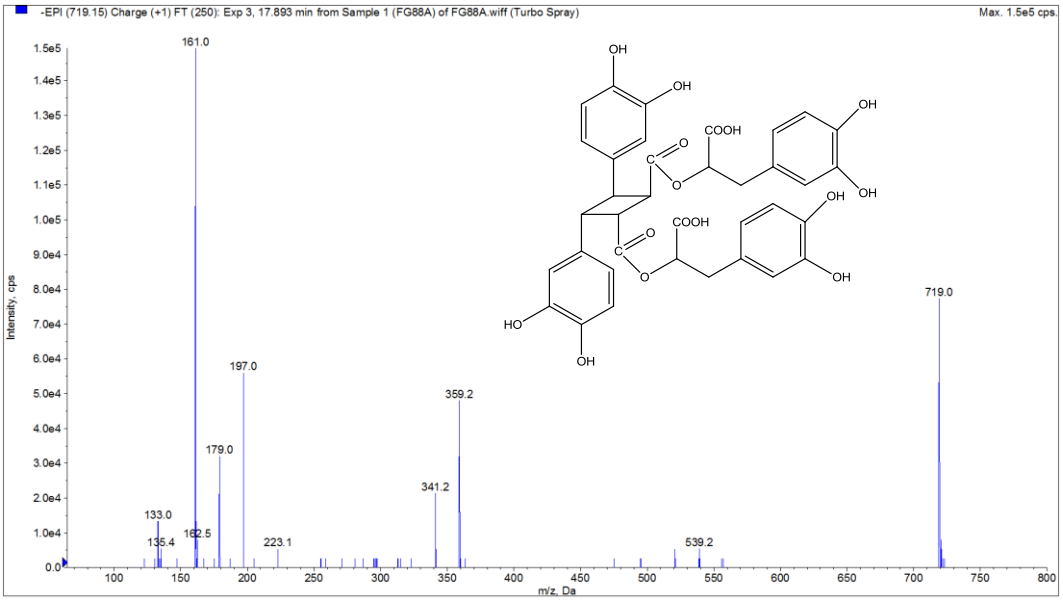
Şekil 63. Apigenin asetil glukozitin kütle spektrumu ve parçalanması

Rozmarinik asit türevleri

55 numaralı madde: 17.9 tutunma zamanı ile kolonu terk eden ve *m/z* 719 [M-H] moleküler iyon piki ve *m/z* 161 temel piki görülen molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 64) *m/z* 359 piki ve beraberinde gelen 197 179 161 iyonları dikkat çekmektedir ve molekülün bu hali ile rozmarinik asite benzerliği dikkat çekicidir ve moleküler iyon piki rozmarinik asit molekül ağırlığının iki katı büyüklüğündedir bu durumda molekülün bir rozmarinik asit dimeri olduğu anlaşılmıştır. Sagerinik asit bir rozmarinik asit dimeridir ve kaynak bilgilerindeki parçalanma ürünleri spektrum ile birebir örtüşmektedir ve molekül bu bilgiler ışığında sagerinik asit olarak adlandırılmıştır (Barros ve ark., 2013; Miron ve ark., 2013).

Benzer molekül ağırlıklı ve benzer parçalanmalar gösteren bir başka molekül ise rozmarinik asit ile aynı tutunma zamanında gözlenmiştir. Bu durum maddenin rozmarinik asitin parçalanması sırasında meydana (2M-H) gelen dimerizasyon sonucu olduğu düşünülmüştür.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



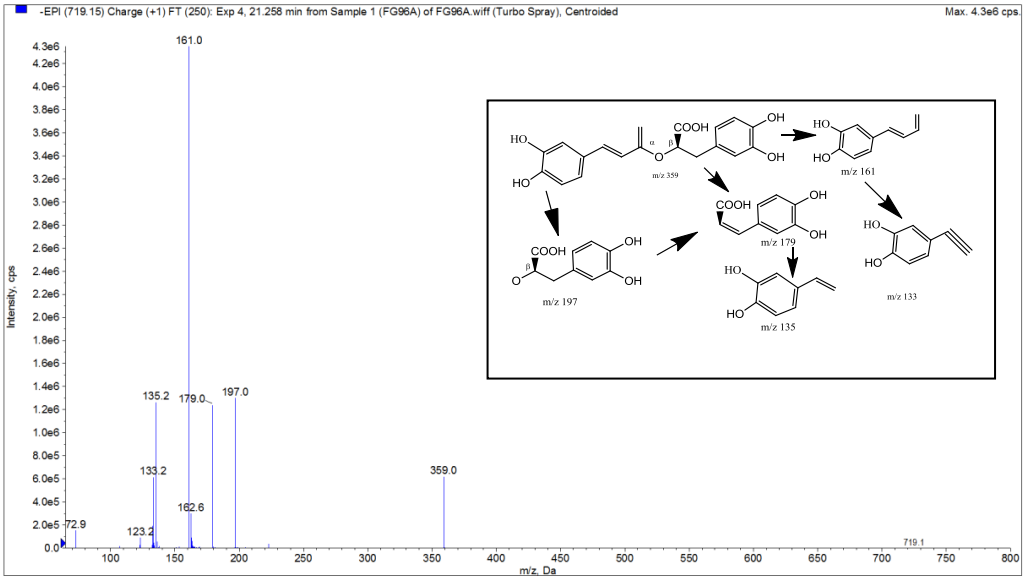
Şekil 64 Sagerinik asit kütle spektrumu

56. numaralı madde: Bütün ekstrelerde ana bileşiği oluşturan rozmarinik asit bir kafeik asit dimeridir ve kütle spektrumu incelemesi bu gruptaki diğer molekülleri de kapsayacak şekilde ele alınmıştır.

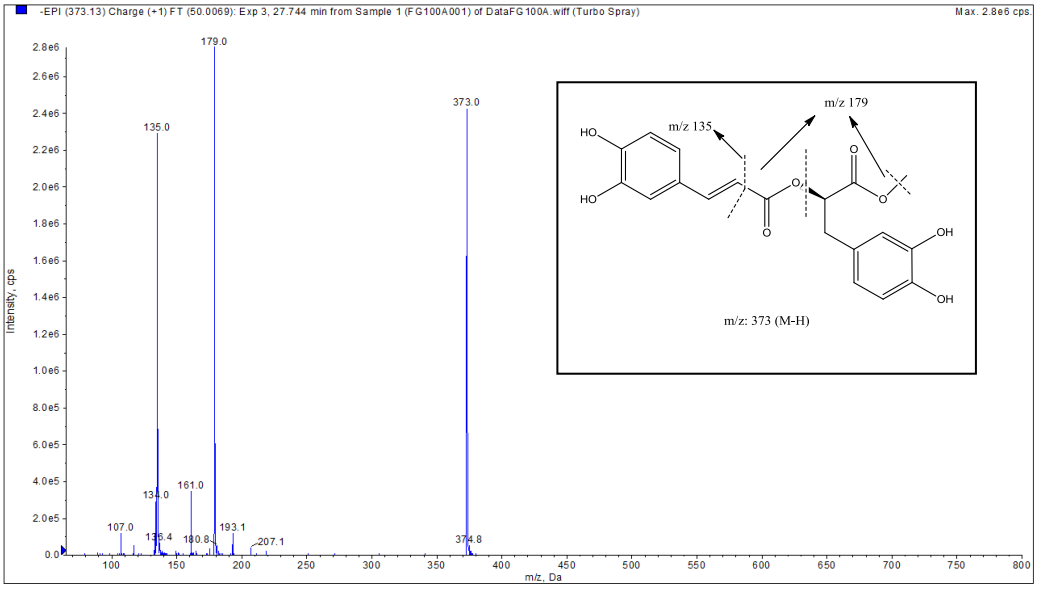
m/z 359 molekül ağırlıklı maddenin kütle spektrumda yapılan incelemelerde (Şekil 65) *m/z* 197 (danşensu) [M − H – kafeik asit], *m/z* 179 [kafeik asit − H] ve kafeik asitten CO_2 çıkışıyla oluşan [M−H CO_2] (*m/z* 135) molekül ağırlıklı parçalanma ve son olarak kafeoil kaybından dolayı oluşan (162 amu) *m/z* 161 [M − H − 197] molekül ağırlıklı parçalanmalar bu maddenin rozmarinik asit olduğunu ortaya koymuştur Kaynak bilgileri (Parejo ve ark., 2004a; Hossain ve ark., 2010; Barros ve ark., 2013) ve standart madde ile yapılan kontrollerde maddenin rozmarinik asit olduğu anlaşılmıştır.

57 numaralı madde: Tutunma zamanı 28 olan *m/z* 373 molekül ağırlıklı ve *m/z* 179 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 63) ilk dikkat çeken bu molekülün bir kafeik asit türevi dahası bir kafeik asit dimeri olan rozmarinik asit parçalanmasına benzerliğidir. Kaynak bilgileri (Lu ve ark., 2002; Zeng ve ark., 2006; Chen ve ark., 2011) bu molekülün rozmarinik asit metil esteri olduğunu belirtmektedir *m/z* 193 ve *m/z* 161 arasındaki 32 amu'luk farkbir metanol çıkışını gösterirki bu durumda metillenme karboksilik asitin hidroksil grubuna bağlanmış olmalıdır (Şekil 66).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 65. Rozmarinik asitin kütle spektrumu ve parçalanması



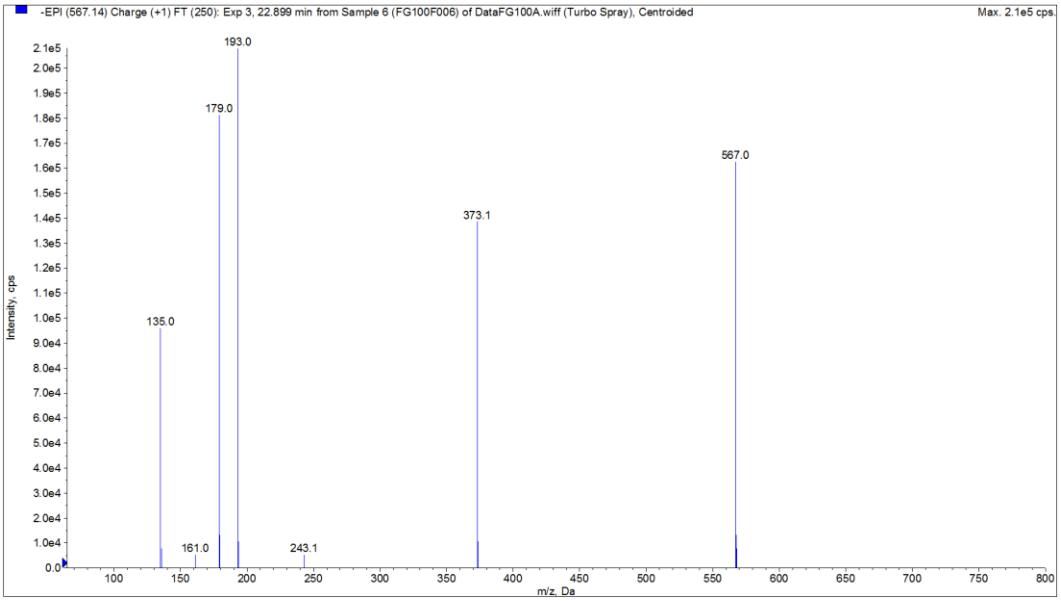
Şekil 66. Metil rozmarinatın kütle spektrumu ve parçalanması

58 numaralı madde: Tutunma zamanı 22.9 olan *m/z* 567 molekül ağırlıklı ve *m/z* 193 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemede (Şekil 67): Moleküler iyon piki olarak görülen *m/z* 567 ve *m/z* 373 arasındaki 194 amu'luk fark bir kinik asit kaybı ile oluşmuş olmalıdır. Bu hali ile molekül aglikonu 374 amu olan bir molekül ile kinik asit birleşmesinden oluşmuş olmalıdır. Molekül ağırlığı 300 amu olan sayısız molekül vardır. Burada dikkat edilmesi gereken bir başka nokta spektrumda görülen *m/z* 179 ve 135 pikleridir. Bu pikler kafeik asite ait karakteristik parçalanmalardır. Bu durumda molekül ağırlığı 374 amu olan molekül aynı zamanda bir kafeik asit türevi de olmalıdır. *m/z* 373 ve sonrasında görülen parçalanmalar da dikkat çeken parçalanmaların, rozmarinik asit parçalanmasına benzerliğidir. *m/z* 373 (M-H) ve rozmarinik asit *m/z* 359 [M-H]

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

arasında 14 amu'luk bir fark vardır ki bu bir metil grubunu işaret eder bu hali ile metil rozmarinat, kafeik asit taşıyan ve molekül ağırlığı 374 olan bir moleküldür. Bütün ekstrelerde ana bileşik olan rozmarinik asitin metil esterinin de bulunması şaşırtıcı olamamıştır ve *m/z* 373 [M-H] metil rosmatinat olarak adlandırılmıştır. Kaynak bilgileri (Lu ve ark., 2002; Zeng ve ark., 2006; Chen ve ark., 2011) bu molekülün rozmarinik asit metil esteri olduğunu belirtmektedir.

Bu durumda madde metil rozmarinat ve kinik asit esterleşmesi sonucu oluşmuş bir molekül olabileceği düşünülmüştür. Bu molekül için bir parçalanma şeması çizilmemiştir zira metillenme için ve kinik asit bağlanması için molekülde beş farklı ihtimal söz konusudur.



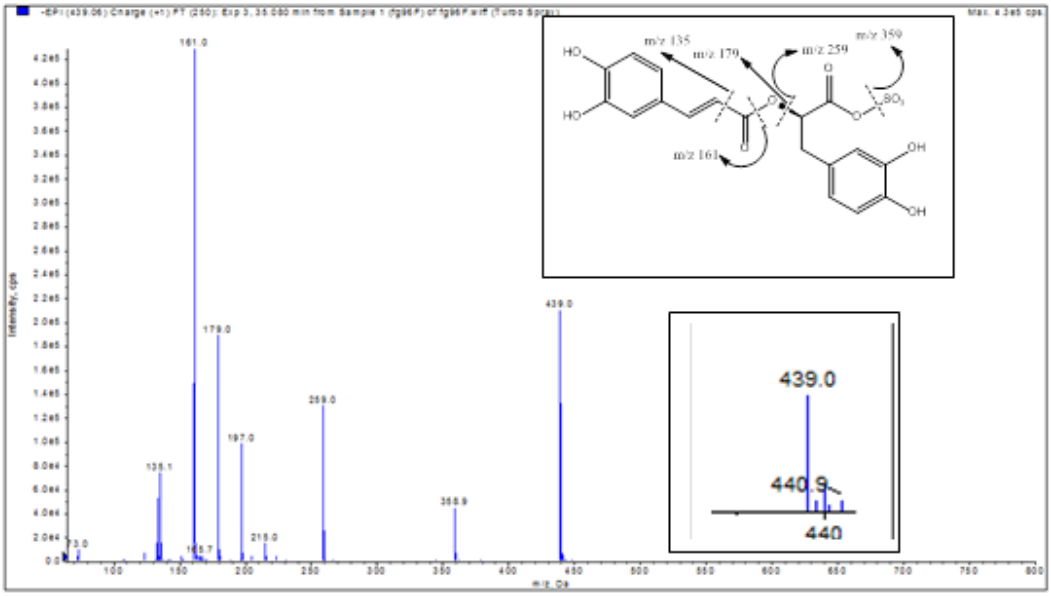
Şekil 67. *m/z* 567[M-H] molekül ağırlıklı moleküle ait kütle spektrumu (metil rozmarinat ve kinik asit esterleşmesi)

59 numaralı madde: Tutunma zamanı 35 olan ve *m/z* 439 moleküler iyon pikli ve *m/z* 161 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu: kütle spektrumu dikkatli incelendiğinde rozmarinik asit parçalanmalarına benzer parçalanmalar görülmektedir (Şekil 68). *m/z* 259 rozmarinik asitte rastlanmazken bu molekülde rastlanmıştır. Moleküler iyon piki ve rozmarinik asit moleküler iyon piki arasındaki 80 amu'luk fark sülfat grubu tarafından açıklanabilir rozmarinik asitte sülfat grubunun yerleşebileceği 5 farklı pozisyon vardır ve bunlardan 4'ü aromatik halka üzerinde iken bir tanesi karboksilik asit üzerindedir. Molekül formülü üzerinde yapılan çalışmalarda *m/z* 259 iyonunu karboksilik asit üzerindeki bir sülfat iyonu ile ulaşmak mümkün olmuştur. Bu hali ile molekül sülfatlanmış rozmarinik asit türevi olarak adlandırılmıştır zira sülfatlanmış rozmarinik asit olduğu bu moleküle kaynaklarda rastlanmış ve tanımlanamadığı görülmüştür (Ferreres ve ark., 2012). 2013 yılında yayınlanan iki makalede molekül sülfatlanmış rozmarinik asit olarak tanımlanmıştır ve fakat bu yayınlarda da molekülün tutunma zamanı rozmarinik asitten önce olarak gösterilmiştir (Barros ve ark., 2013; Miron ve ark., 2013) Molekülün sülfatlandığına dair bir başka kanıt

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

ise sülfat 34 izotopudur. Ayrıntılı kütle spektrumunda *m/z* 441 iyonunun S34 den ileri geldiği düşünülmüştür.

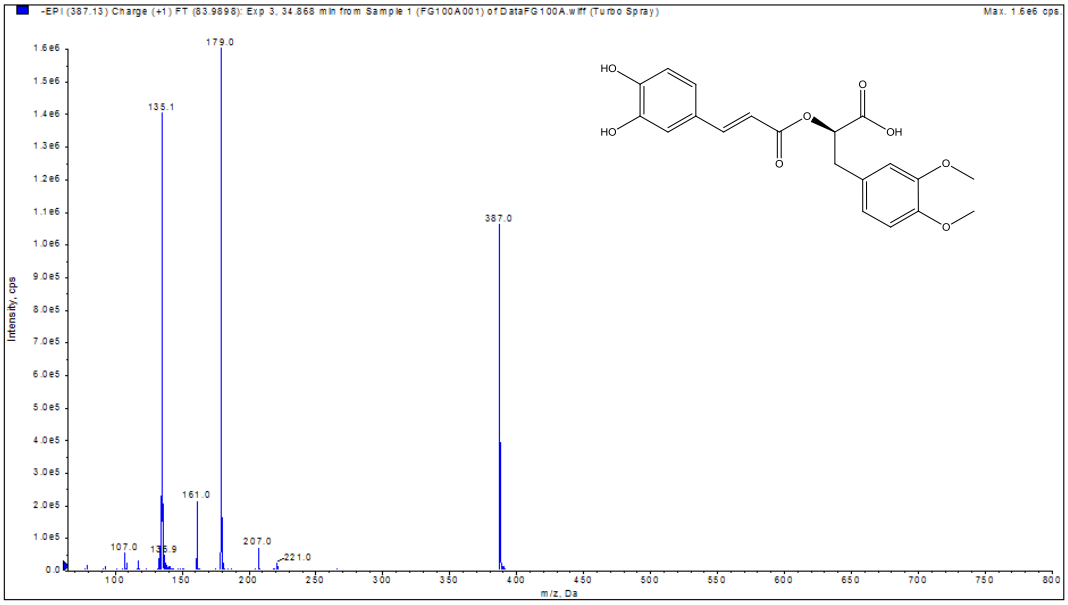
Bu bilgiler ışığında madde rozmarinik asit sülfat tuzu olarak adlandırılmıştır.



Şekil 68. Rozmarinik asit sülfat tuzunun kütle spektrumu ve parçalanması

60 numaralı madde: Tutunma zamanı 35 olan ve *m/z* 387 moleküler iyon pikli ve *m/z* 179 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemele sonucu (Şekil 69): molekül spektrumu incelendiğinde *m/z* 179 ve *m/z* 135 pikleri bağıl yoğunluğu en çok olarak görülmektedir. Bu hali ile molekülün bir kafeik asit türevi olduğu çok açık görülmektedir. Moleküler iyon piki, *m/z* 179 arasındaki 208 amu'luk fark glukoz+formik asit (162+46) veya kafeoil +46 olmalıdır. *m/z* 179 bağıl yoğunluğunun bu kadar çok olmasının bir sebebi de bu iyonu verecek birden çok kaynağın (parçalanmanın) oluşuyor olması olmalıdır. Molekül spektrumunda -90, -60 -120 vb glukoz parçalanmalarına işaret edecek herhangi bir bulguya rastlanmamış olması ve aglikon olarak açıklanabilecek bir iyonun spektrumda görülmemiş olması bağlananan grubun bir kafeoil grubu olduğunu işaret etmektedir. Bu durumda molekül en az 2 kafeik asit ünitesi içermelidir yani kafeik asit dimeri olmalıdır. Ekstremizde en çok rastlanan kafeik asit dimeri rozmarinik asittir ve molekül ağırlığı *m/z* 359 [M-H] toplarak bulunmuştur. Bu spektrumda görülen *m/z* 387 [M-H] ile rozmarinik asit arasında görülen 28 amu'luk fark 2 metil grubundan ileri gelmektedir. *m/z* 207 iyonunun gözüküyor olması da metillenmenin karboksilik asitin bağlı olduğu zincir üzerindeki aromatik halkada gerçekleştiğini göstermektedir molekül formülü bu bilgiler ışığında çizilmiştir. Bu durumda molekülümüz rozmarinik asit dimetil eteri (Dimetil rozmarinat) olmalıdır. Aynı molekülün bir metilli hali olan ve benzer parçalanmalar gösteren, metil rozmarinata 28. dakikada da rastllanmıştır ve orada ayrıntılı parçalanmaları verilmiştir.

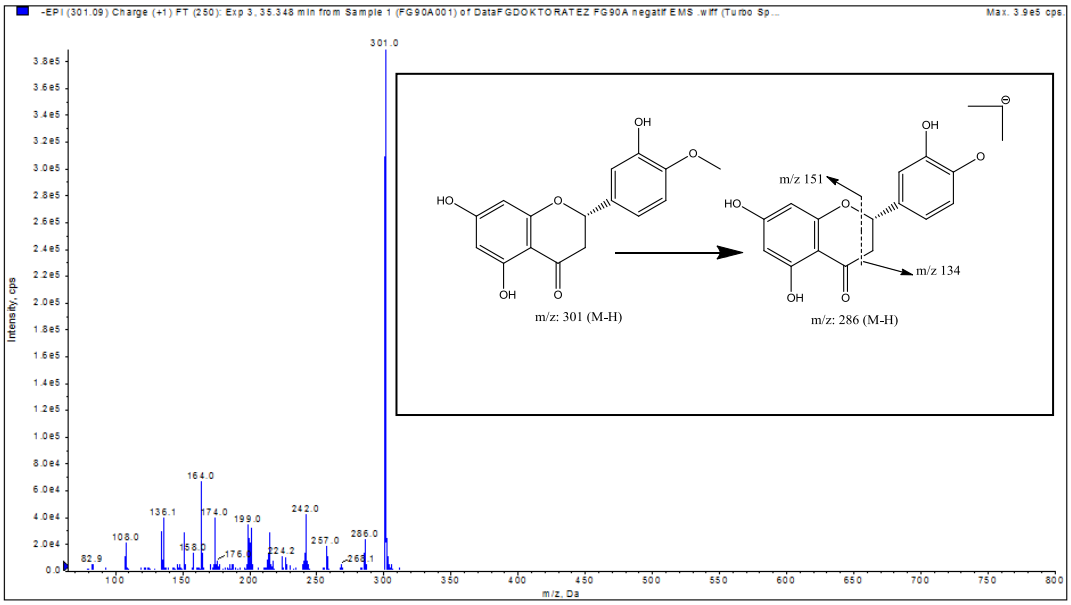
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 69. Dimetil rozmarinat kütle spektrumu

Flavonoit aglikonlar

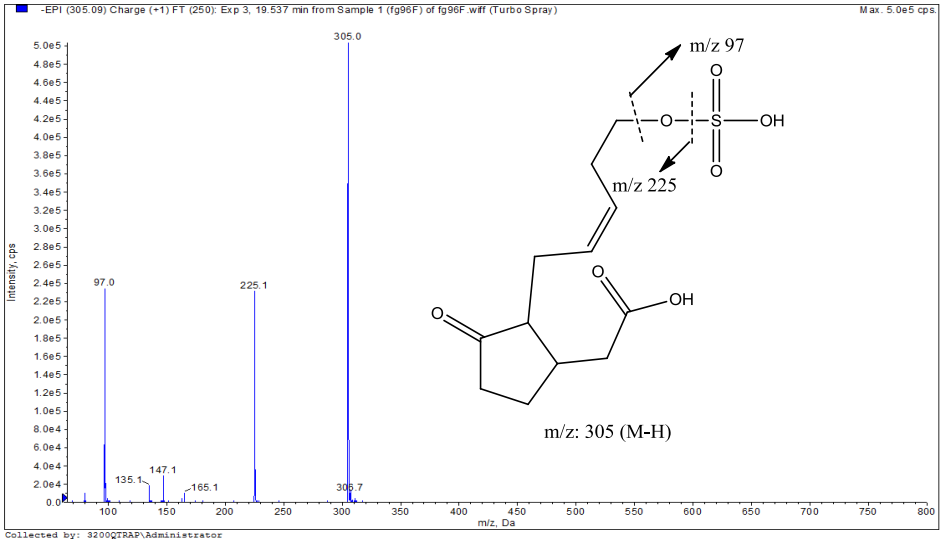
61 numaralı madde: 35'inci dakikada görülen *m/z* 301 [M-H] ve *m/z* 286 [M-H-CH3] molekül ağırlıklı parçalanma ürününe sahip molekül üzerinde yapılan literattür çalışmaları neticesinde maddenin hesperetin olduğu anlaşılmıştır bu maddenin doğruluğu hesperidin parçlanması ile oluşan standart hesperetin ile de teyit edilmiştir (Şekil 70).



Şekil 70. Hesperetin kütle spektrumu ve parçalanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

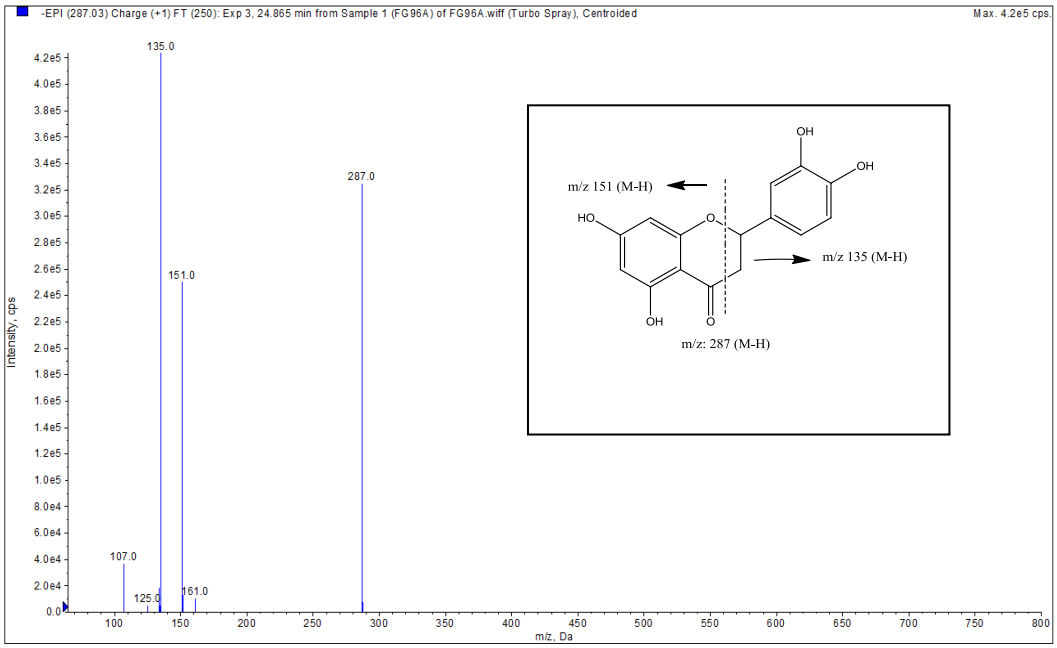
62 numaralı madde: *m/z* 305 [M-H] moleküler iyon pikli ve *m/z* 225 temel pikli molekül spektrumunda yapılan incelemeler sonucu 280 nm ve 320 nm de düşük absorbans verdiği buna karşın iyon kromtogramında yüksek oranda iyonlaştığı görülmüştür. Bu durum molekülün yapısında aromatik halka veya konjuge çifte bağlar bulunmadığını düşündürmüştür. Yapılan kaynak taramalarında Jasmonik asitin 12. karbondan hidroksillenmesi ile 12-hidroksi jasmonat oluştuğu bu molekülünde sülfatlanması ile molekül ağırlığının 306 amu olan 12 hidroksi jasmonat sülfat oluştuğu tespit edilmiştir. Kütle spektrumunda, moleküle ait kütle fragmentleri dikkatle incelendiğinde (Şekil 71) moleküler iyon pikinin yanında eser miktarda *m/z* 307 görülmektedir. Bu kükürt 'ün doğada %4,2 oranında bulunan ^{34}S izotopundan ileri gelmektedir ve molekülün bir sülfat tuzu olduğunu doğrular niteliktedir. Kaynak bilgileri de spektrumda görülen parçalanmaların 12-hihdroksijasmonat sülfat olduğunu teyit etmektedir (Kapp ve ark. 2013; Erb ve ark., 2010) bu bilgiler ışığında molekül 12-hidroksijasmonat sülfat (tuberonik asitin sülfat tuzu) olarak tanımlanmıştır. Bu moleküle son yıllarda yapılan bir *Mentha* yayınında da rastlanmıştır, fakat *M. spicata* alt ürlerinde ilk kez tanımlanmaktadır.



Şekil 71. 12-hidroksi jasmonat sülfat kütle spektrumu ve parçalanması

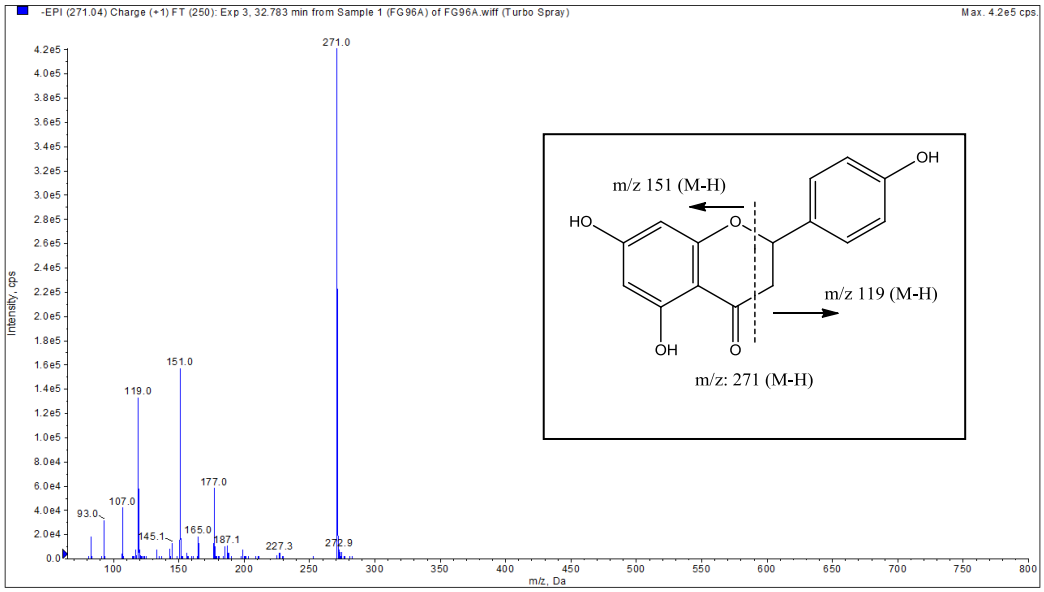
63 numaralı madde: Tutunma zamanı 24.7 olan *m/z* 287 molekül ağırlıklı ve *m/z* 135 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemede (Şekil 72) molekülün *m/z* 151 ve *m/z* 107 parçalanmaları da gösterdiği de görülmüştür. Standart kullanılarak yapılan doğrulama işlemlerinde molekülün eriodiktiyol olduğu anlaşılmıştır *m/z* 151 ve *m/z* 107 parçalanmaları sırası ile $^{1,3}A^-$ ve $^{1,3}B^-$ parçalanmalarıdır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 72. Eriodiktiyolun kütle spektrumu ve parçalanması

64 numaralı madde: 32.8 tutunma zamaı ile kolonu terk eden *m/z* 271[M-H] moleküler iyon pikli ve *m/z* 151 temel pikli molekül üzerinde (Şekil 73) yapılan incelemeler sonucu molekülün naringenin olduğu anlaşılmıştır ve kaynak bilgileri (Qiao ve ark., 2011; Gates ve ark., 2012) ve standart kullanılarak da doğrulama sağlanmıştır



Şekil 73. Naringenin kütle spektrumu ve parçalanması

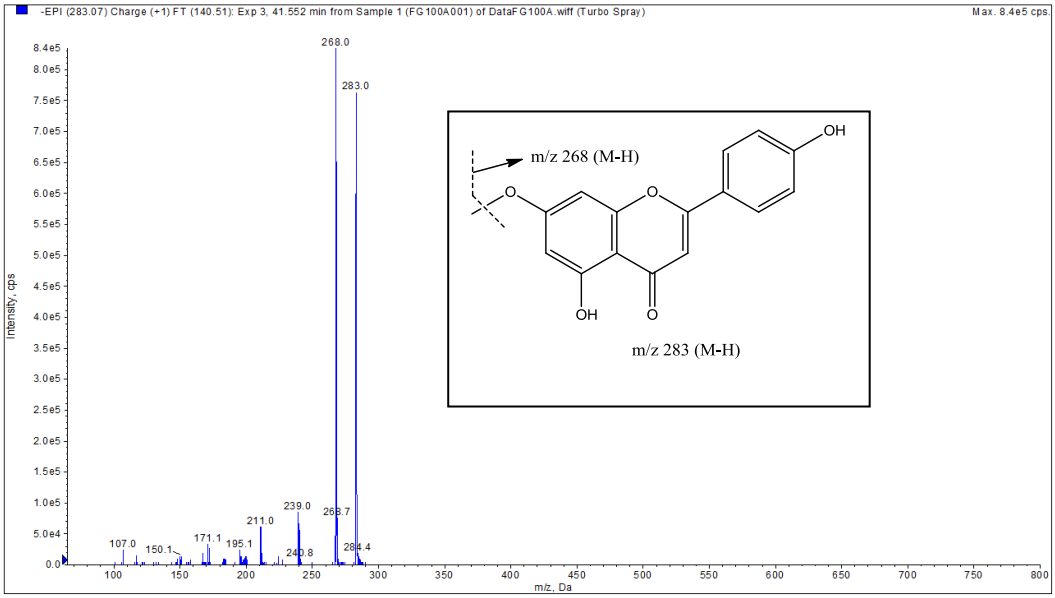
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

67 numaralı madde: *m/z* 285[M-H] molekül ağırlıklı iyona bitkide 2 farklı yerde rastlanmıştır. Tutunma zamanı 35.4 olan *m/z* 285 moleküler iyon pikli ve *m/z* 133 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 49) 199, 175, 151, 107 parçalanmaları gözlenmiştir ki bu parçalanmalar luteolinin parçalanmalarıdır ve standart luteolin kullanılarak da doğruluk sağlanmıştır. Bu veriler kaynak verileri ile de uygundur (Gates ve ark., 2012)

76 numaralı madde: Aynı molekül ağırlıklı diğer moleküle 40. dakika da rastlanmış (Şekil 50) ve *m/z* 285[M-H] *m/z* 270, 243, 226 ve 164 iyonları gözlenmiştir. Bu parçalanmalar dikkatli incelendiğinde *m/z* 270 iyonu göze çarpmaktadır. Bu durum molekülde bir metil grubu olduğu göstermektedir şartlar böyle iken yapısında O-Metil taşıyan ve molekül ağırlığı 285 olan flavonoitler arasında Sakuranetin (7-Metilnaringenin) ve izosakuranetin (4'-metilnaringenin) bulunmaktadır (Fabre ve ark., 2001; Silberberg ve ark., 2006) bu iki molekül de naringenin kökenlidir. Naringenin'in ekstrelerde rastlanmış olması sakuranetin ve izosakuranetin olasılıklarını daha da güçlendirmektedir.

68 numaralı ve 77 numaralı madde: Tutunma zamanı 36 ve 41.5 olan 2 farklı yerde *m/z* 283 [M-H] moleküler iyon pikli *m/z* 268 temel pikli aynı parçalanmalara sahip 2 farklı moleküle rastlanmıştır: molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 74): Moleküler iyon pikinden sonra bağıl yoğunluğu en çok olan pikinin *m/z* 268[M-H] olduğu görülmektedir. Moleküler iyon piki *m/z* 283[M-H] ile temel pik *m/z* 268 arasındaki farkın 15 amu olduğu görülmektedir. Bu durum da molekül, prunetin, biokanin A, asetatin veya genkvanin gibi molekül ağırlığı 269 olan ve metoksi grubu taşıyan bir flavanoit olmalıdır. Burada bir metillenme söz konusuysa bu molekülün metillenmemiş halinin de ekstre içinde bulunması büyük bir olasılıktır nitekim *m/z* 268[M-H] molekülüne ekstrede rastlanmış ve standart apigenin kullanarak molekülün apigenin olduğu doğrulanmıştır. Bu durumda molekülün metilapigenin olduğu sonucunu ortaya çıkmaktadır. Metillenmiş apigenin'in metillenme pozisyonuna göre iki türü bulunmaktadır bunlardan biri B halkasında 4 numaralı karbon üzerinden metillenmesi ile oluşan 4-metil apigenin (asesatin) diğeri A halkasında 7 numaralı C üzerinden metillenmesi ile oluşan 7- metil apigenin (genkvanin) dir. Bu iki molekül kolondan çıkış zamanlarına göre birbirlerinden ayrılırlar genkvanin kolonu asetatinden daha geç terk eder (Hossain ve ark., 2010) bu bilgiler ışığında 36. dakikada gelen **68 numaralı madde** asesatin 41.5 inci dakikada gelen **77 numaralı madde** ise genkvanin olarak adlandırılmıştır (şekil 74).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

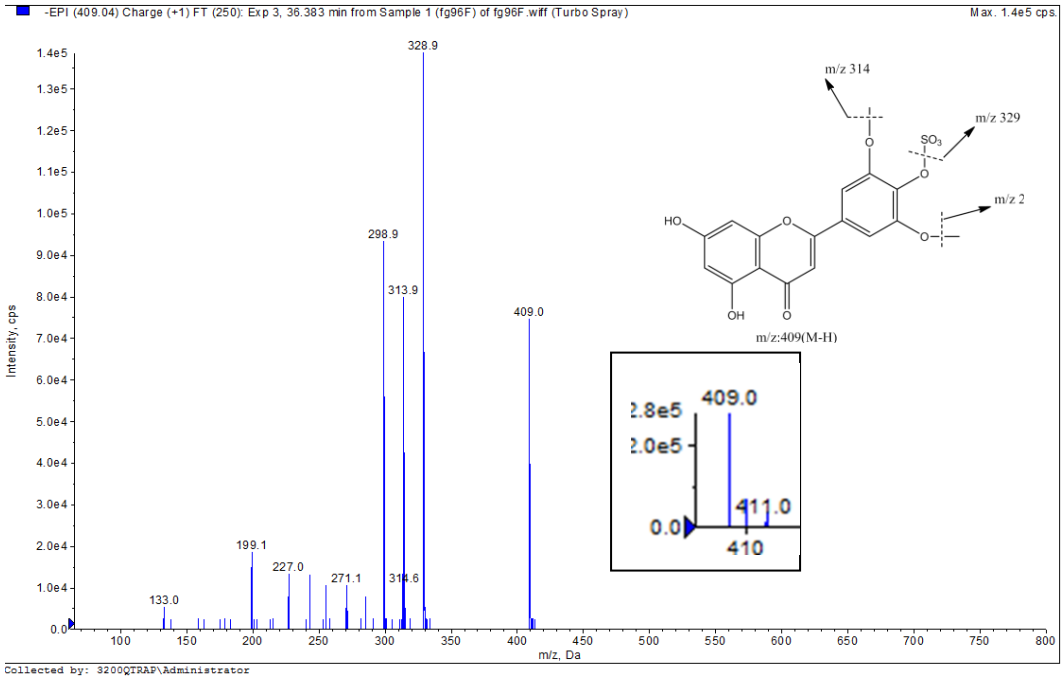


Şekil 74. genkvanin için kütle spektrumu ve parçalanması

69 ve 71 numaralı maddeler: 36. dakikada kolonu terk eden *m/z* 409 [M-H] molekül ağırlıklı madde ve karakteristik parçalanma ürünleri olan *m/z* 329, 314, 299 kütle spektrumunda gözlenmiştir. *m/z* 329 ile *m/z* 409 arasındaki 80 amu lık farkın sülfat molekülünden ileri geldiği düşünülmüştür (Barros ve ark., 2012) ayrıntılı rezolusyon analizinde moleküler iyon pikinin yanında +2 fazlası olan ^{34}S den ileri geldiği düşünülen 411 izotopu bulguları doğrular niteliktedir (Şekil 75).

Yapısında 3 hidroksil ve 2 metoksi grubu bulunan flavonon molekülü veya bir hidroksil ve 3 metoksil grubu bulunan flavanon molekülü *m/z* 329[M-H] moleküler iyon pikli olup parçalanmaları elde ettiğimiz spektruma benzer şekilde olacaktır. Bu moleküllerden onlarca bulunmaktadır (Eriodiktiyol 7,3',4'-trimetil eter, 5-Hidroksi-6,7,4'-trimetoksi flavanon, trisin, timusin vb) (Yen-Chen Ko ve ark., 2013). Bu hali ile molekülün tanımlamasını yapmak mümkün olmamıştır. Fakat hidroksi-trimetoksi flavon sülfat olduğu düşünülmektedir. Bu molekülün sülfat bağlanmamış hali 37.2. dakika da görülmekte ve *m/z* 329 ve takip eden parçalanmaları göstermektedir. Bu molekülde aynı şekilde hidroksi dimetoksiflavon olarak adlandırılmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



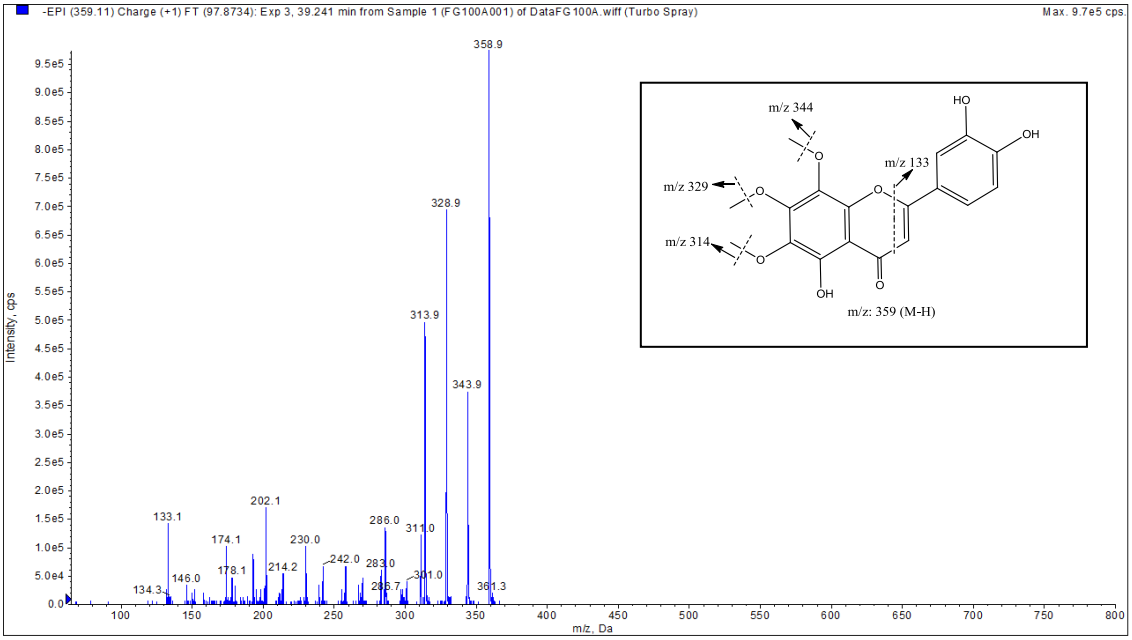
Şekil 75. dihidroksi dimetoksiflavon sülfat tuzu kütle spektrumu ve parçalanması

72 ve 75 numaralı maddeler: 37. Dakikada kolonu terk eden ve *m/z* 359 [M-H], *m/z* 344 [M-H-CH3] *m/z* 329 [M-2CH3] ve *m/z* 314 [M-3CH3] molekül ağırlıklı parçalanma ürününe sahip molekül üzerinde yapılan araştırmalarda (Şekil 76) molekül ağırlığı 360amu olan trihidroksi-trimetoksi flavonların her birisinin benzer parçalanmaları verebileceği görülmüştür. Kaynak araştırmaları *Mentha spicata'* dan aynı molekül ağırlıklı ve trimetoksi yapılı 2 farklı flavon izole edildiğini ve yapısının aydınlatıldığını göstermiştir. Bu moleküller 5,6,4'-trihidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavon (timonin) ve 5,3',4'-trihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon (sideritiflavon) dur (Yamamura ve ark., 1998; Zaidi ve ark., 1998; Voirin ve ark., 1999). Voirin ve arkadaşları ters faz kolon kullanılan sistemlerde timonin'in sideritiflavondan önce kolonu terk ettiğini belirtmişlerdir.

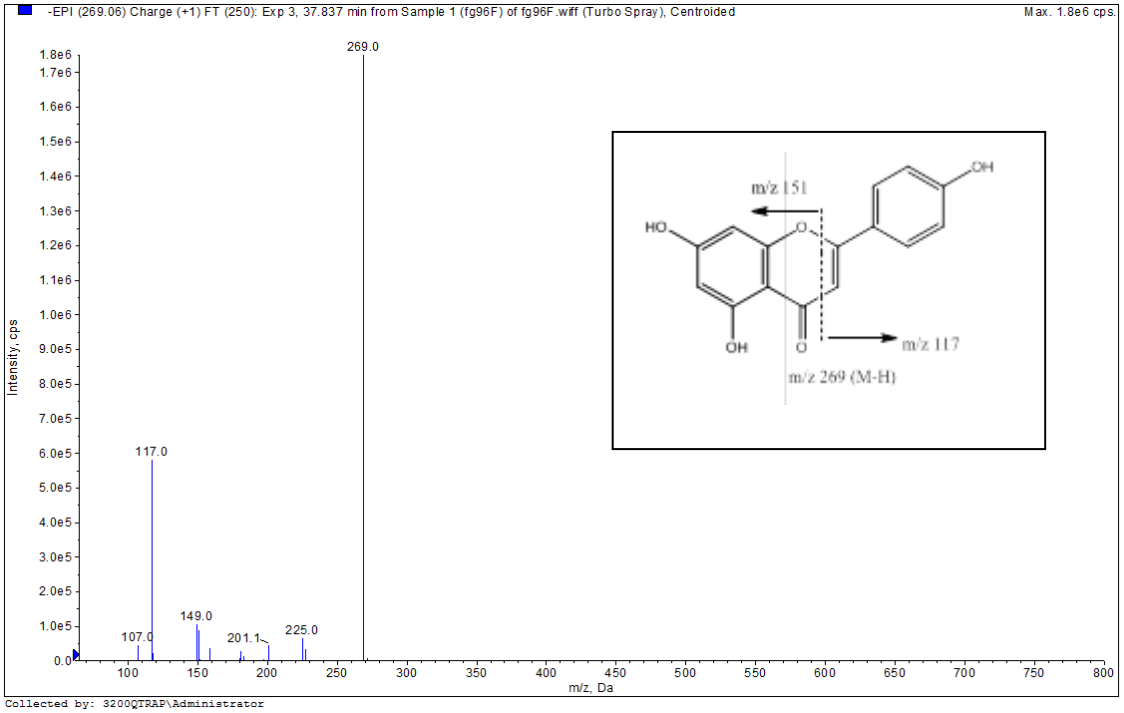
Bu değerlendirmeler neticesinde molekülün trihidroksi-trimetoksi flavon yapısında olduğu ve 37. dakikada kolonu terk eden **(72 numaralı madde)** molekül timonin, 39. dakikada **(75 numaralı madde)** kolonu terk eden molekül ise sideritiflavon olarak adlandırılmıştır (şekil 76).

70 numaralı madde: Tutunma zamanı 37.8 olan ve *m/z* 269 [M-H] moleküler iyon pikli ve 117 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 79) molekülün apigenin olduğu standart apigenin kullanılarak anlaşılmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 76. Sideritiflavon kütle spektrumu ve parçalanması

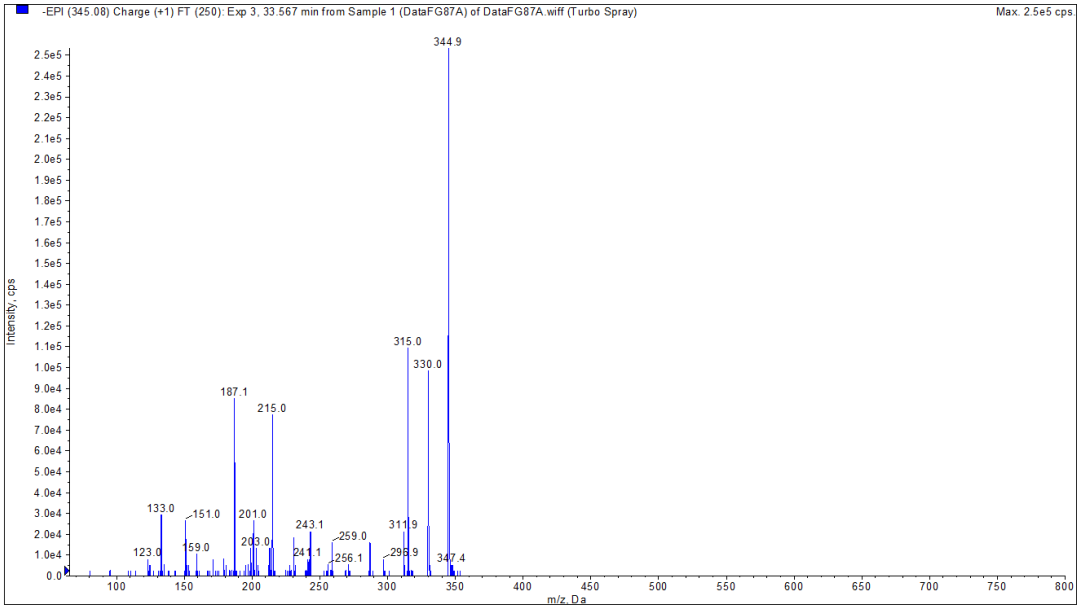


Şekil 77. Apigenin kütle spektrumu ve parçalanması

73 numaralı madde: Molekül ağırlığı *m/z* 345 [M-H] ve parçalanma ürünleri *m/z* 330 315 215 ve 187 olan molekül üzerinde yapılan incelemelerde (Şekil 78) molekülün bir tetrahidroksi dimetoksi flavon türevi olabileceği veya *Mentha* larda daha önce rastlanan ve yapısında iki metil grubu bulunan *m/z* 346 molekül ağırlıklı ve *Mentha spicata* dan izole edilen bir monoterpenoit glikozit olan spikatosit B olabileceği düşünülmüştür peş peşe iki metil kopması bu teoriyi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

desteklesede spikatosit B için beklenen parçalanmaların hepsinin görülmemiş olması tanımlamada eksik kalan taraf olmuştur.



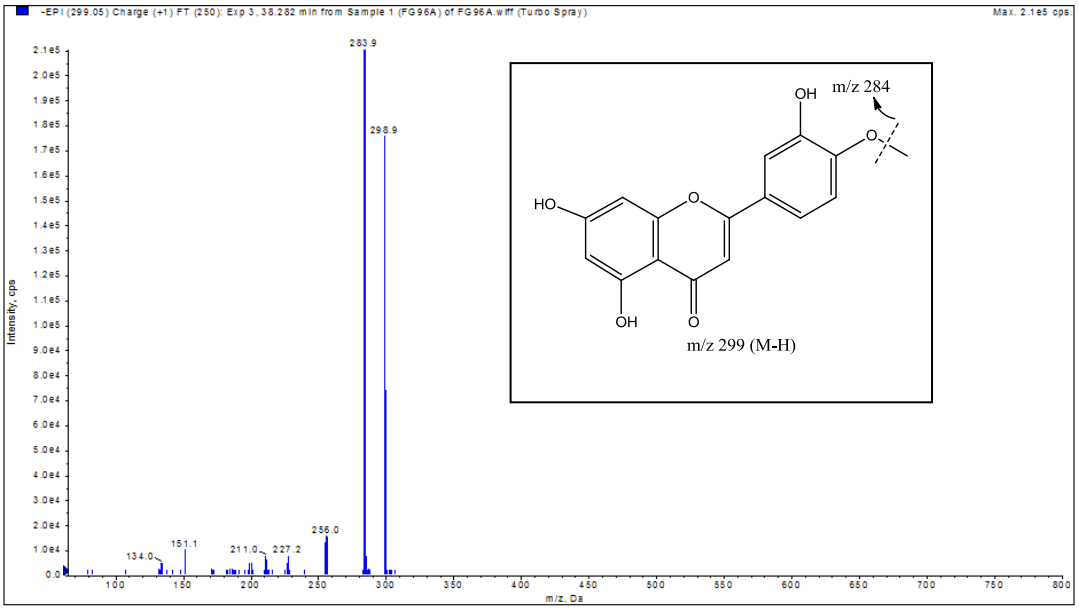
Şekil 78. Spikatosit B veya tetrahidroksi dimetoksi flavon türevi kütle spektrumu

74 numaralı madde: Tutunma zamanı 38.3 olan ve *m/z* 299 [M-H] moleküler iyon pikli ve 284 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 79): Moleküler iyon piki ve temel pik arasındaki 15amu'luk fark molekülde bir metoksi grubunun bulunduğunu gösterir moleküle ait diğer fragmentler *m/z* 256, 227, 151 ve 211 dir. Bu durumda aradığımız molekül molekül ağırlığı 300 olan ve bir metoksi grubu taşıyan bir flavonoit olmalıdır: 5,7,4'-trihidroksi-3'-metoksi-flavon (krisoseriol) ve luteolin 4' metil eter (diosmetin) bu tanımlamalara uymaktadır ve benzer parçalanmalar göstermektedir (Justesen, 2000; Wang ve ark., 2008; Hossain ve ark., 2010) fakat bu özellikte bir çok flavonoit bulunmaktadır ve bu moleküllerden de benzer parçalanmalar beklenmektedir. Bunlardan bazılarına örnek verilecek olursa: 3',5,7-trihidroksi-4'-metoksizoflavon (pratensein), 4',5,7-trihidroksi-6,8-dimetilflavanon (farresol), geraldol, kamferol 4'-metil eter (kamferit), sorbifolin vb.

Fakat biyosentetik olarak düşünüldüğünde bu molekülün luteolin türevi olması kuvvetli bir ihtimal olarak görülmektedir zira ekstrede luteolin'in diğer türevlerine de rastlanmıştır. Bu bilgiler ışığında molekül diosmetin (luteolin 4' metil eter) olarak adlandırılmıştır.

Molekülün bir flavonoit olduğu düşünüldüğünde ekstrede bir de glikozit halinin bulunması ihtimali de düşünülmüştür. Eser miktarda olsa *m/z* 607 [M-H] moleküler iyon pikli ve 299 ve 284 parçalanmaları gösteren bir başka moleküle 22.9 tutunma zamanında rastlanmıştır (şekil 56) ve molekül diosmetin rutinozit yani diosmin olarak adlandırılmıştır (Hvattum ve ark., 2003).

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

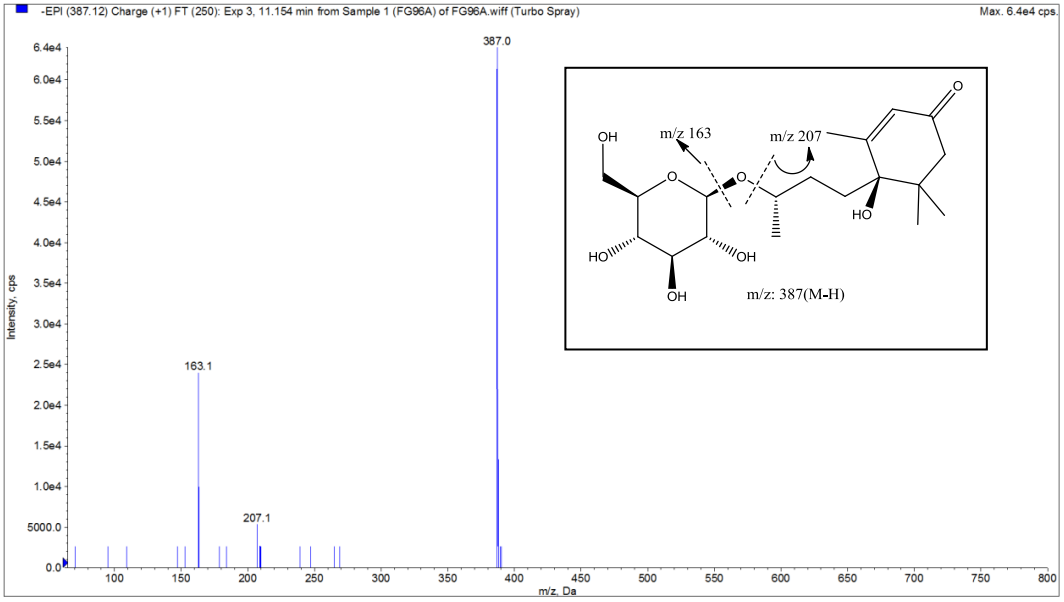


Şekil 79. Diosmetin kütle spektrumu ve parçalanması

Megastigman glikozitler

78 numaralı madde: Tutunma zamanı 11. dakika olan ve *m/z* 387 [M-H] moleküler iyon pikli ve *m/z* 207 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 80) molekülün parçalanmalarının fenolik bir lignan olan mediarezinol (Hossain ve ark., 2010) ile uyumlu olduğu ve daha öncede nane türlerinde rastlandığı (Kapp ve ark. 2013) görülmüştür. Fakat aynı molekül ağırlıklı bir başka molekül olan ikarisit B_5 inde daha önceden *M. spicata* da görülmüş olması ve 2010 yılında tekrar revizyonunun yapılması (Yamamura ve ark., 1998; Matsunami ve ark., 2010) bu molekül üzerinde de düşünülmesi gerekliliğini ortaya çıkartmıştır. Ne yazık ki kaynaklarda bu molekülün parçalanmalarına ait bize yol gösterici olabilecek bir spektruma rastlanamamıştır. Molekülün 280 ve 320 nm lerde çok düşük absorbans göstermesi yapısında çok az çifte bağ bulunduğunu işaret etmektedir. Bu hali ile molekülün yapısında 2 aromatik halka bulunan mediorezinol olması düşünülemeyeceğinden, ikarisit B_5 olma ihtimali kuvvet kazanmıştır. Molekülün chem draw üzerinde yapılan çizimlerinde ve olası parçalanma durumlarında *m/z* 207 ve 163 iyonları gözlenmiş ve çalışılan türlerin de aynı olması dolayısıyla bileşik ikarisit B_5 olarak adlandırılmıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 80. İkarisit B_5 in kütle spektrumu ve parçalanması

79 numaralı madde: Tutunma zamanı 22.5 olan *m/z* 549 [M-H] moleküler iyon pikli ve 161 temel pikli molekül üzerinde yapılan incelemeler sonucu (Şekil 81):

Molekül *m/z* 387 ve *m/z* 207 ve *m/z* 161 iyonları ile daha öncede üzerinde tartışılan, ikarisit B_5 veya medioresinol molekülüne benzerlik göstermektedir. Moleküler iyon piki *m/z* 549 ve *m/z* 387 arasındaki 162 amu'luk fark bir glukoz kondensasyonunu göstermektedir. Kaynaklarda, (1-6) glikozitik bağlı ikarisit B_5 glukopiranosit (Shitamoto ve ark., 2011) molekülü kayıtlıdır. Fakat daha önce ayrıntılı kütle spektrumu alındığına dair hiç bir kayıt bulunamamıştır. Molekül formülü incelendiğinde *m/z* 499 iyonunun glukopiranozit'in 0,2 kopması sonucu, *m/z* 387 ve *m/z* 161 nin ise glikozitik bağ kopması sonucu ortaya çıkmış olabilir. *m/z* 179 ve 161 iyonlarının (1-4) ve (1-3) glikozitik bağlarının parçalanmaları sırasında açığa çıktığına dair kaynak bilgileri mevcuttur (Guan ve ark., 2008). *m/z* 207 ve *m/z* 179, ikarisit B_5 in dallanma yapan 8 ve 9 numaralı karbonları arasındaki bağın kopması sonucu oluştuğu görülmüştür.

Bu tanımlama yapılırken eksik kalan bir nokta varsa oda molekülün kolonu terk etme zamanıdır yapısında bir glikozit içeren ikarisit B_5'in 11. dk da kolonu terk ederken yapısında 2 molekül glukoz bulunan ikarisit B_5 glukopiranosid'in kolonu 22. dakikada terk etmesi ilginç bulunmuştur. Bu duruma molekülün stereo kimyasının yol açmış olabileceği düşünülmektedir.

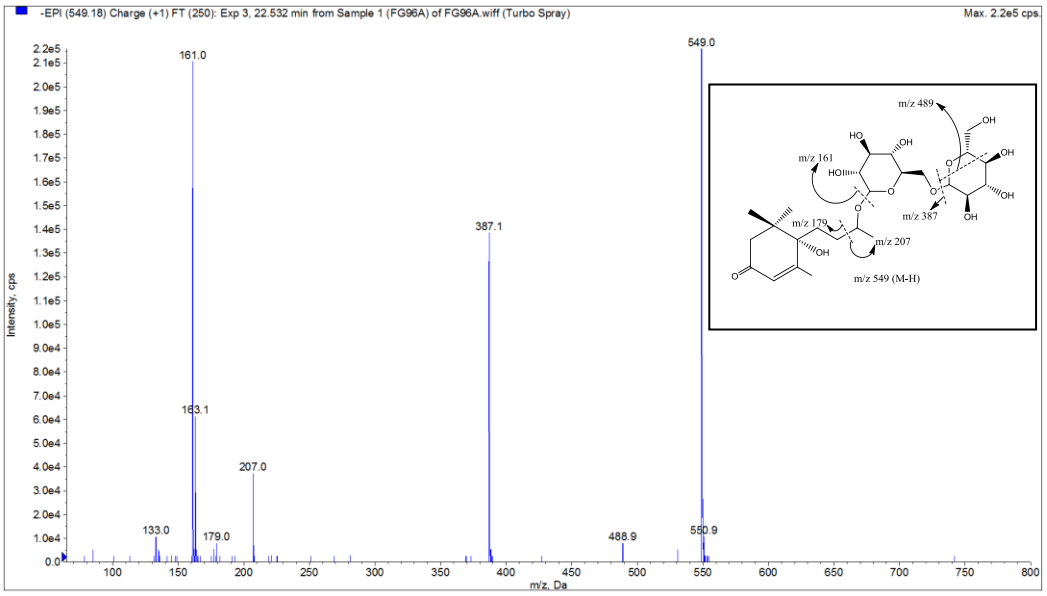
Tutunma zamanından kaynaklanan bu durum üzerine, benzer parçalanmaları verebilecek, ve aglikon olarak ekstrelerde rastladığımız aglikonları taşıyan (luteolin, diosmetin apigenin) molekül ağırlığı *m/z* 550 olan flavonoitler üzerinde bir araştırma yapılmıştır. 6,8-di-C-Arabionopiranosilluteolin (Schoeneborn ve ark., 1993) in molekül formülü incelediğinde benzer parçalanmaları verebileceği gözlenmiştir. Molekül ağırlığı *m/z* 549 [M-H] olan bu molekül $^{0,4}A^-$ kopması ile *m/z* 387 iyonu elde edilirken $^{0,4}B^-$ kopması ile de *m/z* 161 iyonu elde edilmektedir. *m/z* 489 ise zayıf olan şeker moleküllerinin parçalanması sırasında açığa çıkan 60 amu fark C-glikozitlerinde rastlanan karakteristik kopmalardandır ve bu durum molekülün bir C-glikoziti olma ihtimalini de güçlendirmiştir. Fakat bu molekülün

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

parçalanması esnasında hiçbir şekilde *m/z* 387 parçalanması üzerinden *m/z* 207 iyonuna rastlamak mümkün olmamıştır.

Tüm bu değerlendirmeler sonucu molekülün (1-3) veya (1-4) glikozitik bağlı, ikarisit B_5 glukopiranosit (Shitamoto ve ark., 2011) olduğuna karar verilmiştir.

Megastiman türevleri için yapılan bu değerlendirmelerde eser miktarda görülen UV absorbansları, *Mentha spicata* ile yapılan çalışmalarda bu moleküllerden ikarisit B_5'in izole edilmiş olması ve Chem Draw ile yapılan olası parçalanmaların görülmesi belirleyici rol oynamıştır.



Şekil 81. İkarisit B_5 glukopiranosit kütle spektrumu ve parçalanması

Karbonhidratlar

80 numaralı madde: UV absorbans vermeyen ve 2.4 üncü dakikada kolonu terk eden *m/z* 665 [M-H] ile birlikte klor bağlanmış formu (M-H +Cl) *m/z* 703 ve formik asit bağlanması ile oluşan (M-H+HCOOH) *m/z* 711 iyon piklerine rastlanmıştır (Şekil 82).

Bileşiğin ters faz kolonda ilk dakikalarda gelmesi polaritesinin çok yüksek olduğunu ve UV absorbansının olmaması da molekülde çiftte bağlar bulunmadığını düşündürmüştür. Temel pik olarak görülen *m/z* 503 ise moleküler iyon pikinden 162 eksik olarak görülmüştür ki bu durum bir glikoz veya galaktoz kopmasını göstermektedir.

Karbonhidratlar parçalanırken gösterdikleri 60 amu 90 amu ve 120 amu'luk farklar ile karakteristiktirler.

m/z 665 ile *m/z* 545 arasında ve *m/z* 503 ile *m/z* 413 arasında görülen 90 amu'luk fark ve *m/z* 413 ile *m/z* 293 arasında ve *m/z* 503 ile 383 arasında görülen 120 amu'luk farklar da şeker molekülünün parçalanmaları sonucu oluşmaktadır.

Benzer olarak *m/z* 503 ile 443 arasında görülen 60 amu'luk fark da molekülün bir şeker molekülü olduğunu doğrulamıştır. Temel pik olan *m/z* 503 ile *m/z* 341

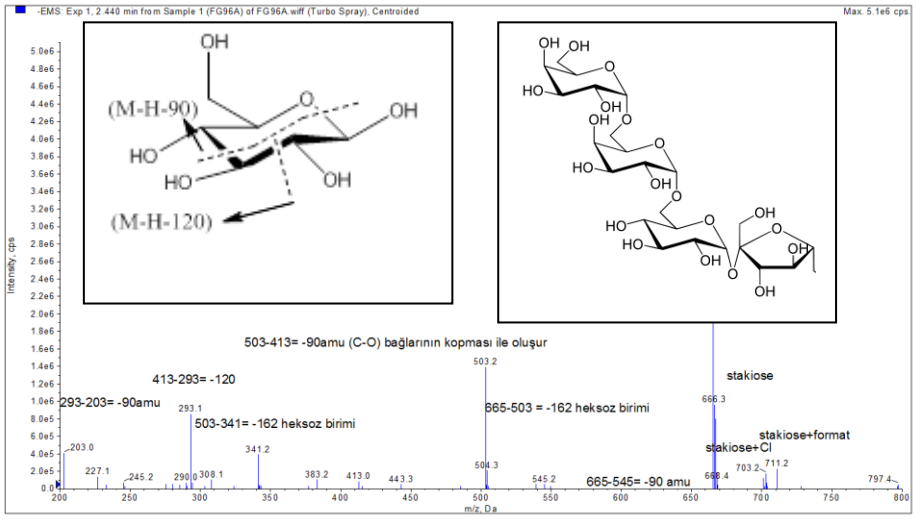
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

arasında ki 162 amu'luk fark bir başka glikoz veya galaktoz birimini işaret etmektedir.

Bu haliyle 80 numaralı molekül en az disakkarit olmalıdır.

İlk gördüğümüz pik *m/z* 341 ve takip eden parçalanma ürünleri sakaroz parçalanmalarına benzemektedir ve bu durum standart sakaroz kullanılarak ta teyit edilmiştir, sakarozun (glukoz + fruktoz) bir disakkarit olduğu düşünülecek olursa molekülümüze ait 2 adet disakkarit bulmuş oluruz. Bu durumda molekül 4 adet hekzozit den oluşan bir sakkarit olmalıdır ki molekül ağırlığı zaten ancak böyle bir durumda *m/z* 665 moleküler iyon piki sağlanabilmektedir. (4 adet hekzoz 180 amu'luk birleşme ile toplamda 720 amu yapacaktır. Fakat oluşan 3 adet glikozitik bağın 1er molekülden toplamda 3 molekül su çıkarttığı düşünülecek olursa molekülün *m/z* 720 den 72 eksik çıkması yani *m/z* 665 [M-H] olarak görülmesi beklenecektir.)

Yapılan kaynak taramaları sonucunda stakiose'un molekül ağırlığı *m/z* 665 olan bir tetrasakkarit olduğu ve 2 molekül galaktoz bir molekül glukoz ve 1 molekül fruktozdan oluştuğu görülmüştür (gal(α1→6)gal(α1→6)glc(α1↔2β)fru). Kütle spektrumu ile yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde (Guan ve ark., 2008) 80 numaralı molekül spektrumu ile (Şekil 82) bire bir örtüştüğü görülmüştür ve 80 numaralı molekül stakioz olarak adlandırılmıştır.



Şekil 82. Stakioz kütle spektrumu

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Hekzan Ekstrelerinin Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi ile Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi

RT	Bileşik	*M.spicata* ssp. *spicata* [%]	*M.spicata* ssp. *tomentosa* [%]
1203	limonen	9.4	-
1213	1,8-sineol	5.2	5.9
1474	*trans*-sabinen hidrat	2.2	-
1535	β-bourbonen	2.1	-
1612	β-karyofillen	4.1	-
1624	*trans*-dihydrokarvon	0.3	-
1751	karvon	61.0	-
1724	*cis*-piperitone oksit	-	3.8
1750	*trans*-piperiton oksit	-	40.5
1757	dihidrokarveol	2.2	-
1933	tetradekanal	1.1	-
1983	piperiton oksit	-	21.8
2030	5-etil 4-oktanon*		2.8
2900	nonakosan	4.3	2.8
2931	hekzadekanoik asit		4.4
3100	hentriakontan	6.9	15.5
	Toplam	98.8	97.5

* Wiley kütüphanesindeki spektrum benzerliğinden bulunmuştur.

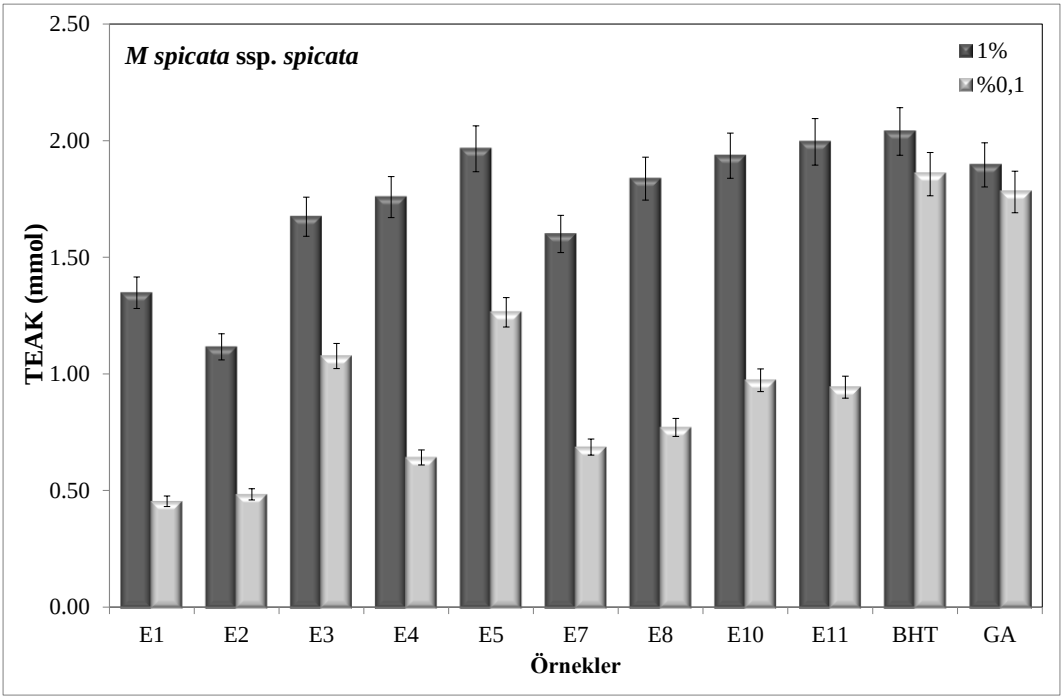
Antioksidan Aktivite Bulguları

Troloks'a Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAK)

$ABTS^{\bullet+}$ radikali hem su hem de organik çözücülerde rahatlıkla çözünen ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitelerini ölçmek için kullanılabilir. Burada renk kaybı bir standart eğrisi kullanılarak çizilen kalibrasyon denklemine göre belirlenir. Bu amaçla vitamin E'nin suda çözünen analoğu olan troloks kullanılır ve hesaplamalar troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi olarak verilir.

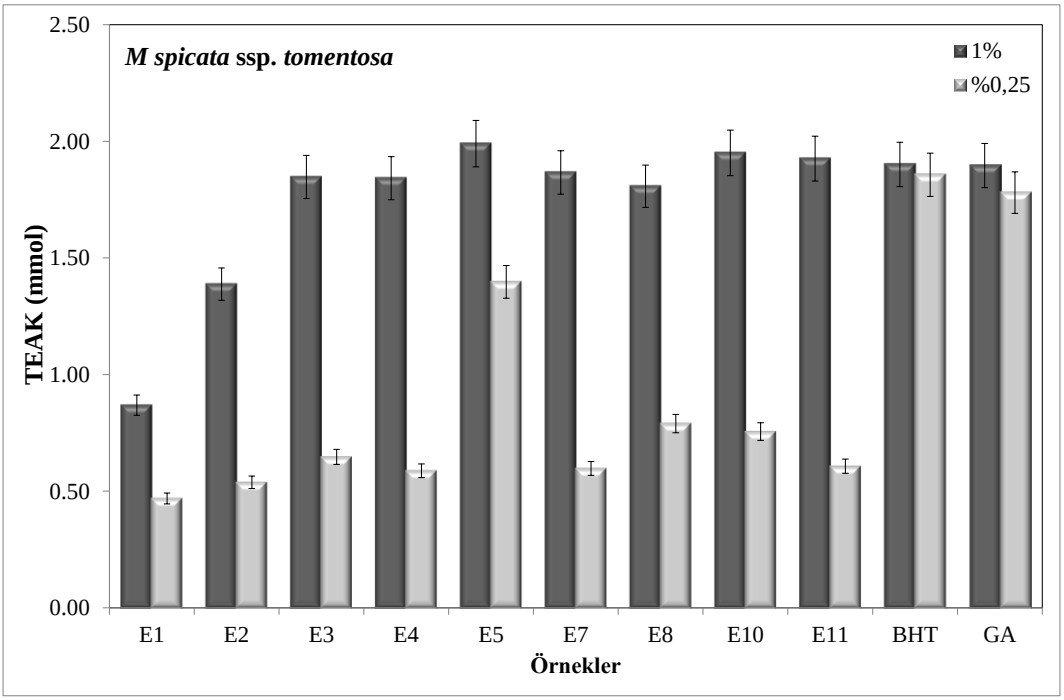
Buna göre 30 dakika sonunda % 1 ve % 0,1 konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler ile yapılan ölçümlerde % 0,1 konsantrasyonda aktivite gözlendiği fakat hiçbir ekstredeki etkinin pozitif kontrol olarak kullanılan Gallik asit ve BHT kadar yüksek çıkmadığı görülmüştür her iki türde de genel olarak asit hidroliz ekstreleri % 0,1 lik konsantrasyonda en çok (1,30 mM) TEAK gösteren ekstreler olarak bulunmuştur. % 1 lik konsatrasyonlarda ise her iki türde % 5'lik infüzyonun diklorometan fraksiyonu ve fraksiyonlama sonrası sulu kısım yaklaşık 2mM Troloksa eşdeğer antioksidan aktivite göstererek pozitif kontroller olan BHT ve Gallik asitle benzer sonuçlar vermişlerdir. Tüm konsantrasyonlarda en az etki hekzan ve etil asetat ekstrelerinde görülmüştür. Genel olarak bakıldığında *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* da *M. spicata* ssp. *spicata* ya göre daha yüksek aktivite görülmüştür.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) %70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) %70 metanol fraksiyonu sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu faza ait ekstreler.

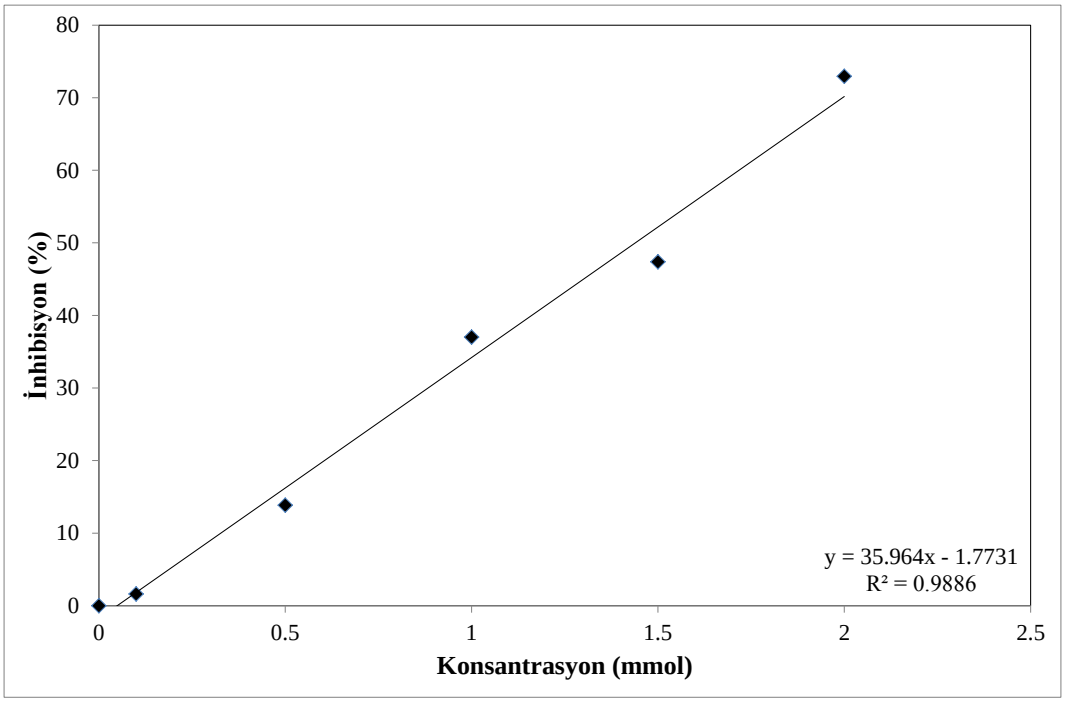
Şekil 83. *Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerinin ve standartların TEAK gücü (mM Troloks) grafiği



(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) %70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) %70 metanol fraksiyonu sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu faza ait ekstreler.

Şekil 84. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* ekstrelerinin ve standartların TEAK gücü (mM Troloks) grafiği

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

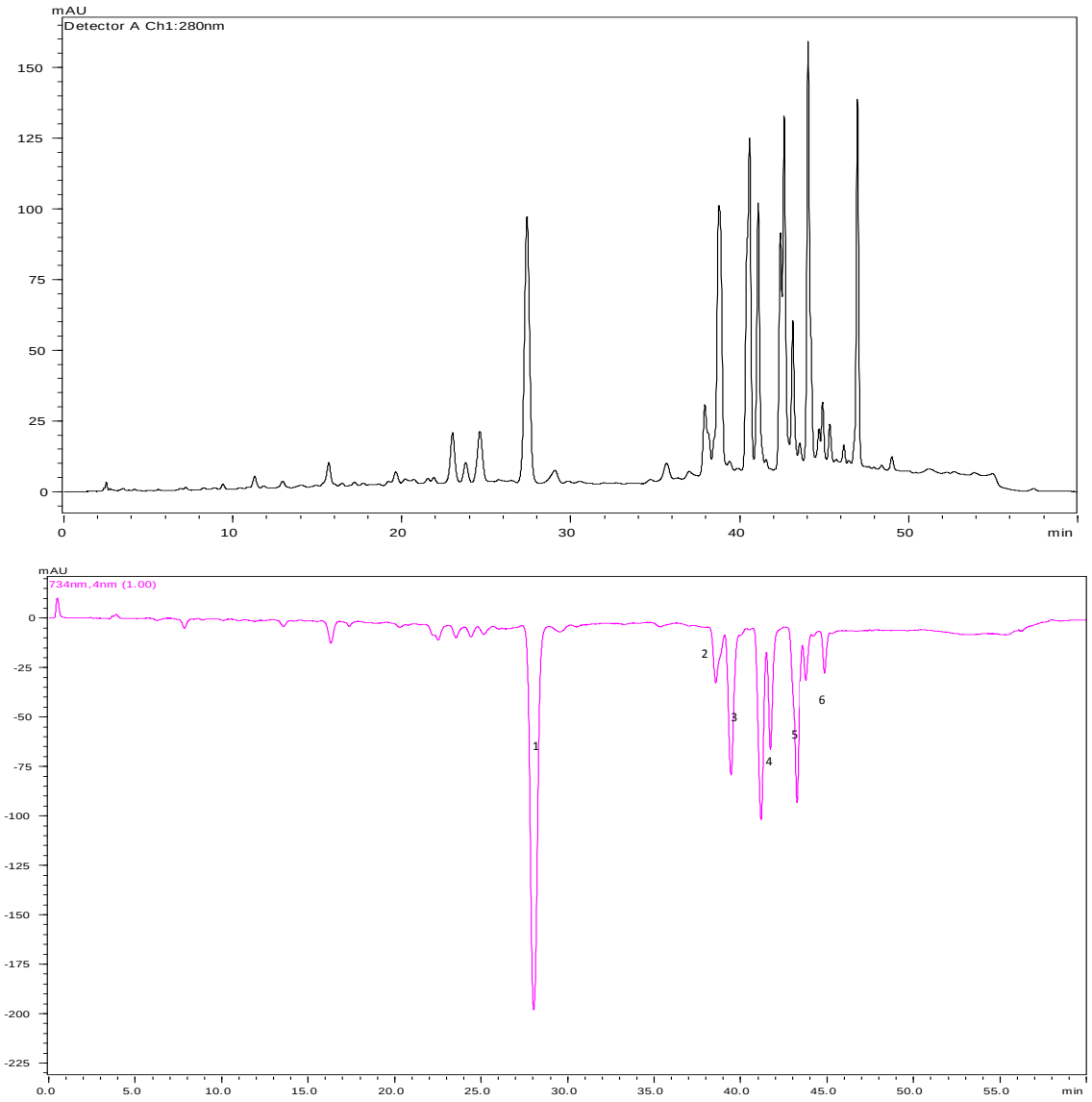


Şekil 85. Troloks kalibrasyon eğrisi

YBSK sonrası türevlendirme ile $ABTS^{+\bullet}$ Radikali Süpürücü etki sonuçları

$ABTS^{+}$ Radikali'nin sulu ve organik çözücülerde rahatlıkla çözülmesi ve geniş pH aralığına dayanıklı olması, YBSK sistemlerinde kolon sonrası türevlendirmelere dayalı antioksidan etkinin ölçülmesinde tercih edilme sebebi olmuştur. Bu amaçla TEAK deneyinde hazırlanan $ABTS^{\bullet+}$ radikal çözeltisi kullanılmıştır. Reaktif 0,7ml/dk akış hızı ile reaksiyon bölümüne YBSK pompası aracılığı ile gönderilmiştir. 13 m uzunluğunda ve 0,25 mm çaplı yüksek basınca dayanıklı bir reaksiyon kolonu bu amaçla kullanılmıştır. Bu reaksiyon kolonu YBSK kolon çıkışı ve $ABTS^{\bullet+}$ reaktif pompası arasına bir T bağlantısı ile yerleştirilmiştir. Tüp içerisindeki reaksiyon süresi 0,6 dakika olacak şekilde pompa akış hızı ayarlanmış ve türevlendirme sonrası ölçümler 734 nm'de PDA dedektör kullanılarak alınmıştır ve etkili pikler negatif pikler olarak dedekte edilmiştir (Koşar ve ark., 2003).

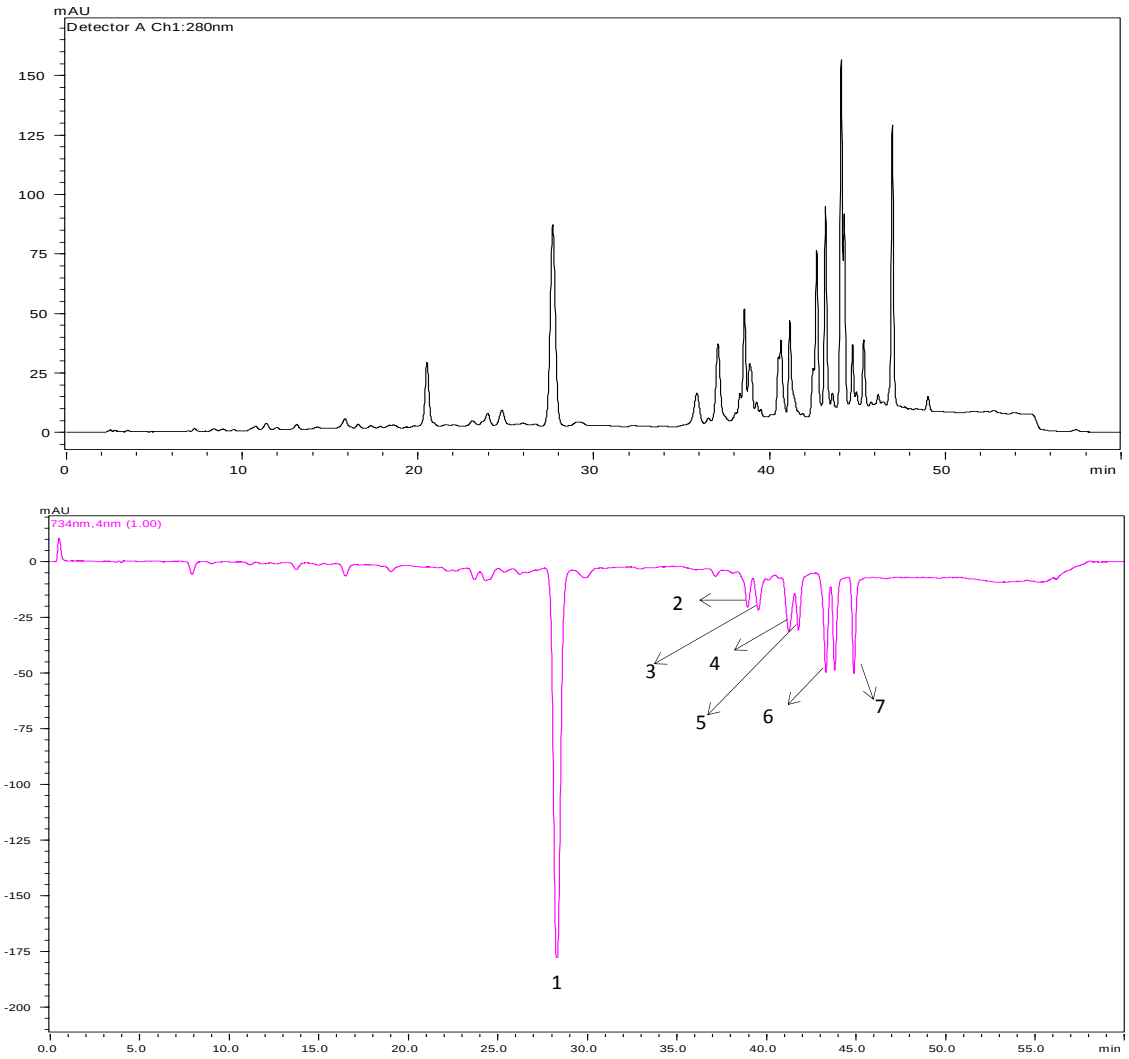
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: rozmarinik asit, 2: diosmetin, 3: hidroksi -trimetoksi flavon benzeri, 4: hidroksi trimetoksi flavon benzeri, 5:trihidroksi -trimetoksi flavon türevi, 6: 330 amu trimetoksi flavanon türevi

Şekil 86. *Mentha spicata* ssp. *spicata* Etil asetat ekstresine ait Kolon sonrası ABTS$^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

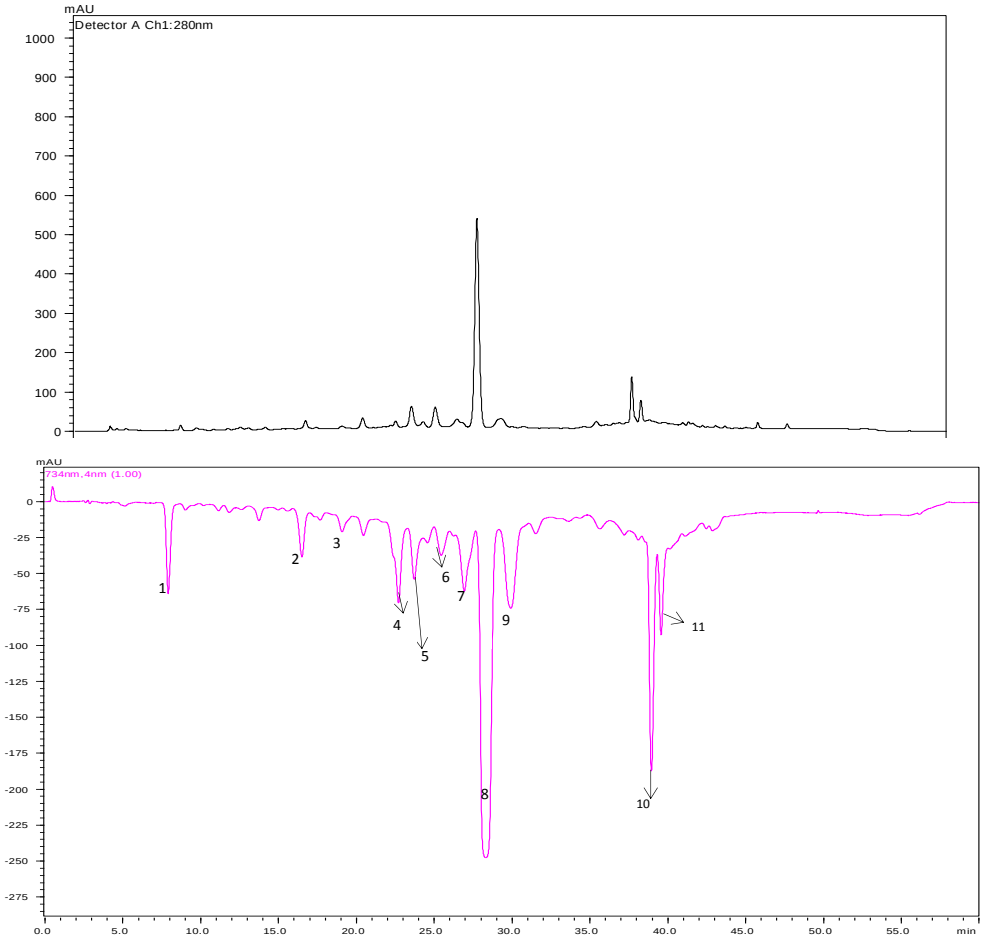
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: rozmarinik asit, 2: diosmetin, 3: luteolin, 4: hidroksi -trimetoksi flavon benzeri, 5: trihidroksi - trimetoksi flavon benzeri, 6: bilinmeyen 330 amu (Hidroksi—trimetoksi flavanon türevi), 7: genkvanin

Şekil 87. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* Etil asetat ekstresine ait kolon sonrası $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

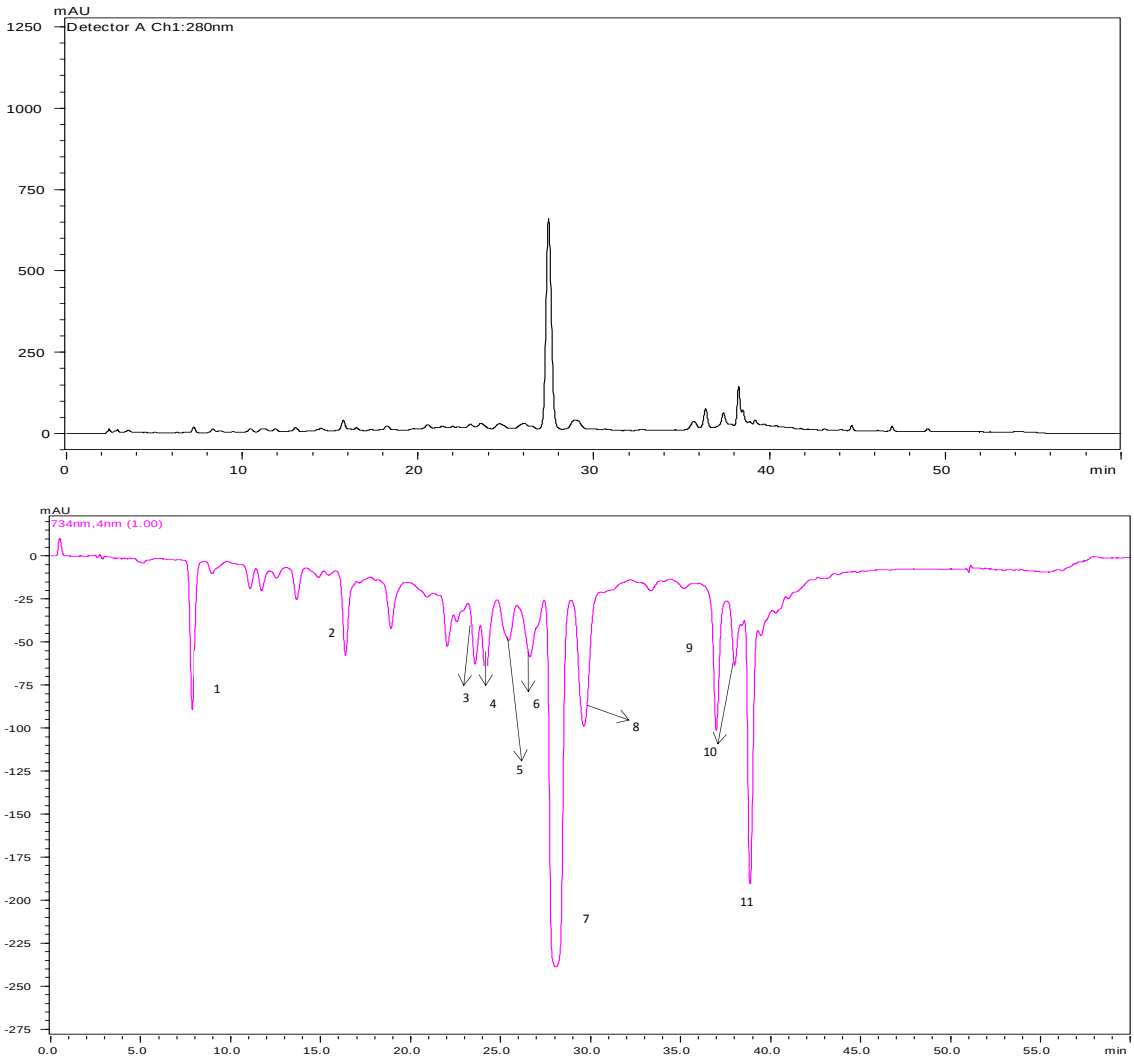
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1:danşensu dimer, 2: Kafeik asit, 3: Eriositrin, 4: 12-hidroksijasmonat sülfat ve narirutin, 5: luteolin rutinozit, 6: luteolin-7-glukozit, 7: izosalvianolik asit A ve hesperidin, 8: rozmarinik asit, 9: salvianolik asit B, 10: salvianolik asit C, 11: bilinmeyen *m/z* 713[M-H]

Şekil 88. *Mentha spicata* ssp. *spicata* %70 metanol ekstresine ait Kolon sonrası ABTS$^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

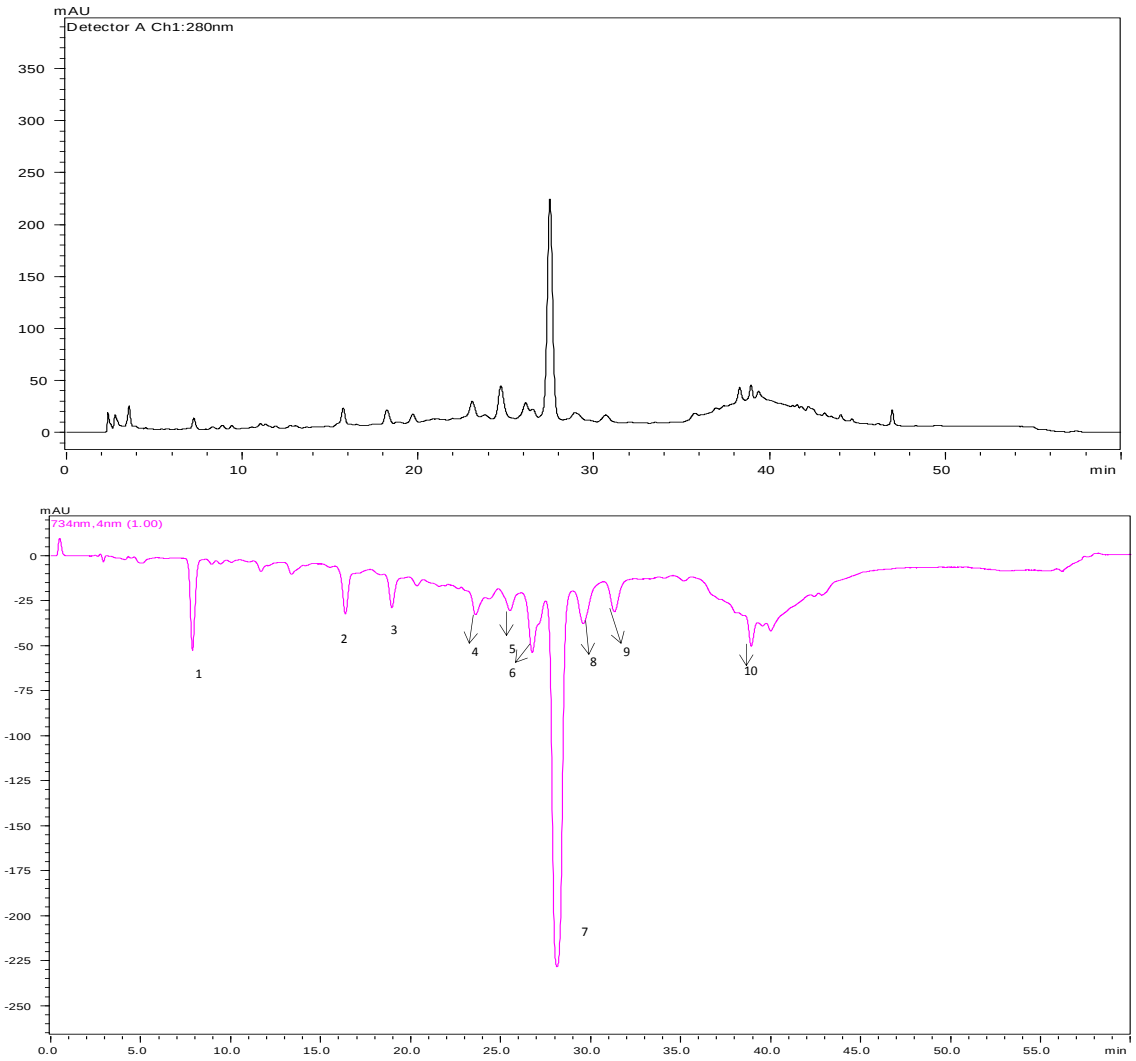
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1:danşensu dimer, 2: kafeik asit, 3: sagerinik asit (rozmarinik asit dimeri), 4: 12-hidroksijasmonat sülfat 5: luteolin rutinozit, 6: izosalvianolik asit a, luteolin glukuronik ve hesperidin, 7: rozmarinik asit, 8: salvianolik asit b ve ikarisit B5 glukopiranozit, 9: ponsirin, 10: salvianolik asit a, 11:salvianolik asit c türevi

Şekil 89. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* %70 metanol ekstresine ait Kolon sonrası $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

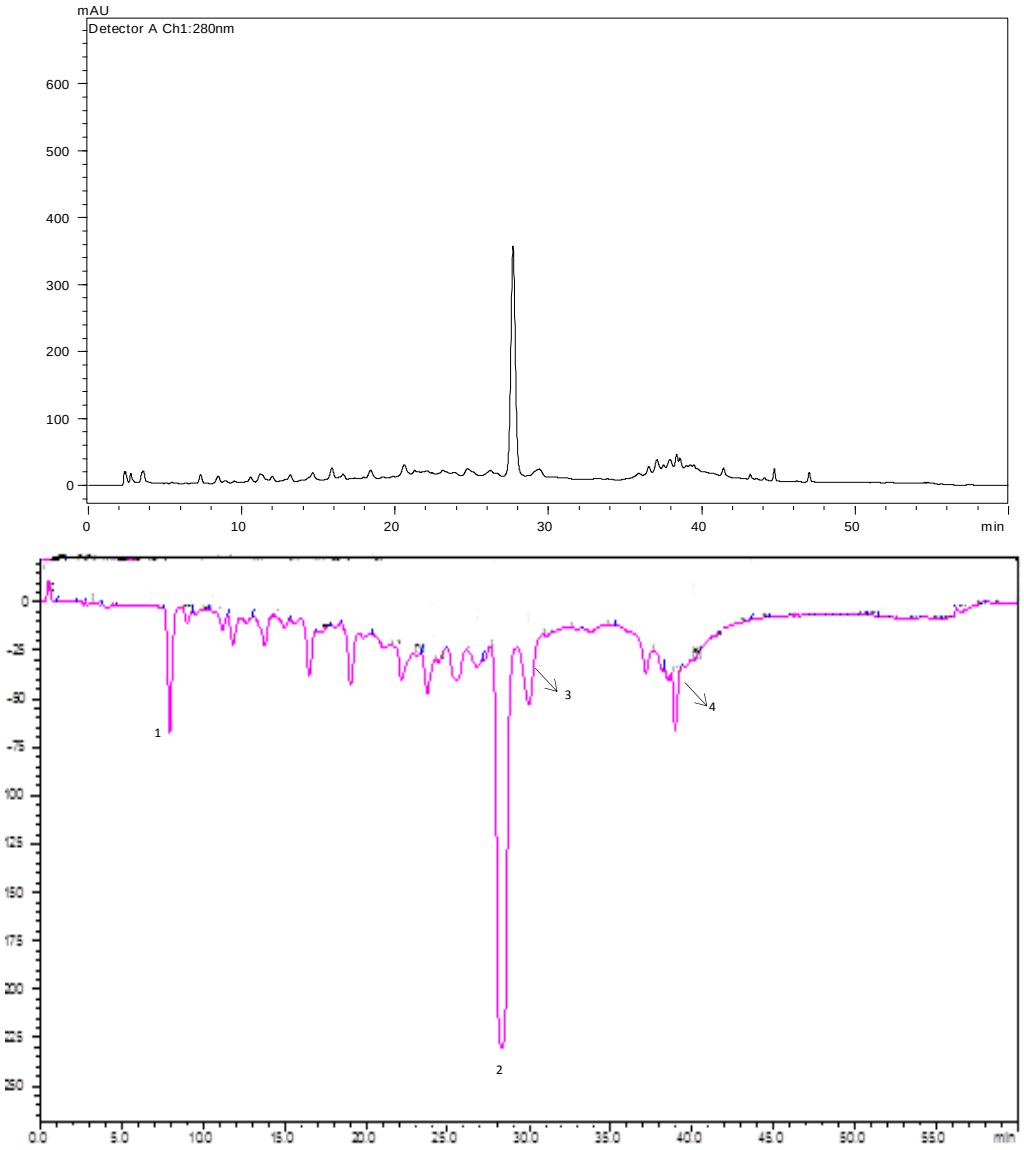
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: danşensu dimer, 2: kafeik asit, 3: eriositrin, 4:narirutin, 5: hesperidin, 6:izosalvianolik asit A ve bilinmeyen *m/z* 553(373, 355, 329), 7: rozmarinik asit, 8: salvianolik asit B, 9: salvianolik asit B türevi, 10: luteolin

Şekil 90. *Mentha spicata* ssp. *spicata* sulu ekstresine ait Kolon sonrası $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

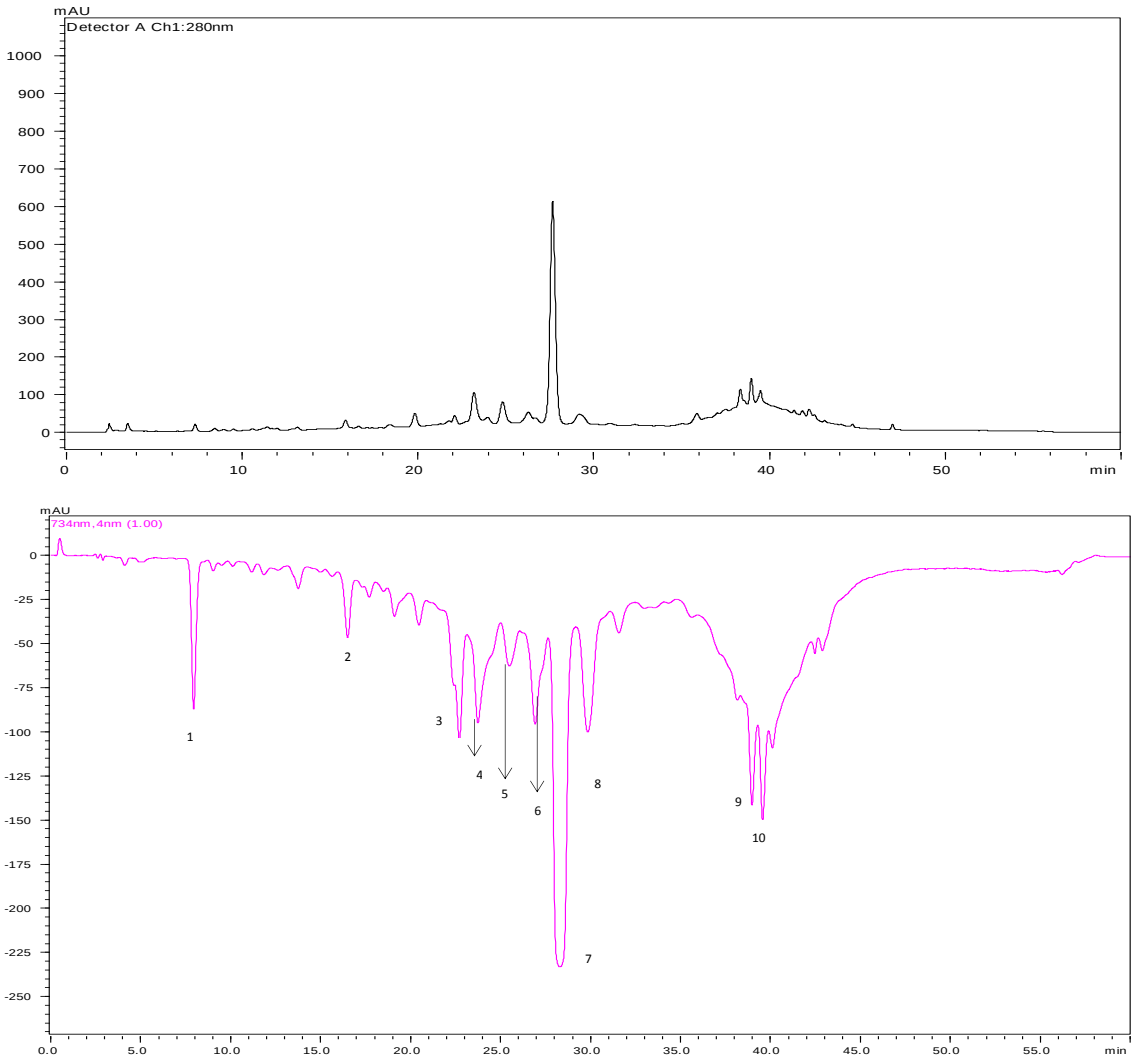
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: danşensu dimer, 2: rozmarinik asit, 3: salvianolik asit B, 4: luteolin

Şekil 91. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* sulu ekstresine ait Kolon sonrası ABTS$^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

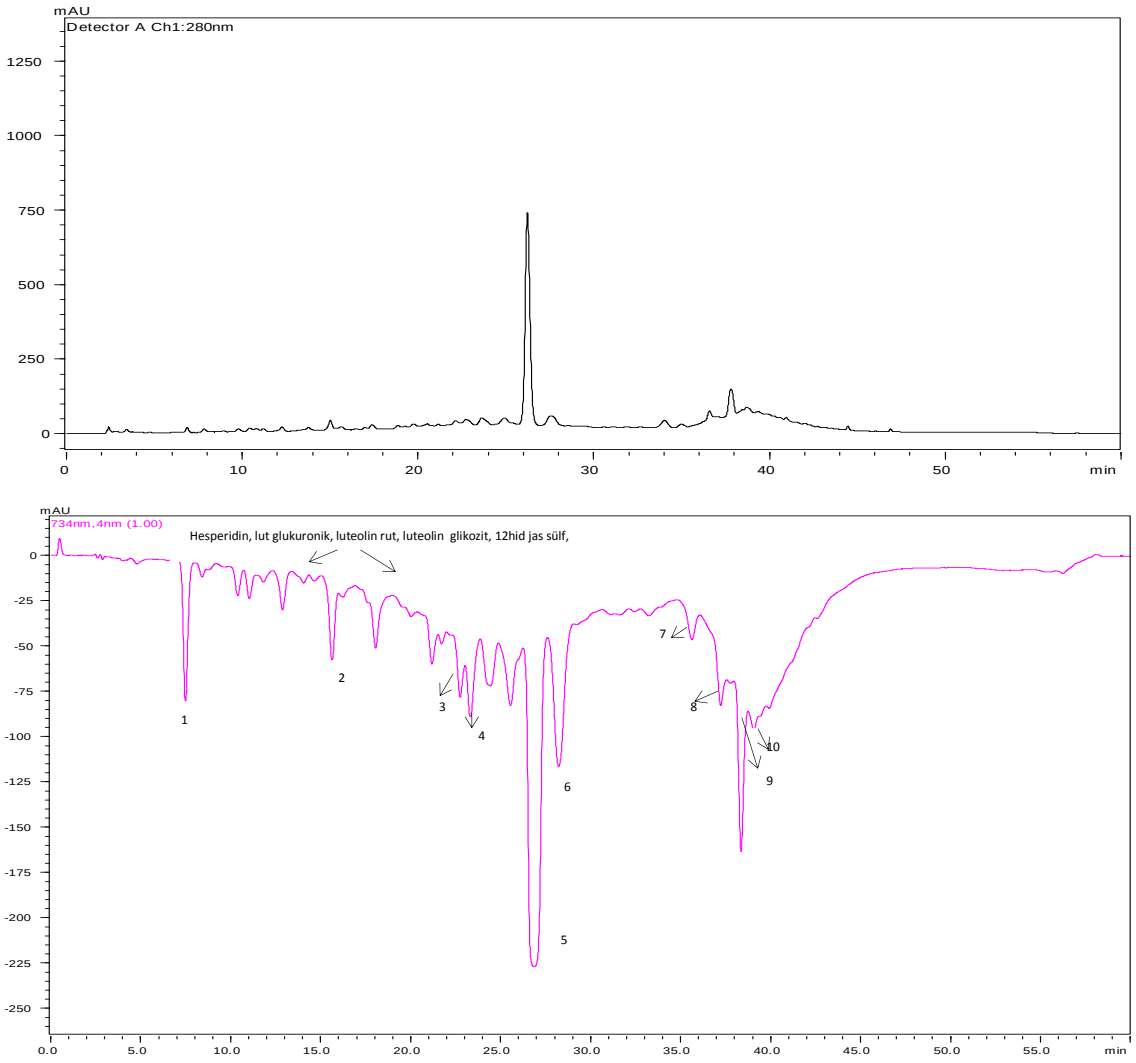
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: danşensu dimer, 2: kafeik asit, 3: salvianolik asit E, 4:narirutin, 5: hesperidin, 6:izosalvianolik asit A ve luteolin glukronit, 7: rozmarinik asit, 8: salvianolik asit B, 9: luteolin 10: bilinmeyen salvianolik asit türevi *m/z* 713 (533, 515, 471, 335)

Şekil 92. *Mentha spicata* ssp. *spicata* %70 metanol ekstresine ait fraksiyonlama sonrası sulu kısıma ait Kolon sonrası $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

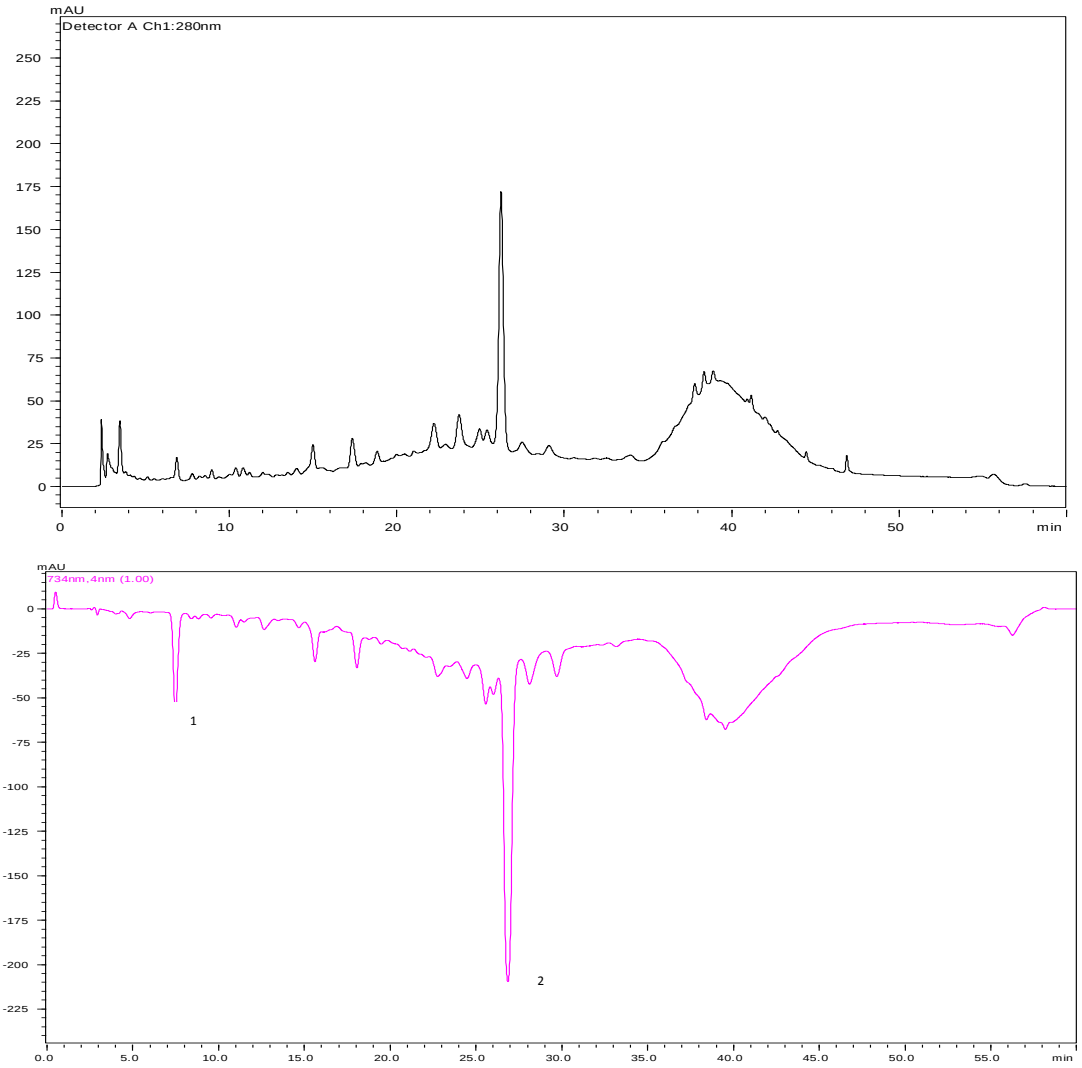
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: danşensu dimer, 2: kafeik asit, 3: narirutin, 4: kafeik asit sülfat tuzu, 5: rozmarinik asit, 6: salvianolik asit B, 7: ponsirin, 8: salvianolik asit A, 9: Salvianolik asit C türevi, rozmarinik asit sülfat tuzu ve luteolin, 10: asesatin

Şekil 93. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* %70 metanol ekstresine ait fraksiyonlama sonrası sulu kısıma ait Kolon sonrası ABTS$^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

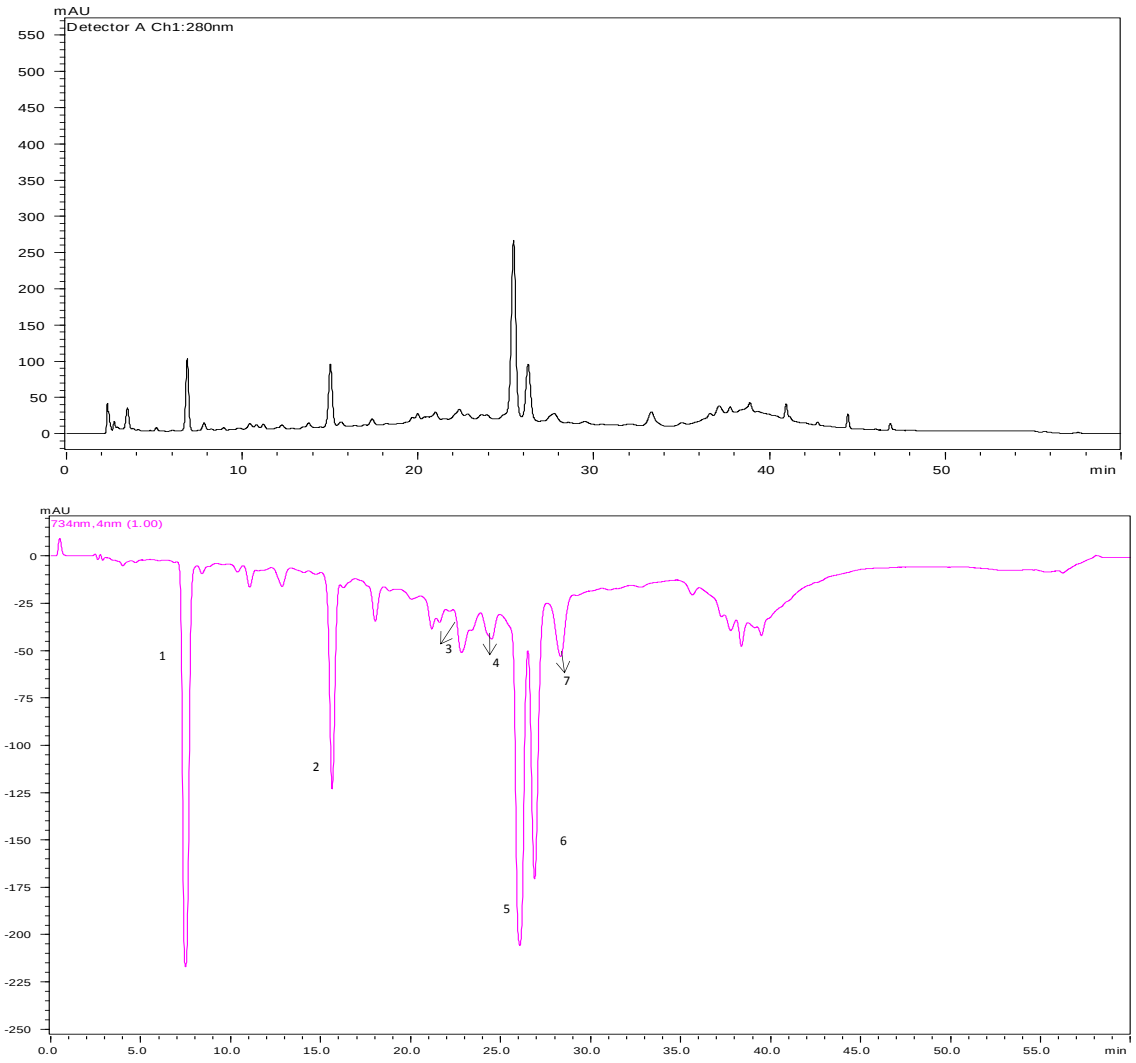
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: danşensu dimer, 2: rozmarinik asit

Şekil 94. *Mentha spicata ssp. spicata* sulu ekstresinin fraksiyonlama sonrası sulu kısmına ait Kolon sonrası $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

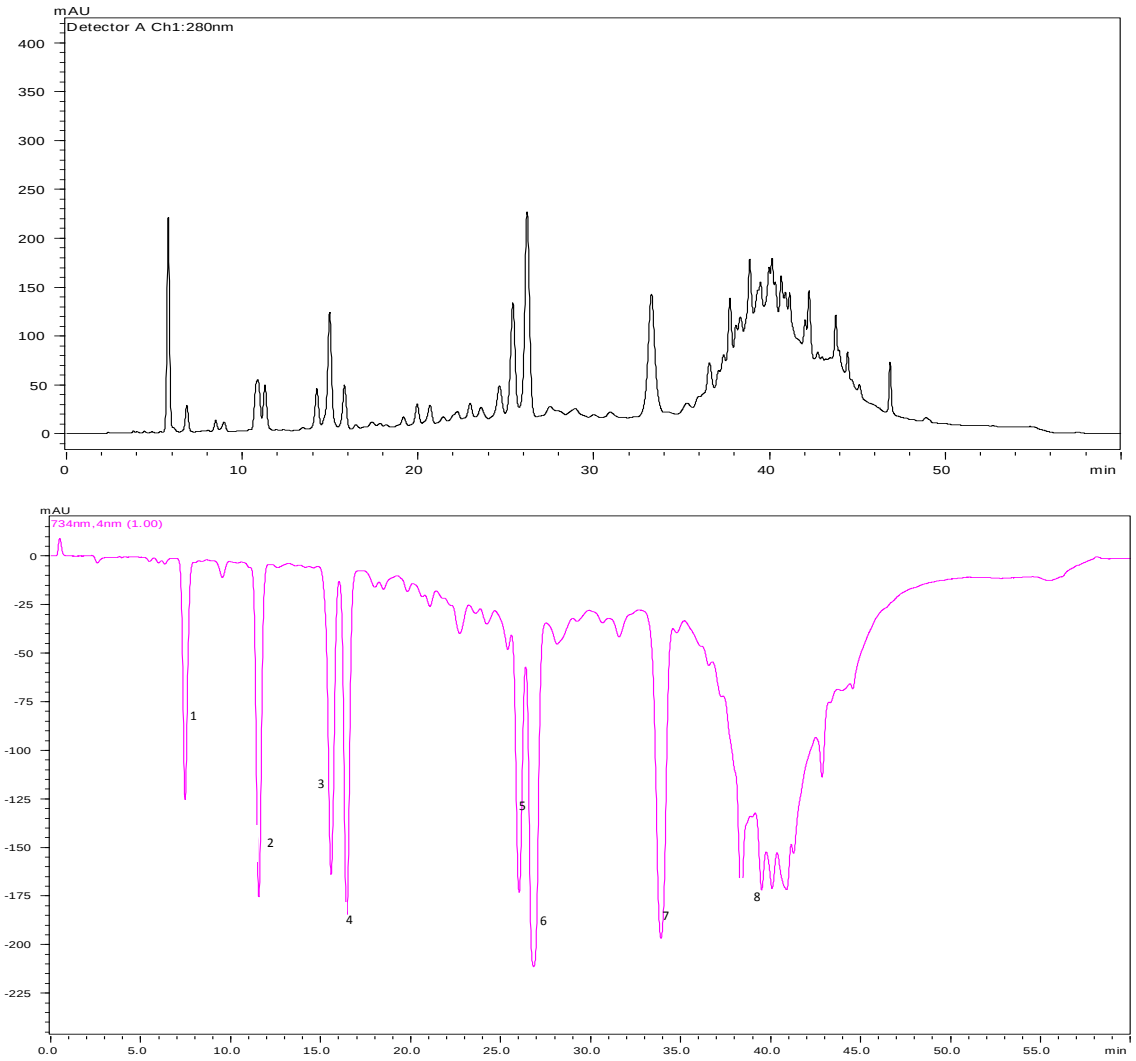
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: danşensu dimer, 2: kafeik asit, 3: 12-hidroksi jasmonat sülfat, 4: luteolin glukronit, 5: rozmarinik asit, 6:salvianolik asit B, 7: apigenin rutinozit

Şekil 95. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* sulu ekstresinin fraksiyonlama sonrası sulu kısmına ait Kolon sonrası $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

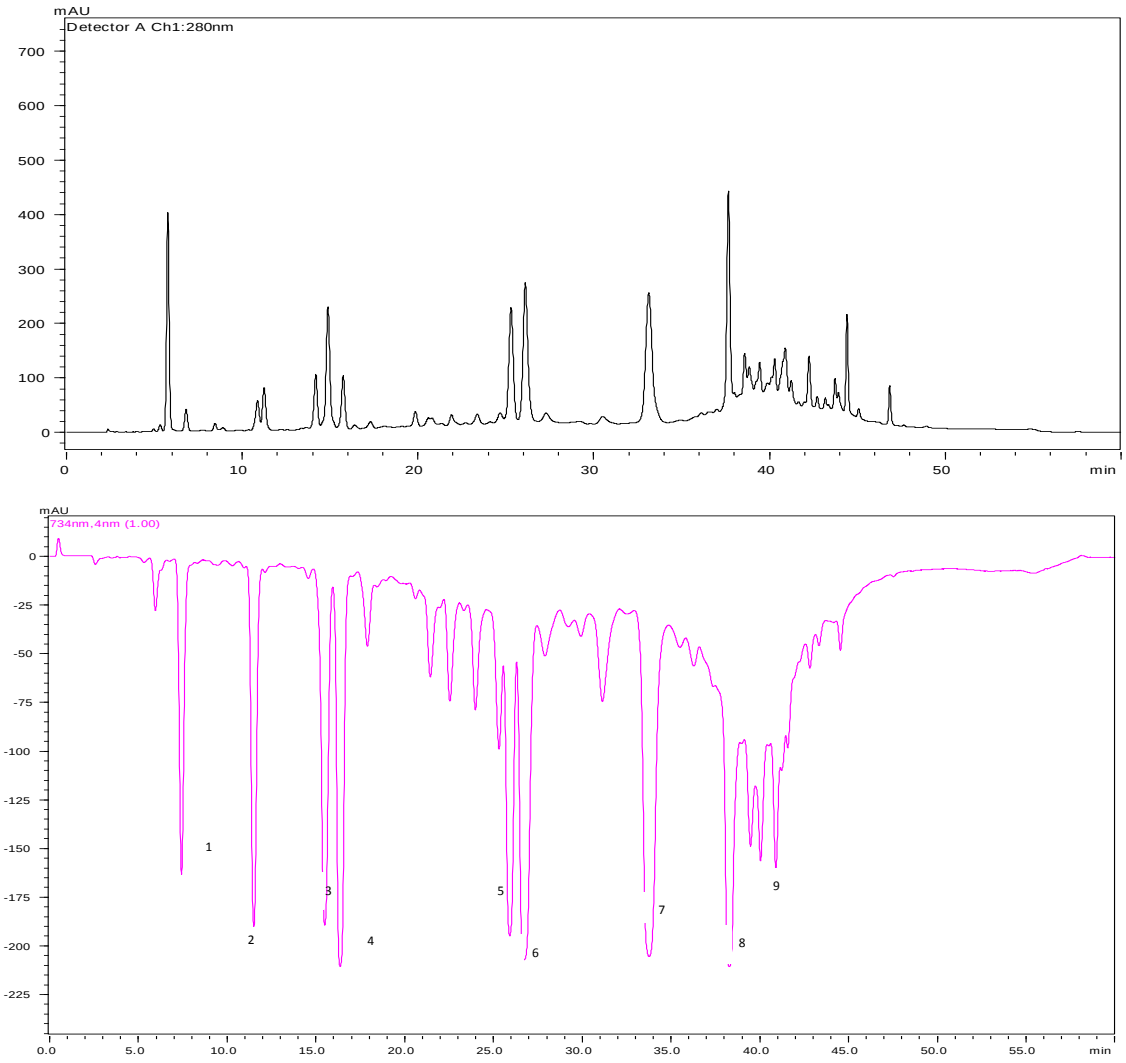
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



1: danşensu dimer, 2: metil DSS ve bilinmeyen, 3: kafeik asit, 4: dimetil danşensu, 5: hesperetin glukozit, 6: rozmarinik asit, 7: metil rozmarinat, 8: dimetil rozmarinat,

Şekil 96. *Mentha spicata* ssp. *spicata* asit hidrolizi ekstresine ait kolon sonrası ABTS$^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

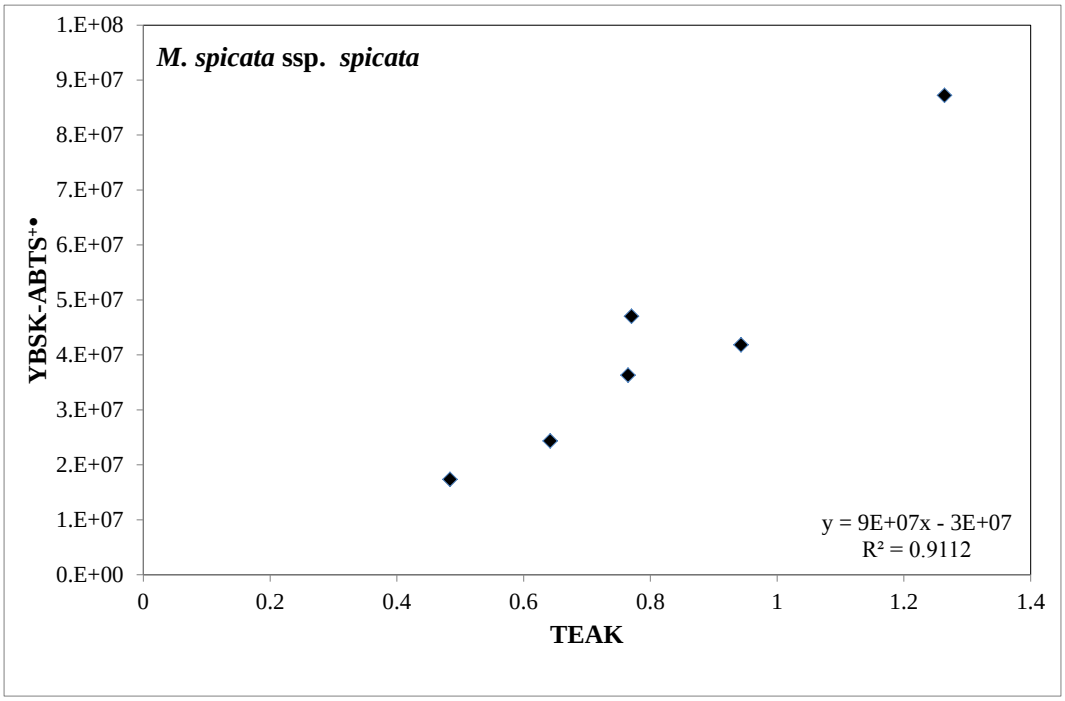
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



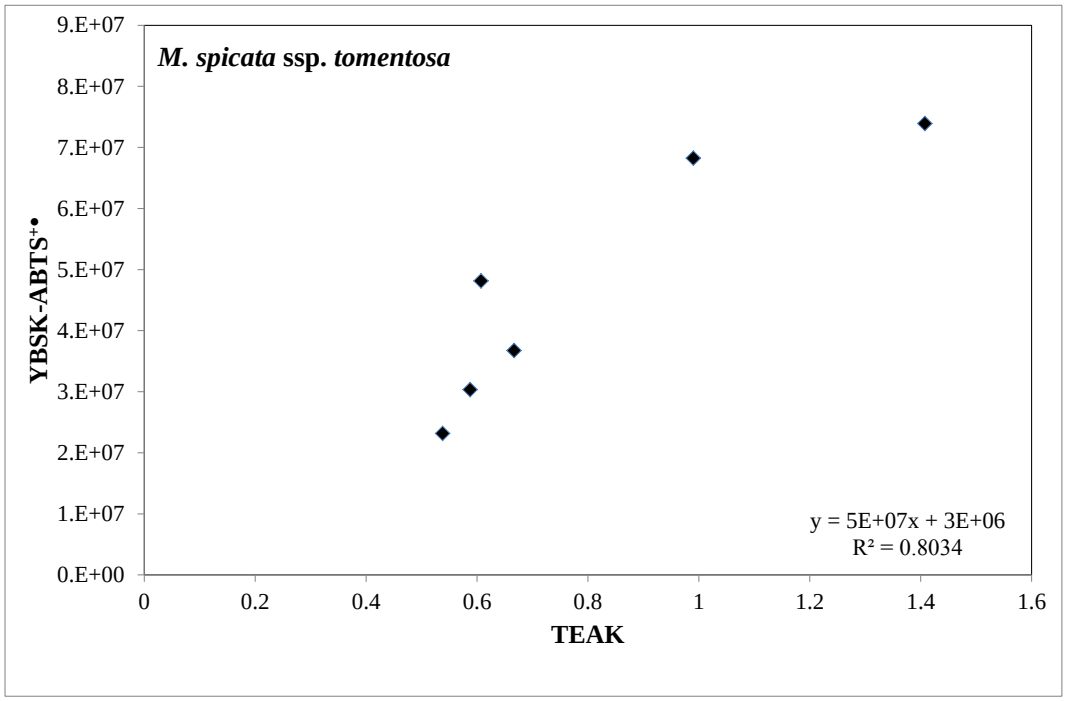
1: danşensu dimer, 2: metil danşensu ve bilinmeyen, 3: kafeik asit, 4: dimetil danşensu, 5: hesperetin glukozit, 6: rozmarinik asit, 7: metil rozmarinat, 8: dimetil rozmarinat, 9: asesatin, luteolin asetilglukozit, hidroksi -trimetoksi flavon türevi.

Şekil 97. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* asit hidrolizi ekstresine ait kolon sonrası $ABTS^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 98. ***Mentha spicata*** **ssp.** ***spicata*** **YBSK sonrası ABTS$^{\bullet+}$ radikali ile türevlendirme sonrası negatif pik alanları toplamı ve ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürücü etki deneyi arasındaki korelasyon grafiği**



Şekil 99. ***Mentha spicata*** **ssp.** ***tomentosa*** **YBSK sonrası ABTS•+ radikali ile türevlendirme sonrası negatif pik alanları toplamı ve ABTS$^{\bullet+}$ radikali süpürücü etki deneyi arasındaki korelasyon grafiği**

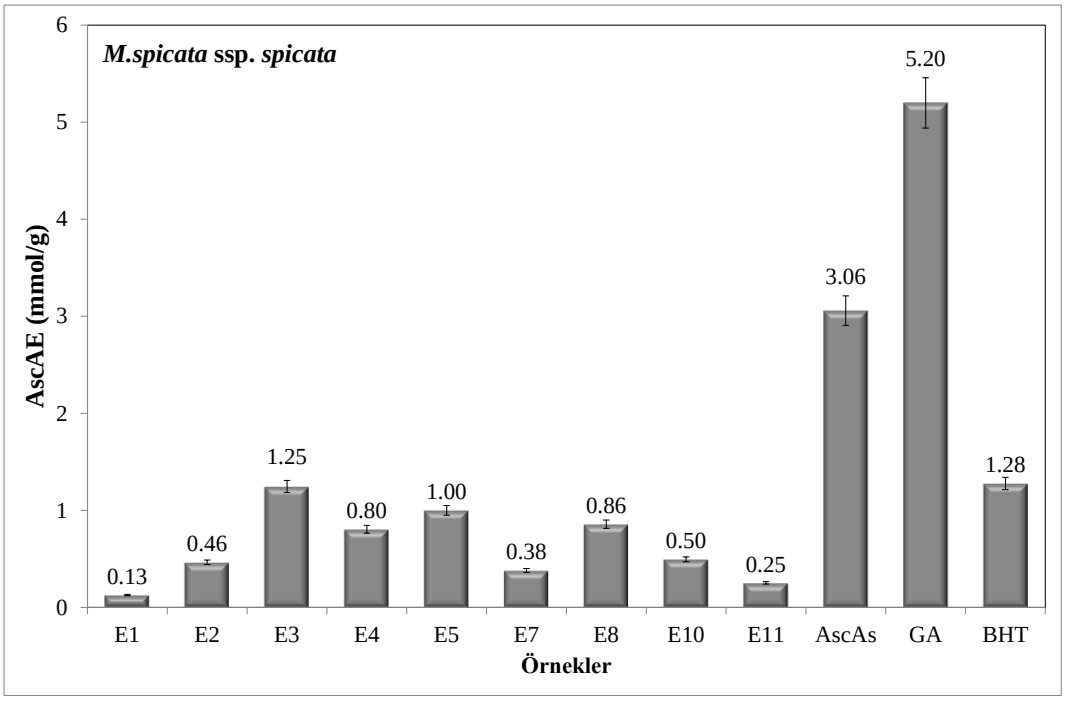
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

İndirgeme gücünün belirlenmesi

Maddelerin indirgeme güçleri ile antioksidan aktivite arasında genellikle doğrusal bir bağlantı vardır. Bu nedenle indirgeme kapasitesinin belirlenmesi o maddenin antioksidan aktivitesi hakkında bilgi verebilir. Bu amaçla *Mentha spicata* alttürlerinden elde edilen ekstrelerin ve standartların demiri indirgeme kapasiteleri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 100 ve 101 de verilmiştir. Burada verilen sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

Mentha ekstreleri ile yapılan deneyler sonucunda hiçbir ekstre pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT ve gallik asit kadar aktif bulunmamıştır.

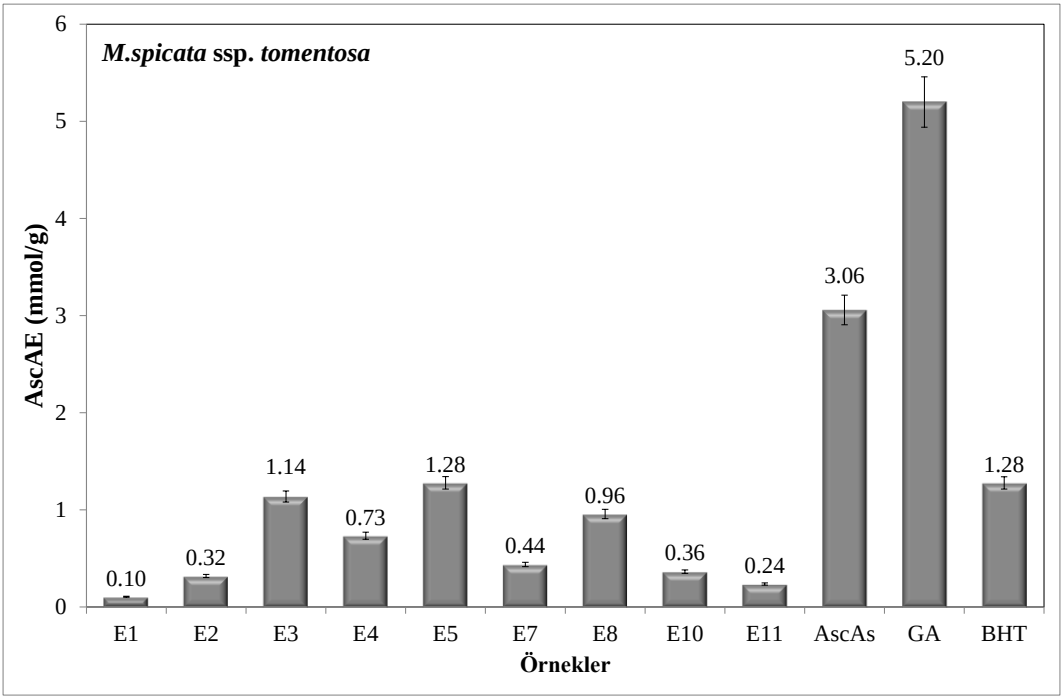
% 70 metanol ektresinin demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme gücü en yüksek olarak bulunmuştur.



(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) % 5'lik infüzyon diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısma ait ekstreler.

Şekil 100. *Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



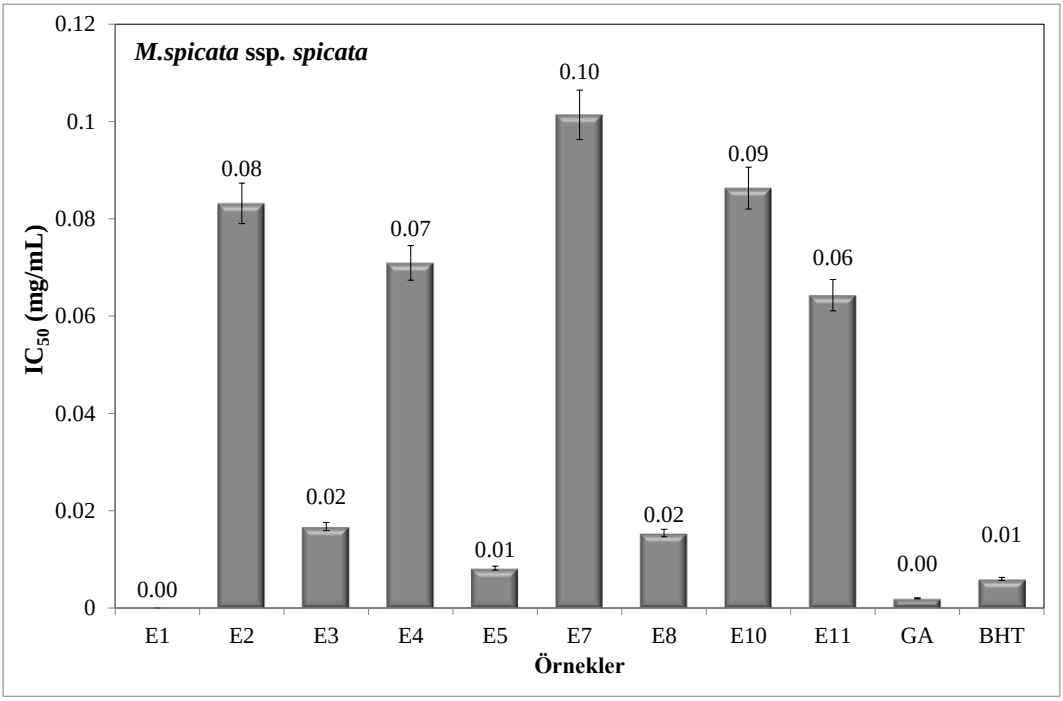
(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) % 5'lik infüzyon diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısma ait ekstreler.

Şekil 101. *Mentha spicata ssp. tomentosa* ekstrelerinin ve standartların demir(III)'ü demir(II)'ye indirgeme gücü

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

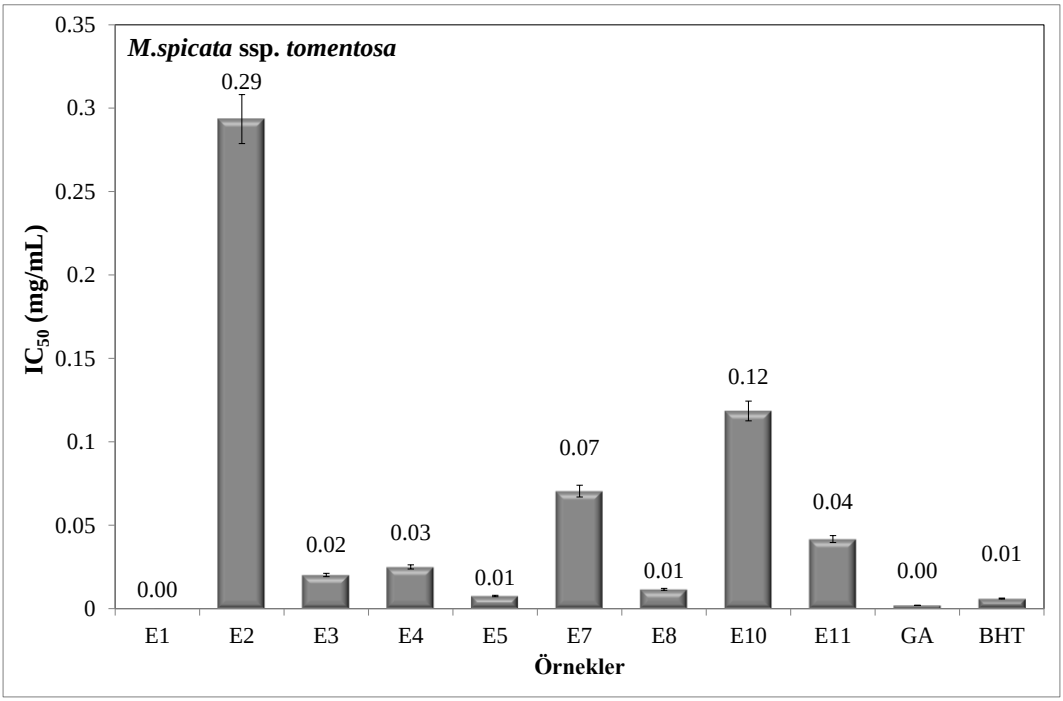
IC_{50} değerleri, radikalin % 50'sini süpürebilecek gerekli konsantrasyon olarak tanımlanır. Ekstrelerin IC_{50} değerleri hazırlanan doğrusal olmayan eğriler kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 102 ve 103'te verilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) %70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu faza ait ekstreler

Şekil 102. *Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerinin ve standartların DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri



(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) %70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu faza ait ekstreler

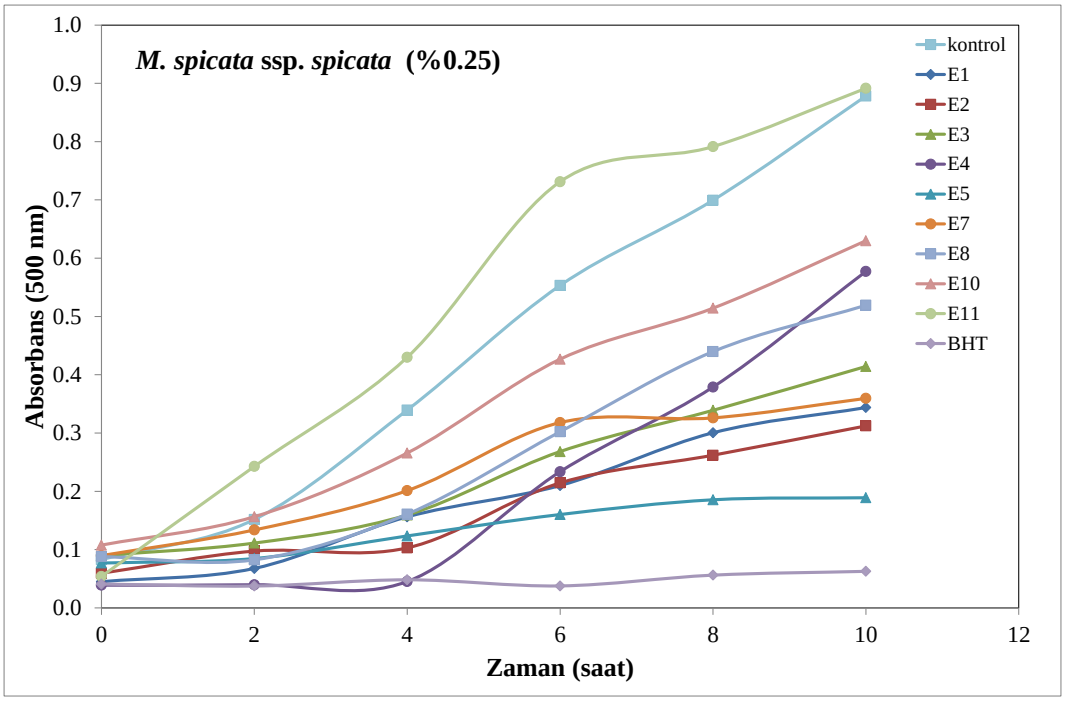
Şekil 103. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* ekstrelerinin ve standartların DPPH• radikalini süpürme kapasiteleri

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

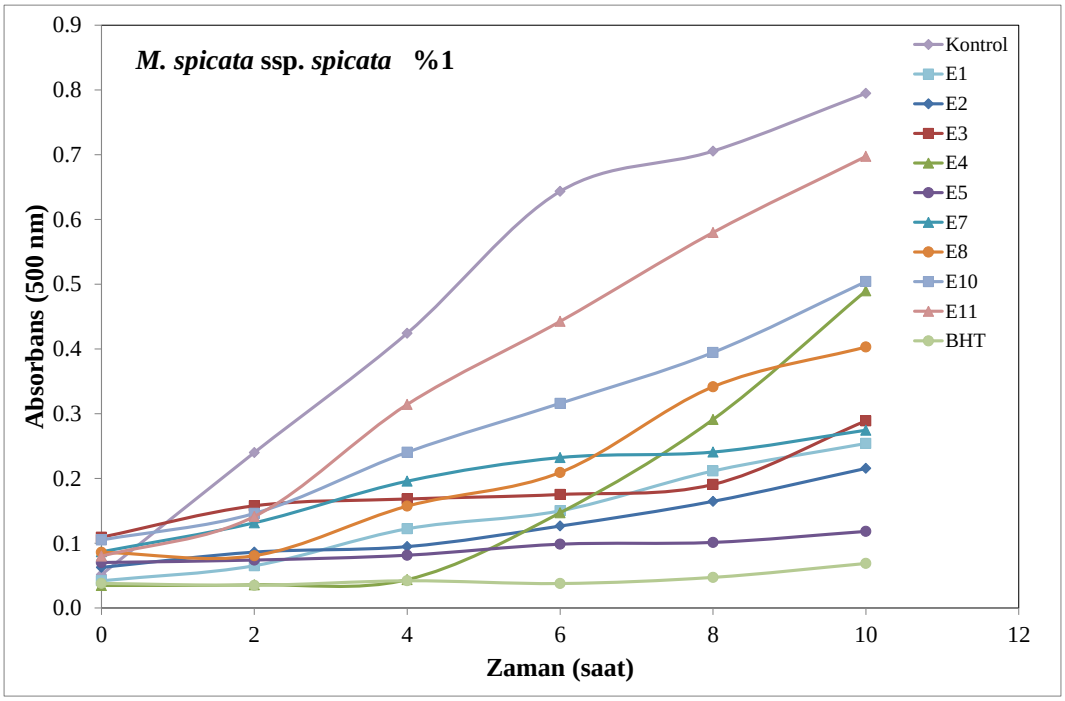
Mentha ekstreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda hekzan ekstresi dışındaki tüm ektrelerin radikal süpürücü etki gösterdikleri belirlenmiştir. Şekil 102 ve 103'e göre Asit hidrolizi ekstreleri diğerlerine göre daha aktif olarak bulunmuştur. Her iki bitkiden elde edilen asit hidrolizi ekstreleri pozitif kontrol olarak kullanılan, BHT ve gallik asit kadar etkili bulunmuşlardır %70 Metanol ekstresi ve sulu fraksiyonu her iki türde de etkili olarak tespit edilmiştir. İnfüzyon ile elde edilen sulu ekstresi *M. spicata* ssp *tomentosa* türü *M. spicata* ssp *spicata* ya göre yaklaşık 3 kat daha etkili bulunmuştur. Buna karşılık etil asetat ekstresi *M. spicata* ssp *tomentosa* da yaklaşık 3.5 kat daha az etkili bulunmuştur.

Linoleik asit peroksidasyonunu inhibe edici etki tayini

Hem gıdaların korunmasında hem de hücrelerin korunmasında lipitlerin oksidasyonunun engellenmesinin önemi büyüktür. Bu amaçla hem gıdalarda hem de hücre duvarlarında en fazla bulunan doymamış yağ asidi olan linoleik asidin oksidasyonunun engellenmesine dayalı olarak geliştirilen bu metotta, %0.25 ve %1 konsantrasyonda hazırlanan ekstreler kullanılmıştır. Linoleik asit peroksidasyonu üzerine ekstrelerin etkileri hızlandırılmış oksidasyon testi ile yapılmıştır. Deney sonucunda alınan bozunma eğrileri zamana bağlı olarak *M. spicata* ssp. *spicata* için Şekil 104 ve *M. spicata* ssp *tomentosa* için Şekil 105'de verilmiştir. Ayrıca ekstrelerin 10 saat sonundaki linoleik asit peroksidasyonunu hangi oranda inhibe ettikleri ise yüzde olarak Çizelge 12'de verilmiştir. Her iki bitkinin hekzan ve etilasetat ekstreleri lipidik sistemde her iki konsantrasyonda da aktif bulunurken, diğer sistemlerde etkili olarak bulunan asit hidrolizi ekstreleri bu sistemde de etkili bulunmuştur. Yüksek fenolik madde içeren %70 metanol ekstreleri ise etkisiz bulunmuştur. *M. spicata* ssp *tomentosa* ya ait asit hidrolizi ekstresi bütün ekstreler içinde en etkili ektre olarak tespit edilmiştir. Hiçbir ekstre pozitif kontrol BHT kadar etkili çıkmamıştır.

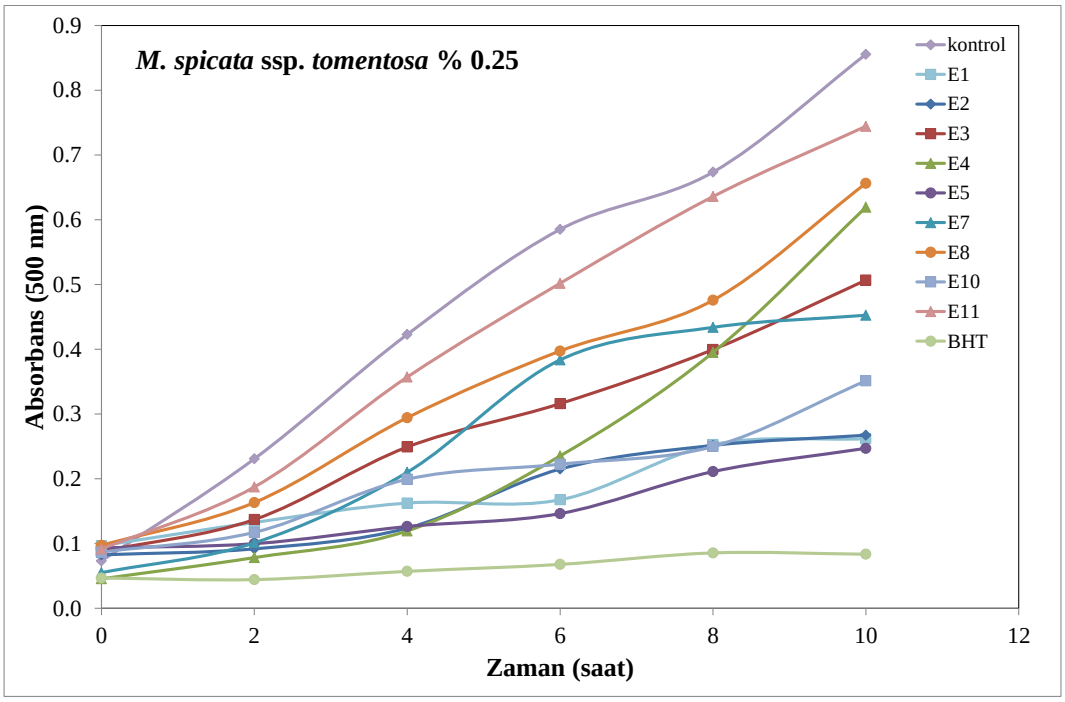


ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

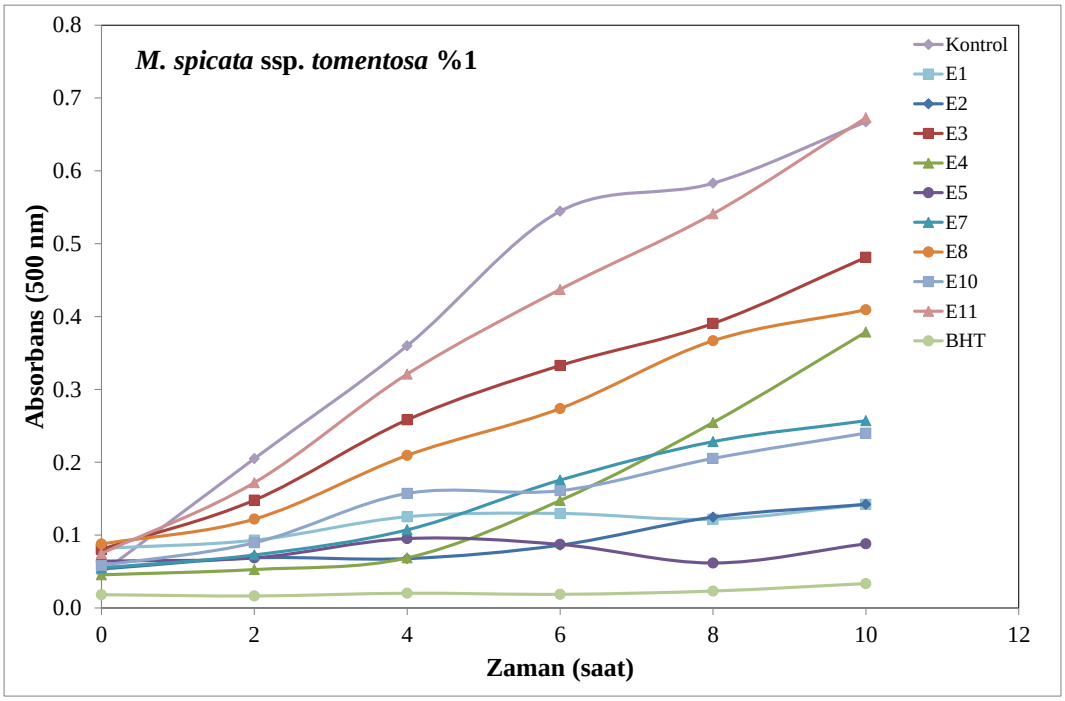


(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu: (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısıma ait ekstreler

Şekil 104. *Mentha spicata* ssp. *spicata* Linoleik asit oksidasyonunda, ekstrelerinin ve standartların etkileri.



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu kısıma ait ekstreler

Şekil 105. *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* Linoleik asit oksidasyonunda ekstrelerinin ve standartların etkileri.

Malondialdehit (MDA) değerinin ölçümü (TBA metot)

Linoleik asitin oksidasyonu sonucu oluşan MDA'in miktarının belirlenmesi amacıyla yapılan bu testte, MDA, linoleik asit oksidasyonu sonucunda oluşturulmuş ve TBA ile reaksiyona sokularak oluşan oksidasyon derecesi belirlenmiştir. Ölçümlerde yukarıda 10 saat süre ile okside edilen linoleik asit çözeltisi kullanılmıştır. Bu 10 saatlik oksidasyon sonucunda ekstrelerin etkileri % inhibisyon değerleri olarak hesaplanmış ve Şekil 4.12'de verilmiştir.

Burada asit hidroliz, hekzan ve etilasetat ekstreleri en etkili bileşikler olarak tespit edilmiştir. Su bazlı ekstrelerde ve sulu fraksiyonlarda sonuç düşük bulunmuştur. Bütün ekstreler için de en düşük sonuç Sulu ekstrenin fraksiyonlanması sonucu arta kalan sulu kısımda bulunmuştur.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Çizelge 12. Ekstrelerinin 10 saatlik hızlandırılmış oksidasyon sonundaki MDA oluşumunu inhibe etme yüzdeleri

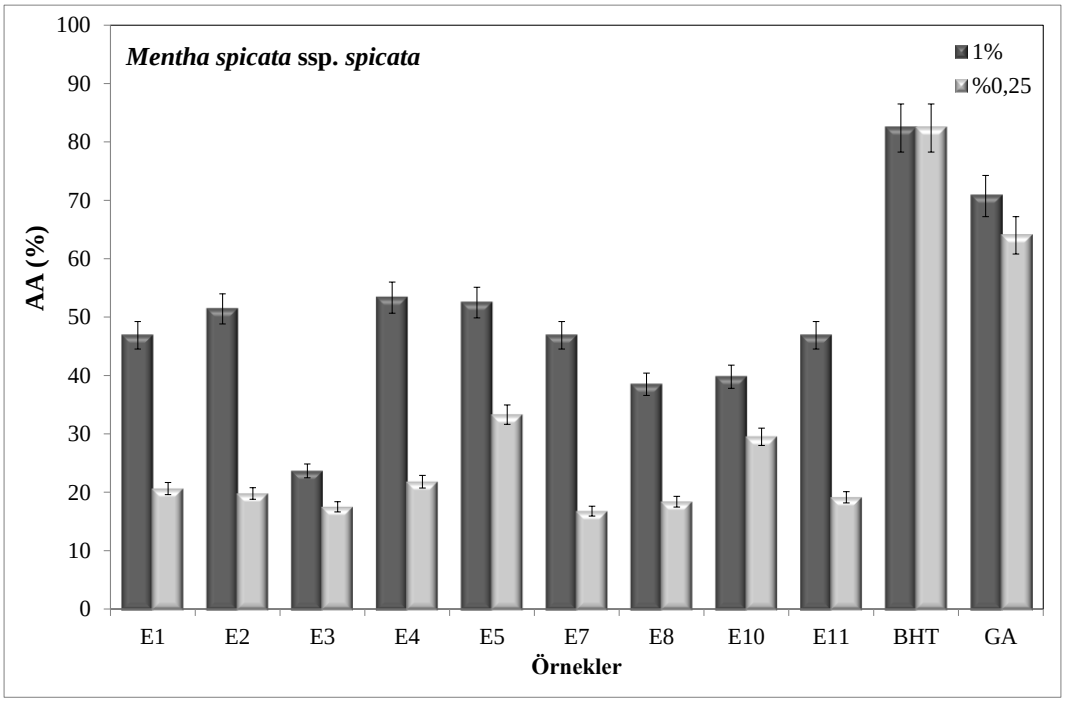
Örnekler	% 0.25'lik konsantrasyon		% 1'lik konsantrasyon	
	ssp *spicata*	ssp *tomentosa*	ssp *spicata*	ssp *tomentosa*
E1	55.72±0.17	57.19±0.10	54.50±0.70	62.17±0.54
E2	66.19±0.22	49.41±0.12	69.04±0.15	67.79±0.20
E3	53.72±0.34	27.45±0.46	58.30±0.25	55.54±0.38
E4	36.83±0.16	22.38±0.20	46.59±0.27	30.10±0.18
E5	63.02±0.63	61.69±0.19	72.41±0.40	65.00±0.20
E7	59.87±0.85	33.78±0.21	66.55±0.15	59.33±0.25
E8	46.97±0.23	5.30±0.10	56.71±0.58	29.25±0.26
E10	28.56±0.27	30.76±0.26	62.18±0.23	62.00±0.15
E11	25.96±0.20	7.99±0.60	30.77±0.98	28.18±0.19
BHT	79.26±0.16	88.68±0.40	92.58±0.96	89.04±0.13

(E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) % 70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) % 70 metanol fraksiyon sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu faza ait ekstreler.

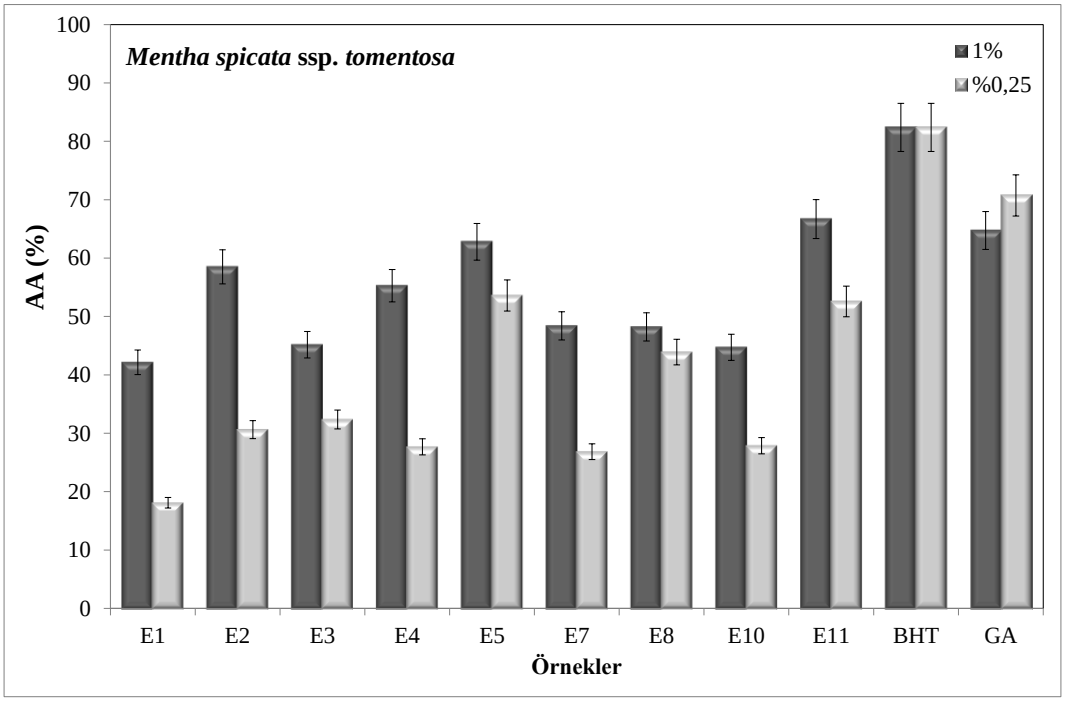
β-Karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini

β-Karoten-linoleik asit beraber oksidasyon deneyinde amaç yine lipit peroksidasyonunun derecesinin ölçülmesidir. Bu deney daha çok gıdaların oksidasyonlarının ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır. *Mentha* ekstrelerinin β-karoten-linoleik asit oksidasyonunu engelleme dereceleri Şekil 106 ve şekil 107'de verilmiştir. Bu şekillerden de görülebileceği gibi görülebileceği gibi, her iki bitkiden de elde edilen tüm ekstreler belli oranlarda inhibitör aktivite gösterselerde hiçbir ekstre pozitif kontroller kadar etkili olamamıştır

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



Şekil 106. ***Mentha spicata*** **ssp.** ***spicata*** **ekstrelerinin ve standartların β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini**



Şekil 107. ***Mentha spicata*** **ssp.** ***tomentosa*** **ekstrelerinin ve standartların β -karoten/linoleik asit oksidasyonunu inhibe edici etki tayini**

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

SONUÇ ve TARTIŞMA

Mentha spicata alttürlerinin fenolik bileşikleri ile ilgili yapılmış ilk araştırma yaklaşık 40 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu çalışmada belirlenen fenolik maddeler luteolin, apigenin ve diosmetin olmuştur (Subramanian ve ark., 1972). Ülkemizde yapılan fakat alt tür belirtilmeyen başka bir çalışmada ise protokateşik asit, kafeik asit, siringik asit, rozmarinik asit, ferulik asit ve *o*-kumarik asite rastlanmıştır (Tuncel ve ark., 2010). *M. spicata* var. *crispa* ile yapılan bir çalışmada kafeik asit, eriositrin, rozmarinik asit, luteolin, apigenin, eriodiktiyol, apigenin rutinozit, luteolin glukozit belirlenmiştir (Koşar ve ark., 2004).

Mentha spicata ssp. *spicata* ve *M. spicata* ssp. *tomentosa* ile ilgili fenolik bileşiklerine ait ayrıntılı çalışmalar bulunmamaktadır. Bu türlerden *M. spicata* ssp. *spicata* ile ilgili yapılmış tek bir çalışmada kafeik asit, rozmarinik asit ve luteolin belirlenmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır (Gökbulut ve ark., 2010). *M. spicata* ssp. *tomentosa* ile ilgili daha önce yapılan bir fenolik içerik analizine rastlanmamıştır.

Mentha türlerinin fenolik bileşikleri ile ilgili en kapsamlı çalışma Yamamura ve arkadaşlarının yaptığı araştırmadır. Bu çalışmada *M. spicata* var. *crispa'*ya ait 13 madde tanımlanmıştır (Yamamura ve ark., 1998). Bu maddelerden ikarisit B_5, 5,6,4'-trihidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavon (timonin) ve 5,3',4'-trihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon (sideritiflavon)'a yaptığımız analizler sonucu bu çalışmada kullanılan *Mentha spicata* alt türlerinde de rastlanmıştır. Shen ve arkadaşları tarafından *Mentha* türlerinde rozmarinik asit, ursolik asit ve oleanolik asit miktar tayini yapılmıştır (Shen ve ark., 2011). Zaidi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Mentha spicata*'ya ait 2 aglikon (diosmetin ve 5,6,4'-trihidroksi-7,3'dimetoksi flavon) rapor etmişlerdir. Bu maddelerden diosmetine bu çalışmada da rastlanmıştır (Zaidi ve ark., 1998). Voirin ve arkadaşları apigenin asesatin, timonin, sideritiflavon ve luteolini tanımlamışlardır ki bu tez kapsamında yapılan analizlerde de bu altı bileşik tanımlanabilen maddeler olmuştur (Bernard Voirin ve ark., 1999).

Zheng ve arkadaşları *Mentha spicata* ile yaptıkları çalışmalarda 2 lignan ve 2 monoterpenoit glikozit tespit etmişlerdir. Bu maddelerden monoterpenoit glikozit olarak tanımlanan spikatosit B bu çalışmada da tespit edilmiştir (Zheng ve ark., 2003; Zheng ve ark., 2007).

Bu tez kapsamında yapılan çalışma, *Mentha spicata* alt türleri ile ilgili şimdiye kadar yapılmış en ayrıntılı fenolik madde analizi araştırması olmuştur. Toplam 80 bileşiğik tanımlanmış ve kütle spektroskopisi sonuçları kullanılarak yapıları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu bileşiklerden 77 adedi fenolik yapıda biri oligosakkarit ikisi ise megastigman glikozittir. Fenolik bileşiklerden 25 tanesi *Mentha spicata* alttürlerinde, 18 tanesi ise *Mentha* cinsinde ilk defa tespit edilmiştir.

Mentha cinsi için yeni olan maddeler: sagerinik asit, ikarisit B_5 glukopiranozit, apigenin asetilglukozit, luteolin asetilglukozit, salvianolik asit F, salvianolik asit C, salvianolik asit A feruloilkinik asit, ponsirin metil litospermat, dimetil litospermat, metil danşensu, 4-kafeoilkinik asit (kriptoklorojenik asit), 3-

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

kafeoilkinik asit (neoklorojenik asit), 3-kumaroil kinik asit, 4-kumaroilkinik asit, kafeoil glukoz, dimetil rozmarinat.

Diğer *Mentha* türlerinde rastlanmasına karşın daha önce *M. spicata* da rastlanılmayan maddeler: salvianolik asit E, protokateşik asit hekzozit, 12 hidroksi jasmonat sülfat, danşensu dimer. Danşensu dimer'e daha önce *M. piperita*'da rastlanmıştır (Kapp ve ark. 2013).

Metil rozmarinat daha önce *M. canadensis*'te (Li ve ark., 2013), genkvanin *M. pulegium* ve *M. suaveolens*'te bulunmuştur (Zaidi ve ark., 1998). Apigenin 6,8-di-C glukozit (visenin-2)'e daha önce *M. longifolia*'da rastlanmıştır (Sharaf ve ark., 1999).

Hidroksisinnamik asit türevleri

Her iki alttürde hidroksisinnamik asit türevlerinden toplam 10 tane bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşikler: 3-kafeoilkinik asit, 4-kafeoilkinik asit, 5-kafeoilkinik asit, feruloilkinik asit, 3-*p*-kumaroilkinik asit, 4-*p*-kumaroilkinik asit, kafeik asit, etil kafeat, kafeoil glukoz ve kafeik asit sülfat tuzu olarak sıralanabilir. 3-p kumaroilkinik asit'e sadece *M. spicata* ssp. *tomentosa*'da rastlanılmışken, feruloilkinik asite ise sadece *M. spicata* ssp. *spicata* da rastlanmıştır. Bu maddeler daha çok % 70 metanol ekstrelerinde ve bu ekstrenin fraksiyonlanması sonrası arta kalan sulu kısımda gözlenmiştir ve bu durum maddelerin bitki içinde bulunan diğer maddelerden daha polar olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır. Bu durum ters faz kolonda bu maddelerin tutunma zamanlarının ekstre de bulunan diğer maddelerin tutunma zamanlarından önce olması ile de doğruluk kazanmıştır.

Yapılan kaynak taramaları bu maddelerden 4-kafeoilkinik asit (kriptoklorojenik asit) (He ve ark., 2010), 3-kafeoilkinik asit (neoklorojenik asit), 3-kumaroil kinik asit, 4-kumaroilkinik asit ve feruloilkinik asit *Mentha* cinsi için ilk kez teşhis edilmiştir. 5-kafeoilkinik asit (klorojenik asit) ise *Mentha* cinsinde daha önce rastlanmıştır (Dorman ve ark., 2003). Kafeik asite ise her iki alttürün bütün ekstrelerinde rastlanmıştır.

Flavonoit glikozitleri

Her iki alt türde 13 farklı flavon glikoziti belirlenebilmiştir. Bunlardan sadece biri karbon glikoziti, diğerleri oksijen glikozitidir. Eriodiktiyol-7-O glukozit, eriodiktiyol-7-O rutinozit (eriositrin), naringenin-7-rutinozit (narirutin), luteolin-7- glukozit, luteolin rutinozit, hesperetin 7- rutinozit (hesperidin), hesperetin glukozit, apigenin rutinozit, apigenin glukozit, izosakuranetin-7 neohesperosit, diosmetin rutinozit (Diosmin) bu grupta rastlanılan oksijen glikozitleridir.

8-C-dihekzozil apigenin (visenin-2) bitkide rastlanan tek karbon glukozit olmuştur ve sadece *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* da rastlanmıştır. Flavonoit glikozitlerine hekzan ekstreleri hariç bütün ekstrelerde rastlanmıştır. Diosmin'e daha önceden *Mentha spicata*'da rastlanmıştır (Justesen, 2000).

Flavonoit asetilglukozitleri

Bu grupta luteolin asetilglukozit ve apigenin asetilglukozit olmak üzere 2 maddeye rastlanmıştır. Bu maddelerden luteolin asetilglukozit sadece *M. spicata* ssp. *spicata'*da rastlanılmışken apigenin asetilglukozite her iki alt tür de de rastlanmıştır. Bu maddelere bitkilerin asit hidroliz ekstrelerinde rastlanmış olması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

bitkide doğal olarak bulunmadıklarını bir başka maddenin hidrolizi sırasında açığa çıktıkları düşünülmektedir.

Flavonoit glukronitleri

Bu grupta luteolin glukronit ve apigenin glukronit olmak üzere 2 bileşiğe rastlanmıştır. Luteolin glukronit'e her iki alttürde rastlanırken apigenin glukronit'e sadece *M. spicata* ssp. *tomentosa*'nın % 5'lik infüzyonununda rastlanmıştır.

Flavonoit aglikonları

Flavanoit aglikonlarından şu 11 bileşiğe rastlanmıştır: Apigenin, luteolin, hesperetin, izosakuranetin, genkvanin, asetatin, timonin, sideritiflavon, naringenin, diosmetin ve eriodiktiyol. Bu maddelerden hesperetin hariç diğerlerine her iki alttürde de rastlanırken, hesperetin'e sadece *M. spicata* ssp. *spicata'*da rastlanmıştır.

Salvianolik asit türevleri

Danşensu dimer, metil danşensu, dimetil danşensu, salvianolik asit E, metil litospermat, dimetil litospermat, dimetil litospermat B, izosalvianolik asit A, salvianolik asit A, salvianolik asit C, salvianolik asit B, salvianolik asit F olmak üzere toplam 12 adet salvianolik asit türevine rastlanmıştır. Bu maddelerden dimetil litospermat'a sadece *M. spicata* ssp. *tomentosa*'da rastlanmıştır. Diğer salvianolik asit türevlerine her iki alttürde de rastlanmıştır.

Rozmarinik asit türevleri

Rozmarinik asit, rozmarinik asit dimer (sagerinik asit), rozmarinik asit sülfat tuzu, metil rozmarinat ve dimetil rozmarinat olmak üzere 5 farklı rozmarinik asit türevi tanımlanmıştır.

Metoksiflavonlar

Her iki alttürde de 5,6,4'-trihidroksi-7,8,3'-trimetoksiflavon (timonin) ve 5,3',4'-trihidroksi-6,7,8- trimetoksiflavon (sideritiflavon) tanımlanmıştır. Bu maddelere *M. spicata*'da daha önce de rastlanmıştır (Voirin ve ark., 1999).

Fenolik olmayan diğerleri

İkarisit B_5, ikarisit B_5 glikopiranozid analizlerde rastlanan megastigman glikozitler ve stakioz ise analizlerde belirlenen oligasakkarit olmuştur..

Antioksidan aktiviteleri üzerine değerlendirmeler

Ekstrelerin demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasitesi hidrojen verme kapasiteleri olarak değerlendirilir (Yıldırım ve ark., 2000). İndirgeme kapasitesi radikal zincir reaksiyonlarının başlangıç safhasında oldukça önemlidir (Yıldırım ve ark., 2000). Kaynaklarda, sulu ekstrelerin demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme kapasiteleri ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek korelasyon bulunmasına (Dorman ve ark., 2003, 2004, Koşar ve ark 2005) rağmen, bunun her zaman doğru olmadığı kayıtlıdır (Yıldırım ve ark., 2000). Ekstrelerin demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme gücü test edilmiştir. Sonuçlar askorbik asite eşdeğer olarak hesaplanmış (AscAE) ve bu değerler kullanılmıştır. AscAE değeri büyüdükçe aktivite de artmaktadır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Mentha ekstreleri ile yapılan deneyler sonucunda hiçbir ekstre pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit, BHT ve gallik asit kadar aktif bulunmamıştır. *Mentha spicata* ssp. *spicata* ekstrelerinde % 70 metanol ektresinin demir (III)'ü demir (II)'ye indirgeme gücü 1,25 mmol/g AscAE değerle en yüksek etkiye sahip olarak bulunmuştur. Diğer etkili ekstre asit hidrolizi ekstresi 1 mmol/g AscAE değerle en yüksek etkiye sahip 2. ekstre olarak bulunmuştur. *M. spicata* ssp. *tomentosa* da ise en yüksek etkiye sahip ekstre 1,28 mmol/g AscAE değerle asit hidrolizi ekstresi olurken 1,14 mmol/g AscAE değerle %70 MeOH ekstresi en etkili olarak buluunana 2. ekstre olmuştur. Bu etki ile toplam fenol miktarları arasında doğrudan bir ilişki görülmüştür 2 deney sisteminin korelasyon katsayısı *M. spicata* ssp. *spicata* ekstreleri için r^2=0,64, *M. spicata* ssp. *tomentosa* için ise r^2=0,74 olarak bulunmuştur. Fenolik asitler ve flavonoitler doğal antioksidanlar olarak bilinirler. Fenolik asitler, özellikle hidroksisinnamatlar, antioksidan aktivitelerini hidrojen vererek gösterirler (Rice-Evans ve ark 1996, Gu ve Weng 2001). Hidroksisinnamatlar sınıfında yer alan rozmarinik asit ve türevleri, çok güçlü DPPH$^\bullet$ radikal süpürücü bileşikler olarak bilinirler (Lu ve Foo 2002). Fenolik asitler ve flavonoitler doğal antioksidanlar olarak bilinirler. Hidroksisinnamatlar sınıfında yer alan rozmarinik asit ve türevleri, çok güçlü DPPH$^\bullet$ radikal süpürücü bileşikler olarak bilinirler (Lu ve Foo., 2002). Bu tez kapsamında incelenen ekstrelerin bir kısmında rozmarinik asit bir kısmında ise flavonoitler ana bileşenler olarak görülmektedir. Fenolik asitler ve flavonoitler polar çözücülerde çözünürler ve polar sistemlerde güçlü aktivite gösterirler. Demir (III)'ü indirgeme reaksiyonu ve DPPH$^\bullet$ radikal süpürücü etki testleri polar ortamlarda yapılmaktadır. Bu nedenle de bu bileşiklerce zengin fraksiyonlar bu deney sistemlerinde etkili olarak bulunmuşlardır. Her 2 bitkide rozmarinik asit en yüksek olarak % 70 metanol ekstresinde bulunmuştur ve bu ekstrede bu deney sisteminde en etkili 2 ekstreden birisi olmuştur. Rozmarinik asit miktarının artışı ile indirgeme gücünü arttırdığı görülmüştür. Bu durum asit hidroliz ekstrelerinde geçerliliğini yitirmiş ve rozmarinik asit miktarı asit hidrolizi ekstrelerinden daha fazla olana ekstreler olmasına rağmen etki 2. en yüksek olarak asit hidrolizi ekstresinde görülmüştür. Bu ekstrelerin YBSK/KS analizlerinde çokça salvianolik asit türevlerine rastlanmıştır bu durum salvianolik asit türevlerinin de bu deney sisteminde oldukça etkili olduğunu ve en az rozmarinik asit kadar önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür. Asit hidroliz ekstrelerinin bu kadar etkili çıkmasının bir sebebi de aglikonların antioksidan olarak daha etkili oluşu olmalıdır, glikozit formları ve büyük moleküllü kompleks yapılarda antioksidan etkinin azaldığı düşünülmektedir.

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH$^\bullet$) radikali, 517 nm'de maksimum absorbans veren stabil bir radikaldir. Antioksidan özellikli maddeler tarafından elektron ve hidrojen atom transferi ile DPPH$^\bullet$ radikalinin hidrazin türevlerine indirgendiğinde absorbans düşer (Bachmayer, 2004).

Ekstrelerin azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH$^\bullet$ radikalini süpürme kapasiteleri incelenmiş ve sonuçlar IC_{50} değerleri olarak (mg/mL) verilmiştir. IC_{50} değeri küçüldükçe aktivite artmaktadır. Her iki bitkiden de elde edilen hekzan ekstreleri çözünürlük problemi nedeniyle bu polar deney sisteminde test edilememiştir. Her iki alttürde de indirgeme gücünde olduğu gibi asit hidrolizi ve % 70 metanol ekstreleri ve % 70 metanol ekstraksiyonunun fraksiyonlanması

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

sonrası arta kalan sulu kısımlarda yüksek etki görülmüştür. Asit hidroliz ekstreleri her iki alt türde de standartlarla eşit miktarda etkili olarak bulunmuştur. Bu deney sisteminde iki alttürün sulu ekstreleri arasında farklılık gözlenmiş, *M. spicata* ssp. *tomentosa* infüzyonun *M. spicata* ssp. *spicata* infüzyonundan yaklaşık 4 kat daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar göre bu ekstrelerin YBSK kromatogramları ve kütle spektrumları arasındaki farklılıklar incelenmiş ve *M. spicata* ssp. *tomentosa* infüzyonu relatif olarak % 7 12-hidroksi jasmonat sülfat içerirken bu oranın *M. spicata* ssp *spicata* relatif olarak % 1,6 olduğu görülmüştür. 12-Hidroksi jasmonat sülfat oranı da 2 bitkinin ekstreleri arasında yaklaşık 4 olarak bulunmuştur. Bu durum 12-hidroksi jasmonat sülfatın da güçlü bir antioksidan molekül olduğu sonucunu ortaya çıkartmaktadır ve YBSK sonrası $ABTS^{\bullet+}$ türevlendirme çalışmalarında bu maddenin antioksidan aktivitesi olduğu görülmüştür. Genel olarak $DPPH^{\bullet}$ radikal süpürücü etki, toplam fenol miktarı ve rozmarinik asit miktarı arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur. Bu durum yukarıda bahsedilen infüzyon ekstresinde sekteye uğramıştır. Zira *M. spicata* ssp. *spicata*'da rozmarinik asit miktarı yaklaşık 1,3 kat daha yüksek bulunurken $DPPH^{\bullet}$ radikal süpürücü etki bakımından 4 kat zayıf bulunmuştur. Ekstrelerin kolon sonrası türevlendirme antioksidan aktivite çalışmalarında rozmarinik asit her zaman en etkili olarak bulunmuştur. Salvianolik asit türevleri ve diğer hidrokssisinnamik asit türevleri de kolon sonrası türevlendirme deneyinde etkili olarak bulunmuştur. Hal böyle iken *M. spicata* ssp. *tomentosa* infüzyonunda ekstrenin bütünü üzerinden bir $DPPH^{\bullet}$ süpürme gücü ele alındığında kısmen sinerjik etkileşimler olabileceği görülmüştür.

Yağların oksidasyonu gıdalardaki oksidatif bozulmanın ve insan vücudundaki hücresel organellerin fizyolojik fonksiyonlarının kaybının en önemli nedenidir (Yamamoto ve Niki 1991). Potansiyel antioksidanlar olarak besin maddelerinin ve membran fosfolipitlerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi için en kullanışlı model sistemleri fosfolipitlerdir. Bu amaçla sentetik antioksidanlar serbest radikalleri uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Hidroksil radikali başta olmak üzere, fizyolojik olarak benzer reaktif oksijen türleri *in vivo* zincir reaksiyonlarında bozulmayı başlatır ve pek çok hastalığın oluşumunda rol oynar (Chatterjee ve Agarwal 1988).

Ekstrelerin linoleik asit peroksidasyonunu engelleme kapasiteleri hızlandırılmış oksidasyon uygulanarak denenmiş ve oluşan peroksitler $FeCl_2$ ve amonyum tiyosiyanat reaktifleri ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ayrıca linoleik asitin oksidasyonu sırasında oluşan malondialdehit (MDA) miktarı da tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile ölçülmüştür. Genel olarak sonuçlar incelendiğinde Toplam fenolik madde ve linoleik asit peroksidasyonunu inhibe edici etki arasında bir ilişki görülmemiştir Fenolik madde oranı en düşük olan hekzan ekstresi güçlü inhibisyon gösterirken toplam fenol miktarı hekzana göre çok daha yüksek bulunan % 70 metanol ekstresi düşük etkili bulunmuştur. Genel olarak bakıldığında linoleik asitin oksidasyonu sırasında oluşan peroksitlerin ve MDA'in miktarlarının birbirine paralel olduğu gözlenmiştir.

Benzer sonuçlar beta karoten linoleik asit deneyi için de elde edilmiştir Her iki bitkiden de elde edilen ekstrelerin tümü belli oranda β-karoten-linoleik asit oksidasyonunu engellemişlerdir. Fakat hiçbir ekstre pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve gallik asit kadar etkili bulunmamıştır.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Antioksidan aktivite sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde: Her iki alt türün de radikal spürücü gücünün standartlara yakın düzeyde olduğu görülmüştür. Linoleik asit peroksidasyonunu engellemede ise her iki alt türün standart kadar etkili olmadığı belirlenmiştir. Çizelge 13'de her bir alttür için en yüksek antioksidan etkiyi gösteren ekstrelerin standart ile karşılaştırılması verilmiştir. Her iki alttürde genellikle asit hidroliz sonrası elde edilen ekstrelerde indirgeme gücü, DPPH$^{\bullet}$süpürme gücü ve Trolaksa Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAK) standartlara yakın bulunmuştur.

Çizelge 13.En yüksek antioksidan etki gösteren ekstrelerin standart ile karşılaştırılması.

Deney	**En-etkili ekstre**		**Değer**		**Standart**
Alt tür	**S**	**T**	**S**	**T**	**BHT**
İndirgeme gücü (AscAE)	E3	E5	1,25 mmol/g	1 mmol/g	1,28
DPPH$^{\bullet}$süpürme gücü	E5	E5	0,01	0,01	0,01
TEAK	E5	E5	1,30mM	1,30 mM	1,75 mM
MDA	E2 ve E5	E5 ve E1	%66 ve %63	%62 ve %57	%89
B-Karoten	E2 E5 E11	E2, E4 E5	Yaklaşık %60	Yaklaşık %55	%90

S: *Mentha spicata* ssp. *spicata* , T: *Mentha spicata* ssp. *tomentosa* (E1) hekzan; (E2) etilasetat; (E3) % 70 metanol; (E4) sulu ekstre; (E5) asit hidrolizi; (E7) %70 metanol diklorometan fraksiyonu; (E8) %70 metanol fraksiyonu sonrası sulu kısım; (E10) sulu ekstre diklorometan fraksiyonu; (E11) sulu ekstre fraksiyon sonrası sulu faza ait ekstreler

Bileşim analiz sonuçları değerlendirildiğinde YBSK-KS/KS sonuçlarına göre belirgin bir ayrım görülmemiştir. Tanımlanan bileşiklerden hesperetin, feruloilkinik asit ve luteolin asetilglukozit sadece *M. spicata* ssp. *spicata* da rastlanmışken 3-p-kumaroilkinik asit, visenin-2, dimetil litospermat ve apigenin glukuronit'e ise *M. spicata* ssp. *tomentosa* da rastlanmıştır. Fakat bu moleküllerin ekstre içindeki miktarları iki tür arasında kimyasal olarak bir ayrım yapmaya yeterli düzeyde olmamıştır. Bu iki alt tür arasında kimyasal bileşikleri açısından ayrım ancak hekzan ekstreleri üzerinden yapılan GK-KS analizi sonuçlarına göre yapılabilir. Bu analiz sonuçlarında *M. spicata* ssp. *spicata* hekzan ekstresinin ana bileşiği karvon (% 61) iken, *M. spicata* ssp. *tomentosa* hekzan ekstresinin ana bileşikleri *trans*-piperiton oksit (% 40.5) ve piperiton oksit (% 21.8) olarak bulunmuştur. Bu durum bu iki alt tür ile yapılan uçucu yağ çalışmalarında da benzerlik göstermiştir. Morfolojik olarak Türkiye florasında iki alt tür olarak tanımlanmış olan bu örneklerin hekzan ekstrelerinde bulunan uçucu bileşikleri bakımından da distilasyonla elde edilen uçucu yağlarında olduğu gib farklı olduğu görülmüştür (Başer ve ark., 2012, Chauhan ve ark., 2011, Karousou ve ark., 1998).

Çalışılan türler için antioksidan aktivite bakımından en etkili fraksiyon asit hidrolizi ile elde edilmiş ekstreler olarak tespit edilmiştir. Bu ekstreler aglikon fenolik bileşikler bakımından zengindir. Bu hidroliz ekstrelerinde YBSK-KS/KS incelemeleri sonucunda salvianolik asit türevleri ana bileşenler olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle bu ekstrelerin antioksidan aktivitelerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğu düşünülmüştür. Salvianolik asit türevlerinin yapılarında bulunan hidroksillerden dolayı elektron verici özellikleri oldukça yüksektir. Bu nedenle antioksian özellik kazanmaktadırlar. Etkiyi de bu bileşiklerin yapılarında bulunan

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

fenolik hidroksillerin oluşturduğu düşünülmektedir. Yukarıda belirtildiği üzere pekçek salvianolik asit türevleri gerek Mentha cinsi için gerekse çalışılan her iki tür için ilk olarak tespit edilmiştir.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

KAYNAKLAR

Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. ve Arsenakis, M., Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46* (5), 1739-1745, 1998.

Aflatuni, A., Ek, J. U. S. ve Hohtola, A., Optimum harvesting time of four *Mentha* species in northern Finland. *Journal of Essential Oil Research, 18*(2), 134-138, 2006.

Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Ahmad, A., Kumar, T. R. S., Gupta, V. K. ve Kumar, S., Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal, 17* (1), 59-63, 2002.

Akdoğan, M., Kılınç, L., Öncü, M., Karaöz, E. ve Delibaş, N., Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. *Human & Experimental Toxicology, 22* (4), 213-219, 2003.

Akdoğan, M., Özgüner, M., Aydın, G. ve Gökalp, O., Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* Labiatae and *Mentha spicata* Labiatae on liver tissue in rats. *Human & Experimental Toxicology, 23* (1), 21-28, 2004a.

Akdogan, M., Gultekin, F., ve Yontem, M., Effect of *Mentha piperita* (Labiatae) and *Mentha spicata* (Labiatae) on iron absorption in rats. *Toxicology and Industrial Health, 20* (6-10), 119-122, 2004b.

Akdoğan, M., Tamer, M. N., Cüre, E., Cüre, M. C., Köroğlu, B. K. ve Delibaş, N., Effect of spearmint (*Mentha spicata* Labiatae) teas on androgen levels in women with hirsutism. *Phytotherapy Research, 21* (5), 444-447, 2007.

Albayrak, S., Aksoy, A., Albayrak, S. ve Sağdıç, O., In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science & Technology, 1*, 1-9, 2013.

Ansari, K. ve Goodarznia, I., Optimization of supercritical carbon dioksit extraction of essential oil from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves by using Taguchi methodology. *The Journal of Supercritical Fluids, 67*(0), 123-130, 2012.

Arslan, D., Özcan, M. M. ve Mengeş, H. O., Evaluation of drying methods with respect to drying parameters, some nutritional and colour characteristics of peppermint (*Mentha* x *piperita* L.). *Energy Conversion and Management, 51*(12), 2769-2775, 2010.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Arumugam, P., Ramamurthy, P., Santhiya, S. T. ve Ramesh, A., Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn.: An analysis by ABTS($^{\bullet+}$) decolorization assay. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 15* (1), 119-124, 2006.

Arumugam, P. ve Ramesh, A., Antigenotoxic and antioxidant potential of aqueous fraction of ethanol extract of *Mentha spicata* (L.) against 4-nitroquinoline-1-oxide-induced chromosome damage in mice. *Drug and Chemical Toxicology, 32* (4), 411-416, 2009a.

Arumugam, P. ve Ramesh, A., Protective effects of solvent fractions of *Mentha spicata* (L.) leaves evaluated on 4-nitroquinoline-1-oxide induced chromosome damage and apoptosis in mouse bone marrow cells. *Genetics and Molecular Biology, 32* (4), 847-852, 2009b.

Arzani, A., Zeinali, H., ve Razmjo, K., Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha* spp.). *Plant Physiology and Biochemistry, 45* (5), 323-329, 2007.

Avcı, G., Küpeli, E., Eryavuz, A., Yeşilada, E. ve Küçükkurt, I., Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology, 107*(3), 418-423, 2006.

Ayar-Kayalı, H., Ürek, R. O., Nakiboğlu, M. ve Tarhan, L., Antioxidant Activities of Endemic *Sideritis leptoclada* and *Mentha dumetorum* Aqueous Extracts Used in Turkey Folk Medicine. *Journal of Food Processing and Preservation, 33*(3), 285-295, 2009.

Babaç, M. T., Possibility of an information system on plants of South-West Asia with particular reference to the Turkish Plants Data Service (TÜBİVES). *Turkish Journal of Botany* (28), 119-127, 2004.

Bachmayer, O. (2004). *Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs.* Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Banthorpe, D. V. ve Brown, G. D., Growth and secondary metabolism in cell cultures of *Tanacetum, Mentha* and *Anethum* species in buffered media. *Plant Science*, *67*(1), 107-113, 1990.

Barros, L., Duenas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C. ve Ferreira, I., Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. *Food Chemistry, 136*(1), 1-8, 2013.

Barton, P., Hughes Jr, R. E. ve Hussein, M. M., Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. *The Journal of Supercritical Fluids, 5*(3), 157-162, 1992.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Başer, K.H.C., Honda, G. ve Miki, W., (1986) *Herb Drugs and Herbalists in Turkey*, Institute for the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Studia Culturae Islamicae 27,Tokyo.

Başer, K.H.C., Nuriddinov, Kh.R., Nigmatullaev A.M. ve Aripov, Kh.N., The Essential Oil of *Mentha asiatica* Boriss. from Uzbekistan, *Journal of essential oil research*, (9), 453-454 1997.

Başer, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., Tarımcılar, G. ve Kaynak, G,. Essential oils of *Mentha* species from Northern Turkey. *Journal of Essential Oil Research, 11*(5), 579-588, 1999.

Başer, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., Demirci, B., Özek, T. ve Tarimcilar, G., Chemotypic variations of the essential oils of *Mentha* taxa collected in the Marmara region of Turkey. *Planta Medica, 74*(9), 921-921, 2008.

Başer, K. H. C., Kürkçüoğlu, M., Demirci, B., Özek, T. ve Tarımcılar, G., Essential oils of *Mentha* species from Marmara region of Turkey. *Journal of Essential Oil Research, 24*(3), 265-272, 2012.

Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A., Cunha, I. B., Carvalho, P. O. ve Eberlin, M. N., Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules, 12*(3), 423-432, 2007.

Baytop, T. (1984). *Türkiyede Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün)*: İstanbul Üniversitesi.

Bekiaroglou, P. ve Karataglis, S., The effect of lead and zinc on Mentha spicata. *Journal of Agronomy and Crop Science, 188*(3), 201-205, 2002.

Bertea, C., Schalk, M., Mau, C. J. D., Karp, F., Wildung, M. R. ve Croteau, R., Molecular evaluation of a spearmint mutant altered in the expression of limonene hydroxylases that direct essential oil monoterpene biosynthesis. *Phytochemistry, 64*(7), 1203-1211, 2003.

Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J., Hamid, A. ve Zaidul, I. S. M., Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioproducts Processing, 89*(1), 67-72, 2011.

Bonamonte, D., Mundo, L., Daddabbo, M. ve Foti, C., Allergic contact dermatitis from *Mentha spicata* (spearmint). *Contact Dermatitis, 45*(5), 298-298, 2001.

BP. (2009). *British pharmacopoeia: M*edicines and Healthcare products agency

Cadenas, E. ve Davies, K. J. A., Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine, 29*(3-4), 222-230, 2000.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Cádiz-Gurrea, M. d. l. L., Fernández-Arroyo, S., Joven, J. ve Segura-Carretero, A., Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii* extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research International, 50*(1), 197-204, 2013.

Candan, N. ve Tarhan, L., The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mentha pulegium* organs grown in Ca2+, Mg2+, Cu2+, Zn2+ and Mn2+ stress conditions. *Plant Science, 165*(4), 769-776, 2003.

Candan, N. ve Tarhan, L., Influence of Manganese Deficiency on Metal Ion Uptake, Antioxidant Defense Mechanism and Lipid Peroxidation Levels in *Mentha piperita* Leaves. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 53*(1), 20-25, 2011.

Candan, N. ve Tarhan, L., Tolerance or sensitivity responses of Mentha pulegium to osmotic and waterlogging stress in terms of antioxidant defense systems and membrane lipid peroxidation. *Environmental and Experimental Botany, 75*(0), 83-88, 2012.

Celli, N., Dragani, L. K., Murzilli, S., Pagliani, T. ve Poggi, A., In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis. [Comparative Study]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 55*(9), 3398-3407, 2007.

Chauhan, S. S., Prakash, O., Padalia, R. C., Vivekanand, Pant, A. K., ve Mathela, C. S., Chemical Diversity in *Mentha spicata*: Antioxidant and Potato Sprout Inhibition Activity of its Essential Oils. *Natural Product Communications, 6*(9), 1373-1378, 2011.

Chen, G. T., Gao, H. Y., Zheng, J., Wu, B., Yang, X. K. ve Wu, L. J., [Study of chemical constituents in active parts of *Mentha spicata* III]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 31*(7), 560-562, 2006.

Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yang, J. ve Wang, Q., Qualitative Analysis and Simultaneous Quantification of Phenolic Compounds in the Aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSn. *Phytochemical Analysis, 22*(3), 247-257, 2011.

Clifford, M. N., Johnston, K. L., Knight, S. ve Kuhnert, N., Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(10), 2900-2911, 2003.

Clifford, M. N., Knight, S. ve Kuhnert, N., Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS n. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(10), 3821-3832, 2005.

Cook, C. M., Kokkini, S. ve Lanaras, T., *Mentha spicata* essential oils rich in 1,8-cineole and 1,2-epoxy-P-menthane derivatives from Zakynthos (Ionian Island, W Greece). *Journal of Essential Oil Research, 19*(3), 225-230, 2007.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Croteau, R., Alonso, W. R., Koepp, A. E., Shim, J. H., ve Cane, D. E., Irreversible Inactivation of Monoterpene Cyclases by a Mechanism-Based Inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 307*(2), 397-404, 1993.

Cuyckens, F. ve Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoits. *Journal of Mass Spectrometry, 39*(1), 1-15, 2004.

DAB, *Deutsches Arzneiburch*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgard, Germany, 1999

Davies, M. J., The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics, 1703*(2), 93-109, 2005.

Davis, P. H. (1982). *Lamiaceae. in Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 7): Edinburgh University Press.

de Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C. ve Brinkman, U. A. T., Analytical separation and detection methods for flavonoits. *Journal of Chromatography A, 1112*(1–2), 31-63, 2006.

Deans, S. G. (2007). Antimicrobial Activity of Essential Oils and Constituents of *Mentha* Species. In B. M. Lawrence (Ed.), *Mint: the genus Mentha* (pp. 74). New York: CRC Press.

Delfine, S., Loreto, F., Pinelli, P., Tognetti, R., ve Alvino, A., Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. *Agriculture, Ecosystems & Environment, 106*(2–3), 243-252, 2005.

Diaz-Maroto, M. C., Perez-Coello, M. S., Gonzalez Vinas, M. A., ve Cabezudo, M. D., Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,51*(5), 1265-1269, 2003.

Diemer, F., Caissard, J. C., Moja, S. ve Jullien, F., Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Mentha spicata and Mentha arvensis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture, 57*(1), 75-78, 1999.

Duband, F., Carnat, A., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., Clair, G. ve Lamaison, J., (1992). *Aromatic and polyphenolic composition of infused peppermint, Mentha x piperita L]*.

Denisov, E. T., Denisov, E., Afanas' ev, I. B. ve Afanas′ev, I. B., (2005). *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*: CRC.

Deveci, M., An investigation on plant species diversity in Colchic Province (Turkey). *African Journal of Agricultural Research, 7*(5), 820-843, 2012.

Dorman, H. J. D., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y. ve Hiltunen, R., Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(16), 4563-4569, 2003.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Dualı, G., (2010). *Bazı Türk Nane (Mentha L.) Uçucu Yağlarının Biyolojik Aktiviteleri.* Yüksek Lisans Tezi Anadolu Universitesi, Eskişehir.

Duband, F., Carnat, A. P., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C., Clair, G. ve Lamaison, J. L., The aromatic and polyphenolic composition of peppermint (*Mentha X piperita* L.) tea. *Annales Pharmaceutiques Francaises, 50*(3), 146-155, 1992.

Duke, J. A. (2002). *Handbook of medicinal herbs*: CRC press. pp 689-690

Egawa, T., Kachi, Y., Takeshima, T., Takeuchi, H. ve Konaka, S., Structural determination of carvone, a component of spearmint, by means of gas electron diffraction augmented by theoretical calculations. *Journal of Molecular Structure, 658*(3), 241-251, 2003.

El Hassani, F. Z., Zinedine, A., Amraoui, M. B., Errachidi, F., Alaoui, S. M., Aissam, H., Merzouki, M. ve Benlemlih, M., Characterization of the harmful effect of olive mill wastewater on spearmint. *Journal of Hazardous Materials, 170*(2–3), 779-785, 2009.

El-Keltawi, N. E. ve Croteau, R., Salinity depression of growth and essential oil formation in spearmint and marjoram and its reversal by foliar applied cytokinin. *Phytochemistry, 26*(5), 1333-1334, 1987.

Elmastaş, M., Gucin, I., Öztürk, L. ve Gökçe, I., Investigation of antioxidant properties of spearmint (Mentha spicata L.). *Asian Journal of Chemistry, 17*(1), 137-148, 2005

Elmastaş, M., Dermirtaş, I., Işıldak, O. ve Aboul-Enein, H. Y., Antioxidant Activity of S-Carvone Isolated from Spearmint (*Mentha spicata* L. Fam Lamiaceae). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 29*(10), 1465-1475, 2006.

Erb, M. ve Glauser, G., Family business: multiple members of major phytohormone classes orchestrate plant stress responses. *Chemistry-a European Journal, 16*(34), 10280-10289, 2010.

Erdik, E. (1993). *Organik kimyada spektroskopik yöntemler*: Gazi Kitabevi.

Ersoy, H. (2009). *EDTU Herbaryumu'nda Bulunan Lamiaceae (Ballibabagiller) Familyası'nın Revizyonu.* Doktora, Trakya Üniversitesi

EP7.0 (2012). *European Pharmacopeia*: Council of Europe.

Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E. ve Quetin-Leclercq, J., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 12*(6), 707-715, 2001.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Fang, N., Yu, S. ve Prior, R. L., LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(12), 3579-3585, 2002.

Fang, Y. Z., Yang, S. ve Wu, G., Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, *18*(10), 872-879, 2002.

Ferreres, F., Llorach, R. ve Gil-Izquierdo, A., Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoits and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, *39*(3), 312-321, 2004.

Ferreres, F., Vinholes, J., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Gonçalves, R. F. ve Andrade, P. B., In vitro studies of α-glucosidase inhibitors and antiradical constituents of *Glandora diffusa* (Lag.) D.C. Thomas infusion. *Food Chemistry*, *136*(3–4), 1390-1398, 2013.

Fiamegos, Y. C., Nanos, C. G., Vervoort, J., ve Stalikas, C. D., Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography A*, *1041*(1–2), 11-18, 2004.

Fletcher, R. S., Slimmon, T., McAuley, C. Y., ve Kott, L. S., Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(14), 2429-2436, 2005.

Fu, S., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menendez, J. A., Menendez-Gutierrez, M. P., Micol, V. ve Fernandez-Gutierrez, A., Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. Analytical and Bioanalytical Chemistry, *397*(2), 643-654, 2010.

Fuchs, S., Beck, T. ve Mosandl, A., Different stereoselectivity in the reduction of pulegone by *Mentha* species. *Planta Medica*, *67*(3), 260-262, 2001.

Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., ve Takaishi, Y., Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west Black Sea regions. *Economic Botany*, *49*(4), 406-422, 1995.

Gates, P. ve Lopes, N. P., Characterisation of Flavonoit Aglycones by Negative Ion Chip-Based Nanospray Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, *2012*, 2012.

Gattuso, G., Caristi, C., Gargiulli, C., Bellocco, E., Toscano, G. ve Leuzzi, U., Flavonoid glycosides in bergamot juice (*Citrus bergamia* Risso). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(11), 3929-3935, 2006.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Guedon, D. J. ve Pasquier, B. P., Analysis and Distribution of Flavonoid Glycosides and Rosmarinic Acid in 40 *Mentha x piperita* Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*(3), 679-684, 1994.

Gilbert, D. L. ve Colton, C. A., (1999). *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswari, M. ve Yogalakshmi, K., Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitology Research, 110*(5), 2023-2032, 2012.

Gómez-Prieto, M. S., del Castillo, M. L. R., Flores, G., Santa-María, G., ve Blanch, G. P. Application of Chrastil's model to the extraction in SC-CO2 of β-carotene and lutein in *Mentha spicata* L. *The Journal of Supercritical Fluids, 43*(1), 32-36, 2007.

Göger, F. (2006). *Salvıa virgata Jacq. ve Salvia halophila Hedge'nin Antioksidan Etkilerinin ve Bileşimlerinin Belirlenmesi.* Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Anadolu Üniversitesi.

Gökbulut, A. ve Şarer, E., Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* by Rp-Hplc. *Turkish Journal of .Pharmaceutical Sciences.* 7 (3), 249-254, 2010.

Grevsen, K., Frette, X. ve Christensen, L. P., Content and composition of volatile terpenes, flavonoits and phenolic acids in Greek oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*) at different development stages during cultivation in cool temperate climate. *European Journal of Horticultural Science, 74*(5), 193, 2009.

Guan, B. ve Cole, R. B., MALDI Linear-Field Reflectron TOF Post-Source Decay Analysis of Underivatized Oligosaccharides: Determination of Glycosidic Linkages and Anomeric Configurations Using Anion Attachment. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 19*(8), 1119-1131, 2008.

Guedon, D. J. ve Pasquier, B. P., Analysis and Distribution of Flavonoit Glycosides and Rosmarinic Acid in 40 *Mentha x piperita* Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*(3), 679-684, 1994.

Guimaraes, R., Barros, L., Carvalho, A. M., ve Ferreira, I. C., Infusions and decoctions of mixed herbs used in folk medicine: synergism in antioxidant potential. *Phytotherapy Research, 25*(8), 1209-1214, 2011.

Güllüce, M., Şahin, F., Sökmen, M., Özer, H., Daferera, D., Sökmen, A., Polissiou, M., Adıgüzel, A. ve Özkan, H., Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry, 103*(4), 1449-1456, 2007.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Güney, M., Oral, B., Karahanlı, N., Mungan, T. ve Akdoğan, M., The effect of *Mentha spicata* Labiatae on uterine tissue in rats. *Toxicology and Industrial Health, 22*(8), 343-348, 2006.

Hajighasemi, F., Hashemi, V., ve Khoshzaban, F., Cytotoxic effect of *Mentha spicata* aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. *Journal of Medicinal Plants Research, 5*(20), 5142-5147, 2011.

Halliwell, B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology, 141*(2), 312-322, 2006.

Haudenschild, C., Schalk, M., Karp, F. ve Croteau, R., Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 379*(1), 127-136, 2000.

He, W., Liu, X., Xu, H., Gong, Y., Yuan, F. ve Gao, Y., On-line HPLC- ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts. *Food Chemistry, 123*(2), 521-528, 2010.

Hirata, T., Murakami, S., Ogihara, K. ve Suga, T., Volatile monoterpenoid constituents of the plantlets of *Mentha spicata* produced by shoot tip culture. *Phytochemistry, 29*(2), 493-495, 1990.

Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y. ve Tanaka, T., Traditional medicine in Turkey. VI. Folk medicine in west Anatolia: Afyon, Kutahya, Denizli, Mugla, Aydın provinces. *Journal of Ethnopharmacology, 53*(2), 75-87, 1996.

Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. P., Martin-Diana, A. B. ve Barry-Ryan, C., Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(19), 10576-10581, 2010.

Hosseinimehr, S. J., Pourmorad, F., Shahabimajd, N., Shahrbandy, K., ve Hosseinzadeh, R., In vitro antioxidant activity of *Polygonium hyrcanicum, Centaurea depressa, Sambucus ebulus, Mentha spicata* and *Phytolacca americana*. *Pakistan Journal of Biological Science, 10*(4), 637-640, 2007.

Hughes, R. J., Croley, T. R., Metcalfe, C. D. ve March, R. E., A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoits. *International Journal of Mass Spectrometry, 210*, 371-385, 2001.

Hussain, J., Bukhar, N., Bano, N., Hussain, H., Naeem, A. ve Green, I. R., Flavonoids and Terpenoids from *Phlomis cashmeriana* and their Chemotaxonomic significance. *Records of Natural Products, 4*(4), 242-249, 2010.

Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M. ve Gilani, A. H., Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90*(11), 1827-1836, 2010.

Hvattum, E. ve Ekeberg, D., Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoit glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry, 38*(1), 43-49, 2003.

İşcan, G., Kırımer, N., Kürkçüoğlu, M., Başer, K. H. C. ve Demirci, F., Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(14), 3943-3946, 2002.

Justesen, U., Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoits in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography A, 902*(2), 369-379, 2000.

Kanatt, S. R., Chander, R. ve Sharma, A., Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry, 100*(2), 451-458, 2007.

Kapp, K., Hakala, E., Orav, A., Pohjala, L., Vuorela, P., Püssa, T., Vuorela, H. ve Raal, A., Commercial peppermint teas: Antichlamydial effect and polyphenolic composition. *Food Research International (2013)*

Karousou, R., Grammatikopoulos, G., Lanaras, T., Manetas, Y. ve Kokkini, S., Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. *Phytochemistry, 49*(8), 2273-2277, 1998.

Karp, F., Mihaliak, C. A., Harris, J. L., ve Croteau, R., Monoterpene biosynthesis: Specificity of the hydroxylations of (−)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*), and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 276*(1), 219-226, 1990.

Kartal, M., Uçan, U. S., Kan, Y., Aslan, S. ve Atalay, T., Antimicrobial activity and composition of essential oils of *Mentha spicata* cultivated under organic farming conditions in Turkey. *Planta Medica, 74*(9), 1202-1202, 2008.

Karousou, R., Grammatikopoulos, G., Lanaras, T., Manetas, Y. ve Kokkini, S., Effects of enhanced UV-B radiation on Mentha spicata essential oils. *Phytochemistry, 49*(8), 2273-2277, 1998.

Kavrayan, D. ve Aydemir, T., Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*). *Food Chemistry, 74*(2), 147-154, 2001.

Kendir, G. ve Güvenç, A., Etnobotanik ve Türkiye'de Yapılmış Etnobotanik Çalışmalara Genel Bir Bakış. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 30*(1), 49-80, 2010.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Khan, N. I., Tisserat, B., Berhow, M. ve Vaughn, S. F., Influence of autoclaved fungal materials on spearmint (*Mentha spicata* L.) growth, morphogenesis, and secondary metabolism. *Journal of Chemical Ecology, 31*(7), 1579-1593, 2005.

Kıvanç, M. ve Kunduhoğlu, B., Antimicrobial activity of fresh plant juice on the growth of bacteria and yeasts. Journal of Qafqaz University, *1*, 27-31, 1997.

Kim, K. H. ve Hong, J., Equilibrium solubilities of spearmint oil components in supercritical carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria, 164*(1), 107-115, 1999.

Kiran, U., ve Patra, D. D., Influence of natural essential oils and their by-products as nitrification retarders in regulating nitrogen utilization for Japanese mint in sandy loam soils of subtropical central India. *Agriculture, Ecosystems & Environment, 94*(2), 237-245, 2003.

Ko, Y. C., Feng, H. T., Lee, R. J. ve Lee, M. R., The determination of flavonoids in *Wikstroemia indica* C. A. Mey. by liquid chromatography with photo-diode array detection and negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 27*(1), 59-67, 2013.

Kofidis, G., Bosabalidis, A. ve Kokkini, S. Seasonal variation of essential oils in a Linalool-rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research, 16*(5), 469-472, 2004.

Kofidis, G., Kokkini, S. ve Bosabalidis, A. M., Seasonal variations in leaf structure, morphometry and essential oils of two *Mentha spicata* populations grown at altitudinal extremes. *Journal of Biological Research-Thessaloniki, 16*, 255-265, 2011.

Kokkini, S., Karousou, R, ve Lanaras, T., Essential oils of spearmint (Carvone-rich) plants from the island of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology, 23*(4), 425-430, 1995.

Kokkini, S., Karousou, R. ve Lanaras, T., Essential oils with 1,2-epoxy-p-menthane derivatives from *Mentha spicata* plants growing across the island of Crete. *Botanica Acta, 110*(2), 184-189, 1997.

Koşar, M., Dorman, H. J. D., Bachmayer, O., Baser, K. H. C. ve Hiltunen, R., An improved on-line HPLC-DPPH$^{\bullet}$ method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of Lamiaceae plants. *Chemistry of Natural Compounds, 39*(2), 161-166, 2003.

Koşar, M., Dorman, H. J. D., Baser, K. H. C. ve Hiltunen, R., Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

a postcolumn derivatization method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(16), 5004-5010, 2004.

Koşar, M., Bozan, B., Temelli, F. ve Başer, K. H. C., Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chemistry, 103*(3), 952-959, 2007.

Koşar, M., Göger, F. ve Baser, K. H. C., In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(7), 2369-2374, 2008.

Kozan, E., Küpeli, E. ve Yeşilada, E., Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their in vivo anthelmintic activity. *Journal of Ethnopharmacology, 108*(2), 211-216, 2006.

Kültür, Ş., Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology, 111*(2), 341-364, 2007.

Kumar, V., Kural, M. R., Pereira, B. M. J. ve Roy, P., Spearmint induced hypothalamic oxidative stress and testicular anti-androgenicity in male rats altered levels of gene expression, enzymes and hormones. *Food and Chemical Toxicology, 46*(12), 3563-3570, 2008.

Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L. ve Sarker, S. D., Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research, 21*(7), 615-621, 2007.

Lawrence, B.M. (2007). Oil composition of other *Mentha* species and hybrids. In B. M. Lawrence (Ed.), *Mint: the genus Mentha*, pp. 325–346, New York CRC Press,

Lebert, A., Tharrault, P., Rocha, T. ve Marty-Audouin, C., The drying kinetics of mint (Mentha spicata Huds.). *Journal of Food Engineering, 17*(1), 15-28, 1992.

Li, M., Xu, L., Li, Z., Qian, S. ve Qin, M., Chemical constituents from *Mentha canadensis*. *Biochemical Systematics and Ecology, 49*(0), 144-147, 2013.

Lin, L.-Z. ve Harnly, J. M., Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium*). *Food Chemistry, 120*(1), 319-326, 2010.

Liu, A.-H., Lin, Y.-H., Yang, M., Guo, H., Guan, S.-H., Sun, J.-H. ve Guo, D.-A., Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC–MS . *Journal of Chromatography B, 846*(1–2), 32-41, 2007a.

Liu, A. H., Guo, H., Ye, M., Lin, Y. H., Sun, J. H., Xu, M. ve Guo, D. A., Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1161*(1-2), 170-182, 2007b.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Llorach, R., Espin, J. C., Tomás-Barberán, F. A. ve Ferreres, F., Artichoke (*Cynara scolymus* L.) by products as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(12), 3458-3464, 2002.

Lu, Y. ve Yeap Foo, L., Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry, 59*(2), 117-140, 2002.

Lupien, S., Karp, F., Wildung, M. ve Croteau, R., Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (Mentha) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-limonene-3-hydroxylase and (-)-4S-limonene-6-hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 368*(1), 181-192, 1999.

Maffei, M., Camusso, W. ve Caramellino, D., Fructose is the most uptaken sugar for (-)-carvone biosynthesis in Mentha spicata L. *Journal of Plant Physiology, 158*(6), 811-813, 2001.

Malik, B., Sharma, N. R. ve Soni, G., Influence of agro-climatic conditions on antioxidant potential of *Mentha* species. *Journal of Pharmacy Research, 7*(5), 427-432, 2013.

March, R. E. ve Miao, X.-S., A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry, 231*(2–3), 157-167, 2004.

Marongiu, B., Porcedda, S., Della Porta, G., ve Reverchon, E., Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata* subsp. *insularis* essential oils by supercritical CO_2. *Flavour and Fragrance Journal, 16*(5), 384-388, 2001.

Maruyama, K., Goto, C., Numata, M., Suzuki, T., Nakagawa, Y., Hoshino, T. ve Uchiyama, T., O-acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha*. *Phytochemistry, 41*(5), 1309-1314, 1996.

Matraka, M., Ninou, E., Giannakoula, A., Lazari, D., Panou-Filotheou, H. ve Bosabalidis, A. M., Effects of soil water content on *Mentha spicata* L. and *Origanum dictamnus* L. *Israel Journal of Plant Sciences, 58*(3-4), 229-239, 2010.

Matsuda, F., Yonekura-Sakakibara, K., Niida, R., Kuromori, T., Shinozaki, K. ve Saito, K., MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *The Plant Journal, 57*(3), 555-577, 2009.

Matsunami, K., Otsuka, H., Takeda, Y. ve Miyase, T., Reinvestigation of the absolute stereochemistry of megastigmane glucoside, icariside B(5). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 58*(10), 1399-1402, 2010.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Mauri, P. ve Pietta, P,. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 23*(1), 61-68, 2000.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. ve Van Beek, T., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry, 85*(2), 231-237, 2004.

Miron, T. L., Herrero, M. ve Ibáñez, E., Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. *Journal of Chromatography A, 1288*(0), 1-9, 2013.

Mirzaie-Nodoushan, H., Rezaie, M. B., ve Jaimand, K.,, Path analysis of the essential oil-related characters in *Mentha* spp. *Flavour and Fragrance Journal, 16*(5), 340-343, 2001.

Moran, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abian, J., Harborne, J. B. ve Becana, M., Characterization of phenolic glucosides from soybean root nodules by ion-exchange high performance liquid chromatography, ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry. *Phytochemical Analysis, 9*(4), 171-176, 1998.

Muñoz-Bertomeu, J., Ros, R., Arrillaga, I. ve Segura, J., Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves. *Metabolic Engineering, 10*(3–4), 166-177, 2008.

Mustafa, A. F., McKinnon, J. J. ve Christensen, D. A., Effects of feeding ensiled spearmint (*Mentha spicata*) byproduct on nutrient utilization and ruminal fermentation of steers. *Animal Feed Science and Technology, 92*(1–2), 33-43, 2001.

Nakazawa, T. ve Ohsawa, K., Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats. *Journal of Natural Products, 61*(8), 993-996, 1998.

Niessen, W. ve Tinke, A., Liquid chromatography-mass spectrometry general principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A, 703*(1), 37-57, 1995.

Olennikov, D. N. ve Tankhaeva, L. M., Lamiaceae carbohydrates. 1. Pectinic substances and hemicelluloses from *Mentha x piperita*. *Chemistry of Natural Compounds, 43*(5), 501-507, 2007a.

Olennikov, D. N. ve Tankhaeva, L. M., Lamiaceae carbohydrates. II. Water-soluble polysaccharides from *Mentha x piperita*. *Chemistry of Natural Compounds, 43*(6), 648-651, 2007b.

Olennikov, D. N. ve Tankhaeva, L. M., Quantitative Determination of Phenolic Compounds in *Mentha piperita* Leaves. *Chemistry of Natural Compounds, 46*(1), 22-27, 2010.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Oomah, B. D. ve Mazza, G., Flavonoits and antioxidative activities in buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44*(7), 1746-1750, 1996.

Orhan, F., Barış, Ö., Yanmış, D., Bal, T., Güvenalp, Z. ve Güllüce, M., Isolation of some luteolin derivatives from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* and determination of their genotoxic potencies. *Food Chemistry, 135*(2), 764-769, 2012.

Oueslati, S., Karray-Bouraoui, N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R. ve Lachaal, M., Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum, 32*(2), 289-296, 2010.

Oyaizu, M., Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition [Eiyogaku Zasshi], 44*(6), 307-315, 1986.

Pandey, K. P., Shahi, S. K., Singh, R., Dutta, S. ve Dikshit, A., Antifungal efficacy of Taxodium and Mentha oils against some human pathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal, 17*(6), 443-444, 2002.

Papandreou, M. A., Kanakis, C. D., Polissiou, M. G., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Margarity, M. ve Lamari, F. N., Inhibitory activity on amyloid-β aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(23), 8762-8768, 2006.

Parejo, I., Caprai, E., Bastida, J., Viladomat, F., Jauregui, O. ve Codina, C., Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Ethnopharmacology, 94*(1), 175-184, 2004a.

Parejo, I., Jauregui, O., Sanchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J. ve Codina, C., Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(12), 3679-3687, 2004b.

Pellati, F., Orlandini, G., Pinetti, D. ve Benvenuti, S., HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 55*(5), 934-948, 2011.

Pearson, W., Fletcher, R. S., ve Kott, L. S., Oral rosmarinic acid-enhanced Mentha spicata modulates synovial fluid biomarkers of inflammation in horses challenged with intra-articular LPS, *Jounal of veterinary Pharmacology and therapeutics, 35*(5), 495-502, 2012.

Pino, J., Borges, P., Martinez, M., Vargas, M., Flores, H., Estarron, M. ve Fuentes, V., Essential oil of *Mentha spicata* L. from Jalisco. *Journal of Essential Oil Research, 13*(6), 409-410, 2001.

Ponnamperuma, K. ve Croteau, R., Purification and Characterization of an NADPH-Cytochrome P450 (Cytochrome c) Reductase from Spearmint

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

(*Mentha spicata*) Glandular Trichomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 329*(1), 9-16, 1996.

Prasain, J. K. (2012). *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*: In Tech.

Qiao, S., Shi, R., Liu, M., Zhang, C., Yang, W., Shi, X., Jiang, X., Wang, C. ve Wang, Q., Simultaneous quantification of flavonoits and phenolic acids in Herba Scutellariae barbatae and its confused plants by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry, 129*(3), 1297-1304, 2011.

Raja, N., Albert, S., Ignacimuthu, S. ve Dorn, S., Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *Journal of Stored Products Research, 37*(2), 127-132, 2001.

Rasoolia, I., Gachkar, L., Yadegarinia, D., Rezaei, M. B. ve Astaneh, S. D. A., Antibacterial and antioxidative characterisation of essential oils from *Mentha piperita* and *Mentha spicata* grown in Iran. *Acta Alimentaria, 37*(1), 41-52, 2008.

Rasooli, I., Dental Biofilm Prevention by *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* Essential Oils. *International Journal of Infectious Diseases, 12, Supplement 1*(0), e167, 2008.

Robbins, R. J., Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(10), 2866-2887, 2003.

Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., von Baer, D., Hinrichsen, P., Rodriguez, R., Arribillaga, D. ve Dominguez, E., Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A, 1281*(0), 38-45, 2013.

Saleem, M., Alam, A. ve Sultana, S., Attenuation of benzoyl peroxide-mediated cutaneous oxidative stress and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of mice with spearmint (*Mentha spicata*). *Food and Chemical Toxicology, 38*(10), 939-948, 2000.

Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Lamuela-Raventós, R. M., Bastida, J., Viladomat, F. ve Codina, C., Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1008*(1), 57-72, 2003a.

Sánchez-Rabaneda, F., Jáuregui, O., Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M. ve Lamuela-Raventós, R. M., Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry, 38*(1), 35-42, 2003b.

Sarıkürkçü, C., Eryiğit, F., Cengiz, M., Tepe, B., Çakır, A. ve Mete, E., Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Mentha pulegium* L. from Turkey. *Spectroscopy Letters, 45*(5), 352-358, 2012.

Scandalios, J. G., (1997). *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., Martins, J. D. L. ve da Silva, A. G., Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products, 50*(0), 408-413, 2013.

Schoeneborn, R. ve Mues, R., Flavone di-C-glycosides from *Plagiochila jamesonii* and *Plagiochasma rupestre*. *Phytochemistry, 34*(4), 1143-1145, 1993.

Serteser, A., Kargıoğlu, M., Gök, V., Bağcı, Y., Özcan, M. M. ve Arslan, D., Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. *Grasas Y Aceites, 60*(2), 147-154, 2009.

Sertkaya, E., Kaya, K. ve Soylu, S., Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisd.) (Acarina: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products, 31*(1), 107-112, 2010.

Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. ve Tanaka, T., Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J Ethnopharmacol, 75*(2-3), 95-115, 2001.

Sezik, E., Yeşilada, E., Shadidoyatov, H., Kulivey, Z., Nigmatullaev, A. M., Aripov, H. N., Takaishi, Y., Takeda, Y. ve Honda, G., Folk medicine in Uzbekistan. I. Toshkent, Djizzax, and Samarqand provinces. *J Ethnopharmacol, 92*(2-3), 197-207, 2004.

Sharaf, M., El-Ansari, M. A. ve Saleh, N. A. M., Flavone glycosides from *Mentha longifolia*. *Fitoterapia, 70*(5), 478-483, 1999.

She, G. M., Xu, C., Liu, B. ve Shi, R. B., Polyphenolic Acids from Mint (the Aerial of *Mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH• Radical Scavenging Activity. *Journal of Food Science, 75*(4), C359-C362, 2010.

Shen, D., Pan, M. H., Wu, Q. L., Park, C. H., Juliani, H. R., Ho, C. T. ve Simon, J. E., A Rapid LC/MS/MS Method for the Analysis of Nonvolatile Antiinflammatory Agents from *Mentha* spp. *Journal of Food Science, 76*(6), C900-C908, 2011.

Shitamoto, J., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H., Shinzato, T. ve Takeda, Y., Tricalysionoside A, a Megastigmane Gentiobioside, Sulfatricalysines A—F, and Tricalysiosides X—Z, ent-Kaurane Glucosides, from the

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Leaves of Tricalysia dubia. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 59*(1), 72-77, 2011.

Silberberg, M., Gil-Izquierdo, A., Combaret, L., Remesy, C., Scalbert, A. ve Morand, C., Flavanone metabolism in healthy and tumor-bearing rats. *Biomedicine & pharmacotherapy, 60*(9), 529-535, 2006.

Silva, C. L., ve Câmara, J. S., Profiling of volatiles in the leaves of Lamiaceae species based on headspace solid phase microextraction and mass spectrometry. *Food Research International, 51*(1), 378-387, 2013.

Singleton, V. L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventós, R. M., [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, 299*, 152-178, 1999.

Sitthithaworn, W., Yeepoosri, T., Yeepoosri, W., Mundee, K. ve Vannavanich, D., The effect of bio-extract from cabbage waste on growth, yield and quality of volatile oil extracted from *Mentha spicata* and *Mentha arvensis* var. *piperascens*. *Journal of Medicinal Plants Research, 5*(9), 1673-1676, 2011.

Srivastava, N. K. ve Luthra, R., Interspecific Variation in Mints for Photosynthetic Efficiency, and 14-C Primary Metabolic Pool in Relation to Essential Oil Accumulation. *Journal of Plant Physiology, 138*(6), 650-654, 1991.

Stalikas, C. D., Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science, 30*(18), 3268-3295, 2007.

Stalmach, A., Mullen, W., Barron, D., Uchida, K., Yokota, T., Cavin, C., Steiling, H., Williamson, G. ve Crozier, A., Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: identification of biomarkers of coffee consumption. *Drug Metabolism and Disposition, 37*(8), 1749-1758, 2009.

Subramanian, S. S. ve Nair, A. G. R., Flavonoids of the leaves of *Mentha spicata* and *Anisochilus carnosus*. *Phytochemistry, 11*(1), 452-453, 1972.

Şarer, E., Toprak, S. Y., Otlu, B. ve Durmaz, R., Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Mentha spicata* L. subsp. *spicata*. *Journal of Essential Oil Research, 23*(1), 105-108, 2011.

Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yeşilada, E., Fukui, H., Goto, K. ve Ikeshiro, Y., Traditional medicine in Turkey III. Folk medicine in east Anatolia, Van and Bitlis provinces. *Pharmaceutical Biology, 32*(1), 3-12, 1994.

Tanakol, R., Antioksidan Vitaminler Hastalıkta ve Sağlıkta Önemleri. *Klinik Gelişim*, 347-357, 1998.

Telci, İ., Farklı Nane (*Mentha* spp.) klonlarının bazı morfolojik tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma. [Doktora tezi]. *Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2001.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Telci, I., Sahbaz, N., Yilmaz, G. ve Tugay, M. E., Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. *Economic Botany, 58*(4), 721-728, 2004.

Telci, I., Demirtas, I., Bayram, E., Arabacı, O. ve Kacar, O., Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products, 32*(3), 588-592, 2010.

Tuncel, N. B. ve Yılmaz, N., Kaz Dağları'ndan Toplanan Bazı Bitkilerin Fenolik Asit Kompozisyonlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Belirlenmesi, *Akademik Gıda* 8 (3) (2010) 18-23.

USP. The United States Pharmacopeia: The National Formulary. 2008.

Velioğlu, Y., Mazza, G., Gao, L. ve Oomah, B., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(10), 4113-4117, 1998.

Vian, M. A., Fernandez, X., Visinoni, F. ve Chemat, F., Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A, 1190*(1–2), 14-17, 2008.

Vimolmangkang, S., Sitthithaworn, W., Vannavanich, D., Keattikunpairoj, S. ve Chittasupho, C., Productivity and quality of volatile oil extracted from *Mentha spicata* and *M. arvensis* var. *piperascens* grown by a hydroponic system using the deep flow technique. *Journal of Natural Medicines, 64*(1), 31-35, 2010.

Voirin, B., Bayet, C., Faure, O. ve Jullien, F., Free flavonoit aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica, M. citrata, M. spicata* and *M. x piperita*. *Phytochemistry, 50*(7), 1189-1193, 1999.

Vokou, D., Vareltzidou, S. ve Katinakis, P., Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agriculture, Ecosystems & Environment, 47*(3), 223-235, 1993.

Wang, Y., Yang, L., He, Y.-Q., Wang, C.-H., Welbeck, E. W., Bligh, S. W. A. ve Wang, Z.-T., Characterization of fifty-one flavonoits in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 22*(12), 1767-1778, 2008.

WHO. (2002). *WHO monographs on selected medicinal plants*: World Health Organization.

Wust, M., Little, D. B., Schalk, M., ve Croteau, R., Hydroxylation of limonene enantiomers and analogs by recombinant (-)-limonene 3- and 6-hydroxylases from mint (*Mentha*) species: Evidence for catalysis within

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

sterically constrained active sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 387*(1), 125-136, 2001.

Yalçın, A. S. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*, 342-346, 1998.

Yannai, S. (2012). *Dictionary of Food Compounds*: New York. CRC Press.

Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K., Kasai, R. ve Yamasaki, K., Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry, 48*(1), 131-136, 1998.

Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. ve Takaishi, Y., Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *Journal of Ethnopharmacology, 46*(3), 133-152, 1995.

Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K. ve Ikeshiro, Y., Traditional medicine in Turkey. IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *Journal of Ethnopharmacology, 39*(1), 31-38, 1993.

Yeşilada, E., Sezik, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y. ve Tanaka, T., Traditional medicine in Turkey IX: folk medicine in north-west Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology, 64*(3), 195-210, 1999.

Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, Ö.F., Bilaloğlu, V. Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), *Sage* (*Salvia triloba* L.), *and* Black Tea (*Camellia sinensis*) Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5030-5034 2000.

Younis, Y. M. H. ve Beshir, S. M., 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*(6), 539-541, 2004.

Zaidi, F., Voirin, B., Jay, M. ve Viricel, M. R., Free flavonoid aglycones from leaves of *Mentha pulegium* and *Mentha suaveolens* (Labiatae). *Phytochemistry, 48*(6), 991-994, 1998.

Zeinali, H., Arzani, A., Razmjoo, K. ve Rezaee, M. B., Evaluation of oil compositions of Iranian mints (*Mentha* ssp.). *Journal of Essential Oil Research*, *17*(2), 156-159, 2005

Zeng, G., Xiao, H., Liu, J. ve Liang, X., Identification of phenolic constituents in Radix Salvia miltiorrhizae by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20*(3), 499-506, 2006.

Zheng, J., Zhao, D. S., Wu, B. ve Wu, L. J., [A study on chemical constituents in the herb of *Mentha spicata*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 27*(10), 749-751, 2002.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Zheng, J., Chen, G.-T., Gao, H.-Y., Wu, B. ve Wu, L.-J., Two new lignans from *Mentha spicata* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, *9*(5), 431-435, 2007.

Zheng, J., Wu, L. J., Zheng, L., Wu, B. ve Song, A. H., Two new monoterpenoid glycosides from *Mentha spicata* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, *5*(1), 69-73, 2003.

Zhou, M.-J., Zhu, Y.-X., Corredor, P., Xie, F.-M., Kissinger, P. ve Liu, C.-X., Determination of the phase I and II metabolites of caffeic and chlorogenic acids in rats by LC/MS/MS. *Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics* 2006.

Znini, M., Bouklah, M., Majidi, L., Kharchouf, S., Aouniti, A., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Costa, J. ve Al-Dyab, S. S., Chemical Composition and Inhibitory Effect of Mentha Spicata Essential Oil on the Corrosion of Steel in Molar Hydrochloric Acid. *International Journal of Electrochemical Science*, *6*(3), 691-704, 2011.

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ