

Bitkisel Drog Monografı Hazırlanması:

MENTHA SPICATA L.

Yüksek Lisans Tezi

Döne Neşe ÇETİN

Eskişehir 2019

BİTKİSEL DROG MONOGRAFI HAZIRLANMASI: *MENTHA SPICATA* L.

Döne Neşe ÇETİN

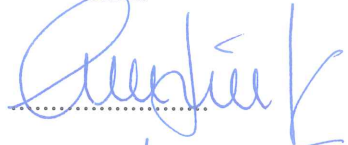
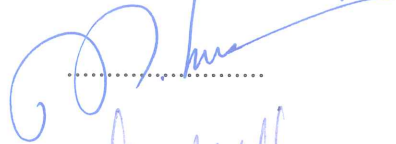
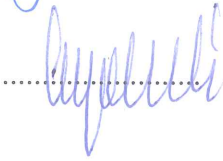
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman : Doç. Dr. Gökalg İŞCAN
2. Danışman : Doç. Dr. Fatih GÖGER**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ocak 2019**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Döne Neşe ÇETİN'in "Bitkisel Drog Monografı Hazırlanması Mentha spicata L." başlıklı tezi .../.../2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı ve Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. Gökalg İŞCAN	
Üye :	Prof. Dr. Neşe KIRIMER	
Üye :	Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ	


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür



FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled “Preparation a herbal drug Monograph :*Mentha spicata* L” has been prepared and submitted by Döne Neşe ÇETİN in partial fulfillment of the requirements in “Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination” for the Degree of Master of Science in Pharmacognosy Department has been examined and approved on/...../2019

Committe members

Member (Supervisor): Assoc. Prof.Dr. Gökalp İŞCAN
Member : Prof. Dr. Neşe KIRIMER
Member : Prof. Dr. Ceyda Sibel KILIÇ

Signature

.....
.....
.....

Director Graduate School of Health Sciences

Prof. Dr. Nalan GUNDOĞDU-KARABURUN

Müdür

ÖZET

BİTKİSEL DROG MONOGRAFI HAZIRLANMASI: *MENTHA SPICATA* L.

Döne Neşe ÇETİN

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2019

Danışman: Doç. Dr. Gökâl İŞCAN

2. Danışman: Doç. Dr. Fatih GÖGER

Mentha spicata L., ülkemizde doğal olarak yetişen, Lamiaceae familyasından tıbbi ve aromatik özellikleri ile gıda, ilaç, kozmetik ve kimya sektöründe büyük öneme sahip bir türdür. Akdeniz, Güney ve Batı Avrupa, Rusya, Asya, Türkiye ve ABD'nin ılıman bölgelerinde yetişmekte ve yaygın olarak kültürü yapılmaktadır. Ülkemizde bahçe nanesi veya eşek nanesi olarak bilinen *Mentha spicata* subsp. *spicata* ile kıvırcık ismiyle bilinen *Mentha spicata* subsp. *condensata* doğal olarak yetişmektedir.

Mentha spicata subsp. *spicata* sebze ve baharat olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Tıbbi amaçlarla mide bulantısına karşı, gaz giderici, safra kanalı ve gastrointestinal sistem spazmlarında, öksürük ve soğuk algınlığı tedavisinde, aromatan, irrite kolon sendromu, oral ve farenjiyal mukoza iltihabına karşı kullanılmaktadır. Aromaterapide inhalasyonla bulantı ve kusmaya karşı, haricen ise kas krampları ve baş ağrısında kullanım alanına sahiptir. Bahçe nanesinin karvonca zengin uçucu yağları hariç herhangi bir resmi farmakopede monografı bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, ülkemiz için büyük önemi olan bu türün kalite standartlarının oluşturulması için Avrupa Farmakopesi formatında bir monograf hazırlanması amaçlanmıştır. Farklı bölgelerde yetiştiricilerden temin edilen kültür formları ile kurutulmuş kaba toz hazır örnekler botanik ve farmakognozik bakımdan incelenmiş, bazı sınır testleri yapılmış, ayrıca su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağlarının kalitatif ve kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında, gıda olarak yaygın kullanımından yola çıkılarak, mikrobiyolojik kontrolleri ve taşıdığı rozmarinik asit miktarları ortaya konmuştur.

Anahtar Sözcükler: Bahçe nanesi, *Mentha spicata*, Monograf, Avrupa Farmakopesi,

Bitkisel drog.

ABSTRACT

PREPARATION OF A HERBAL DRUG MONOGRAPH: *MENTHA SPICATA* L.

Döne Neşe ÇETİN

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gökâlþ İŞCAN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih GÖGER

Mentha spicata L. is a species of natural importance in the food, medicine, cosmetics and chemical industries which grows naturally in our country having medical and aromatic properties from the Lamiaceae family. *Mentha spicata* is distributed in the Mediterranean, South and West Europe, Russia, Asia, Turkey and the temperate regions of the United States and is also cultivated. “*Mentha spicata* subsp. *spicata*” known as “Bahçe nanesi” or “Eşek nanesi” and “*Mentha spicata* subsp. *condensata*” known as “Kıvırcık” are plants that grow naturally in our country.

Mentha spicata subsp. *spicata* has been used as vegetables and spices for centuries. It is used for nausea, as carminative, aromatizing, against gall bladder canal and gastrointestinal system spasms, irritable colon syndrome, heavy coughing, cold treatment, oral and pharyngeal mucosa inflammation. It is also used in aromatherapy and for nausea and vomiting, external muscle cramps and headache. “Bahçe nanesi” has no monograph in any official pharmacopoeia, except for its carvon-rich essential oils.

In this thesis, it is aimed to prepare a monograph in the format of European Pharmacopoeia to establish the quality standards of this species which is of great importance for our country. Fresh specimens that have been collected from farmers and dried samples ready to consumption have been examined in terms of pharmacognosy and botanical characteristics; some limit tests has been carried out and it's essential oil has been extracted by water distillation and analyzed. In addition, microbiological controls were performed and the amounts of rosmarinic acid it contains were determined, based on its widespread use as food.

Keywords: Bahçe nanesi, *Mentha spicata*, Monograph, European Pharmacopoeia,

Bitkisel drog.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren, karşılaştığım her zorlukta hoşgörüsüyle desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Gökâl İŞCAN'a,

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarına yardım eden, yol gösteren, desteklerini esirgemeyen 2. Danışman hocam Doç. Dr. Fatih GÖGER'e,

Kantitatif analiz çalışmalarımda destek veren Kim. Emre ODUNCU'ya,

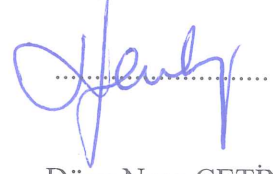
Yüksek lisans öğreniminde beraber yol aldığım ve desteklerini esirgemeyen Ecz. Zeynep ORALOĞLU'na,

Hayatımın her anında bana destek olan ve bana olan inançlarımı hiç yitirmeyen annem, babam, kardeşim ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

.../.../20...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

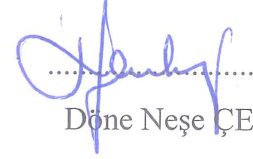


Döne Neşe ÇETİN

.../.../20...

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.



Döne Neşe ÇETİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
FINAL APPROVAL FOR THESIS	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GÖRSELLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	4
2.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyasının Genel Özellikleri	4
2.2. <i>Mentha</i> L.	5
2.2.1. Farmakopelerde kayıtlı <i>Mentha</i> monografları	7
2.3. <i>Mentha</i> L. Cinsinin Sistematikteki Yeri.....	8
2.3.1. <i>Mentha</i> L. cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması	8
2.4. <i>Mentha</i> L. Cinsinin Ticarettteki Yeri	9
2.5. <i>Mentha spicata</i> L.....	10
2.6. <i>Mentha spicata</i> L.'nın Tıbbi Amaçlarla ve Gıda olarak Kullanımı.....	15

2.7. <i>Mentha spicata</i> Uçucu Yağları ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları	16
2.8. Farmakope ve Monograf Kavramı	20
2.9. Türk Farmakopesi Tarihçesi	20
2.10. Türk Farmakopesi	21
2.11. Avrupa Farmakopesi	21
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	23
3.1. Bitkisel Materyal	23
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Standart Maddeler	24
3.3. Kullanılan Kimyasal Reaktifler	25
3.4. Kullanılan Cihaz ve Apeyler	25
3.5. Deneysel Çalışmalar ve Yöntemler	26
3.5.1. Mikroskopik inceleme	26
3.5.2. Su miktar tayini	26
3.5.3. Yabancı madde miktar tayini.....	27
3.5.4. Uçucu yağ miktar tayini.....	27
3.5.5. Bütün kül.....	28
3.5.6. Asitte erimeyen kül.....	28
3.5.7. İnce tabaka kromatografisi	29
3.5.8. Gaz kromatografisi (GK) ve Gaz kromatografisi/ Kütle spektrometrisi (GK/KS) ile uçucu yağın kimyasal bileşiminin belirlenmesi.....	30
3.5.8.1. GK analiz koşulları	30
3.5.8.2. GK/KS analiz koşulları	30
3.5.9. Uçucu yağın kantitatif analizi.....	31
3.5.10. Ekstrenin mikrobiyolojik analizi	33
3.5.11. Sıvı kromatografisi	34

4. BULGULAR VE YORUMLAR	35
4.1. Makroskobik İnceleme	35
4.2. Mikroskobik İnceleme	35
4.3. Volumetrik Su Miktar Tayini	35
4.4. Yabancı Madde Miktar Tayini	35
4.5. Uçucu Yağ Miktar Tayini.....	37
4.6. Kül Miktar Tayini	37
4.7. Asitte Erimeyen Kül Miktar Tayini	37
4.8. İnce Tabaka Kromatografisi.....	38
4.9. Uçucu Yağ Bileşimi	43
4.10. Uçucu Yağda 1,8-sineol, Limonen, (R)-(-)-karvon Miktar Tayini.....	43
4.11. Droğun Mikrobiyolojik Analizi	45
4.12. Sıvı Kromatografisi.....	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKÇA.....	53
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Mentha spicata</i> uçucu yağı ana bileşenleri.....	11
Şekil 3.1. R-(-)-karvon, 1,8-sineol ve limonen için kalibrasyon eğrileri.....	32
Şekil 4.1. <i>Mentha spicata</i> uçucu yağına ait örnek GK kromatogramı	43
Şekil 4.2. Rozmarinik asit molekülü	46

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. <i>Mentha spicata</i> 'nın sistematik sınıflandırılması.....	8
Tablo 2.2. Türkiye’de yetişen nane türleri	8
Tablo 2.3. Türkiye’nin kuru nane ihracatı	10
Tablo 2.4. <i>Mentha spicata</i> subsp. <i>spicata</i> ’da yapılan bazı uçucu yağ analiz çalışmaları.....	14
Tablo 3.1. Deneyler kullanılan droglar ve kaynakları.....	23
Tablo 3.2. Deneylerde kullanılan çözücü/kimyasal madde ve saflıkları	25
Tablo 3.3. Deneylerde kullanılan cihaz/aparey ve markaları.....	25
Tablo 3.4. İTK’da kullanılan mobil fazlar	30
Tablo 3.5. Ticari örneklere uygulanan mikrobiyolojik analizler ve inkübasyon koşulları	33
Tablo 4.1. Analiz sonuçları	38
Tablo 4.2. Numunelere ait uçucu yağların kompozisyon ve miktar tayini sonuçları.....	44
Tablo 4.3. Numune sonuçları	45
Tablo 4.4. 2009-2011 tarihli Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği sınır değerleri	45
Tablo 4.5. YBSK sonrası ekstrelerdeki rozmarinik asit içeriği	46

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. <i>Mentha</i> L.'nin Türkiye'deki yayılış alanları.....	9
Görsel 2.2. <i>Mentha spicata</i> subsp. <i>spicata</i>	13
Görsel 2.3. <i>Mentha spicata</i> subsp. <i>spicata</i> kültürü	13
Görsel 2.4. <i>Mentha spicata</i> subsp. <i>spicata</i> Türkiye'deki yayılış alanları	14
Görsel 3.1. Test edilen örneklerden bazıları	24
Görsel 3.2. Avrupa Farmakopesi'nde tanımlanan volumetrik su miktar tayini apareyi	27
Görsel 3.3. Clevenger apareyi.....	28
Görsel 3.4. Tempo [®] , QI otomatik sayım sistemi	33
Görsel 4.1. <i>Mentha spicata</i> subsp. <i>spicata</i> mikroskobik karakterleri	36
Görsel 4.2. Toz drogdan <i>n</i> -hekzan ile hazırlanan test çözeltisi İTK kromatogramı	40
Görsel 4.3. Uçucu yağ ile hazırlanan test çözeltisi İTK kromatogramı	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AİD	: Alev İyonlaşma Dedektörü
BGA	: List of German Commission E Monographs
DAB	: Deutsches Arzneibuch
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH*	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EP	: Epoksikarbon
eV	: Elektron-volt
FID	: Alev İyonlaşma Dedektörü
GK/AİD	: Gaz Kromatografisi / Alev İyonlaşma Dedektörü
GK/KS	: Gaz Kromatografisi / Kütle Spektrometrisi
GK	: Gaz Kromatografisi
HPTLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KOB/g	: Koloni Oluşturan Birim/g
LD ₅₀	: %50 Öldürücü Doz
MA	: Molekül Ağırlığı
MS	:Kütle spektrumları
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
Ph. Eur.	: Avrupa Farmakopesi
PDI	: Parçacık Dağılım Endeksi
PDR	: Physicians Desk Reference
PLGA	: Poli(laktik-ko-glikolik asit)
Rf	: Tutunma Faktörü
UV	: Ultraviyole
USP	: United States Pharmacopeia
Std.	: Standart
TSE	: Türk Standartları Enstitüsü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğadaki tüm canlılar bir dengenin parçasıdır. Mitolojide bitkilerden, tanrıların insana verdiği en değerli hediye şeklinde bahsedildiği görülmektedir. Bütün bitkiler insanın hizmetine sunulmuştur ve insanın varoluşundan bu yana bitkilerle olan ilişkisi devam etmektedir (Gezgin, 2006). Binlerce yıldır kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler, insanların sağlığı sürdürmek, hastalıkları iyileştirmek veya önlemek için başvuracakları tek kaynak olmuşlardır. Tıbbi bitkiler; kozmetik, bakım, şifa ve tütsü olarak veya dini törenlerde çeşitli şekillerde kullanılırken, aromatik bitkiler tatları ve güzel kokuları için kullanılmıştır. Tıbbi amaçla kullanılan bitkilerin hangi derde deva olduğuyula ilgili nesilden nesile aktarılan bilgiler bulunmakta ve genellikle bir kullanım reçetesi olan bu bitkilere halk arasındaki ifadesiyle “şifalı bitkiler” denilmektedir (Yeşil, 2012; Çolak, 2012). Doğal ilaçların önemli bir kısmı laboratuvar şartlarında sentezlenemediğinden veya ekonomik olarak elde edilemediğinden, halen doğal kaynaklardan çeşitli yollarla elde edilmektedir. Günümüzde sentetik ilaçların istenmeyen yan etkileri ve ülkelerin tüm toplum bireylerini kapsamayan sağlık politikaları nedeniyle ilaçlara erişimdeki zorluklar insanları doğal kaynaklı ilaçları kullanmaya itmiştir. Bitkisel drogların tedavi amacıyla kullanılmasının üstünlüklerinden biri de bu doğal ilaçların aynı anda birkaç etkiye birden sahip olmalarıdır. Oysa sentetik ilaçlar normalde bakıldığında sadece tek bir hedefe yöneliktir. Bu amaçla yeni doğal ilaç ham maddeleri bulmak için bitkiler üzerinde yapılan araştırmalar günden güne artmaktadır (Baytop, 1984; Yeşilada, 2012; Heinrich., 2017). Bitkilerin evrimsel süreç içerisinde; dahil oldukları ekosistemde, savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme, biyotik ve abiyotik çevresel koşullara uyum gibi hayati olaylarda çeşitli avantajlar sağlayan, sekonder metabolitleri araştırılmayı bekleyen ilaç aday molekülleridirler (Bourgaud vd., 2001).

Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilerin miktarı, antik çağlardan bu yana devamlı bir artış göstermektedir. Mezopotamya uygarlığı döneminde tedavide kullanılan bitkisel drog miktarı 250 civarındayken, Grekler döneminde kullanılan bitkisel drog miktarı 600 civarındaydı. Arap-Fars uygarlığı döneminde bu sayı 4.000 civarına kadar çıkmıştır. 19. yüzyılın başlarına bakıldığında ise bilinen tıbbi bitkisel drog miktarı 13.000’i bulmuştur (Bayramoğlu vd., 1999). Tarih öncesi dönemden başlayarak Mezopotamya, Eski Mısır, Hitit, Yunan, Roma, Selçuklu ve Osmanlı dönemlerinde bitkisel ilaçlar tedavide yer almıştır. Anadolu insanının Yontma taş (Paleolitik) devrinden beri bitkileri tedavi amacıyla kullandığı ve yaklaşık 50.000 yıldan

beri bitkilerden çeşitli amaçlarla yararlandığı bilinmektedir (Özbek, 2005). Dioskorides'in ilk farmakope sayılabilecek "De Materia Medica" isimli 5 ciltlik eserinde, 500 tıbbi bitkinin ve bu bitkilerden hazırlanan ilaçların tedavide kullanımı ile ilgili ayrıntılı bilgiler verilmiştir (Baytop, 1999). Bu bitkilerden çoğu Anadolu'da yetişen türlerdir. Dioskorides'in eserinde 1000 kadar doğal maddenin (bitkisel, hayvansal ve madensel kökenli) özellikleri, bu maddelerin 4750 kadar tıbbi olarak tedavide kullanılışı ve 350 kadar tıbbi etkisi bir araya toplanmıştır (Baydar, 2009). İslam kültüründe de bitkilerle tedavi yöntemleri önemli bir yere sahip olup özellikle orta çağ İslam hekimleri bitkilerle hastalıkların tedavisi konusunda eserler yazmışlardır. Ebu Reyhan Biruni (973-1051) Kitab al-Saydada fi al-Tıb, İbni Sina (980-1037) Şifa ve Kanun Fi't Tıb, İbn Baytar (1197-1248) Kitab al-Cami al- Müfredat al-Adviye vel-Agdiye ve Davud al-Antaki (1541-1599) Tezkeri-i Davud bu eserlerden bir kısmıdır (Karakaplan, 2017).

Dünyada tıbbi ve aromatik bitkiler, eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Bugün yeryüzünde bulunan bitki türü sayısının 350-400 bin arasında olduğu kabul görmekte ve her yıl bu sayıya da 2000 tür ilave olmaktadır (Ersöz, 2012; Byng ve Christenhusz, 2018). Dünyada eski tarihlerden bu yana kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerin sayısının Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 20000 civarında olduğu ve bunlardan yaklaşık 4000 drogun yaygın bir şekilde kullanıldığı ve halen dünyada 2000 civarı, Batı Avrupa'da ise 500 civarı tıbbi bitkinin ticaretinin yapıldığı bildirilmiştir (Baydar, 2005). Gelişmekte olan ülkelerde bitkisel ürünlerin tedavide kullanım oranı %80 iken, Asya, Afrika gibi ülkelerde bu oran %95'i bulmaktadır. ABD ve Avrupa'da ise bu oran %50 civarındadır (Acıbuca ve Budak, 2018).

Son yapılan çalışmalara göre Türkiye Florasında 12.476 takson kayıtlıdır (Özaydın vd., 2006; Deveci, 2012; Uskutoğlu vd., 2017). Ülkemiz florasında doğal olarak bulunan 10000'i aşkın bitki türünden 500 tanesi tıbbi amaçlı etkin madde içermektedir (Özel, 1999; Kendir ve Güvenç, 2010).

Türkiye iklim ve bitki çeşitliliği, coğrafi konumu, geniş yüzölçümü ve tarımsal potansiyeli ile tıbbi ve aromatik bitki ticaretinde ön sıralarda gelen ülkelerden biridir. Türkiye'nin bu önemi; gelişmiş ülkelerdeki bitki kimyasalları, gıda ve katkı maddeleri, bitkisel ilaç, kozmetik ve parfümeri sanayilerinin ham maddelerini sağlayan bitkilerin ülkemiz florasında yetişmesinden kaynaklanmaktadır (Bayram vd., 2010).

Uçucu yağlar, canlı organizmaların doğal matrikslerinde bulunan uçucu kimyasalların kompleks karışımlarıdır. Uçucu yağlar, bitkisel, hayvansal veya mikrobiyal kökenli olup, aromatik her türlü ürünün koku ve zaman zaman tat alma özelliklerinden sorumludurlar. Genel olarak kokulu bu tür ürünler “uçucu yağlar”, “özler”, “aetheroleum” veya “eterli yağlar” olarak adlandırılır (Başer ve Buchbauer, 2010). Uçucu yağlar genellikle mono ve seskiterpenlerden oluşan çok ilginç doğal bitkisel ürünler olup antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, antitümoral, sitotoksik, anestezik ve analjezik etkilere sahip biyoaktif karışımlardır (Başer ve Buchbauer, 2010; Bajpai, 2016; Edris 2007).

Dünya uçucu yağ üretimi 22 milyon ton civarında olup, narenciye yağlarından sonra en çok üretilen ikinci uçucu yağlardır. *Mentha L.* uçucu yağ üretiminde Çin başta olmak üzere Brezilya, ABD, Paraguay, Arjantin, Peru, Kore, Tayland, Tayvan ve Hindistan önemli üreticilerdir (Başer, 1997). Dünyada ticareti yapılan tıbbi ve aromatik bitkilerin %25’i kozmetik, % 25’i ilaç % 50’si de gıda sanayinde kullanılmaktadır. Dünya bitkisel drog ticaretinin 10-13 milyar dolar seviyelerinde olduğu tahmin edilmektedir ve ülkemiz ne yazık ki zengin florasına rağmen bu pazardan yaklaşık olarak 5-60 milyon dolarlık bir pay almaktadır. Bu durum aynı zamanda aromatik ve tıbbi bitkileri çoğunlukla işlemeden ham olarak ihraç etmemizden kaynaklanmaktadır (Faydaoğlu, 2011). Ülkemizin bitkisel zenginliğine bakıldığında; kaliteli bitkisel hammadde üretimi ve bu ürünlerin ülkemizdeki çeşitliliğinin bilinmesi ve kalite özelliklerinin ortaya konulması ticarete dâhil olma bakımından son derece önemlidir.

Çalışmamızın da konusu olan *Mentha spicata* (bahçe nanesi) ülkemizde doğal olarak yetişen, yaygın şekilde kültürü yapılan ve halk arasında daha çok baharat olarak tüketilse de, taze ya da çay şeklinde tıbbi amaçlarla kullanılan önemli bir aromatik bitki türüdür. *M. spicata*’nın uçucu yağı veya ana bileşenleri çok sayıda gıda, ilaç ve kozmetik ürünün bileşimine girmektedir. Tıbbi ve kozmetik amaçlı kullanım potansiyeli göz önüne alındığında yapılan araştırmalar ile yalnızca İngiliz Farmakopesi’nde uçucu yağıyla ilgili bir monografi bulunan *Mentha spicata*’nın resmi farmakopemiz olan Avrupa Farmakopesi’nde bitkisel drog monograflarında yer alan kalite kontrol parametreleri esas alınarak monografinin hazırlanması amaçlanmıştır. Kültür ve ticari formlarından temin edilen örneklerde monografda yer alan testler yanında, bazı mikrobiyolojik analizler, uçucu yağların kalitatif ve kantitatif analizleri ile hidroalkolik ekstresinin sıvı kromatografisi ile analizleri gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Lamiaceae (Labiatae) Familyasının Genel Özellikleri

Lamiaceae (eski adıyla Labiatae) familyası (Ballıbabagiller) dünyada yaklaşık 250 cins ve 7000 türü kapsamakta olup, bu familyaya ait üyeler başta Akdeniz ülkeleri olmak üzere, Güney Amerika, Güney batı Asya ve Avustralya'da yayılış göstermektedir. Akdeniz bölgesi gen merkezi olmakla birlikte, dünyanın hemen her yerinde dağılış gösteren kozmopolit bir familyadır. Kutuplardan Himalayalar'a kadar hemen hemen her habitat ve yükseklikte yetişirler (0-5100 m). Güneydoğu Asya'dan Hawaii ve Avustralya'ya kadar, Afrika boyunca ve Amerika'nın kuzeyinden güneyine kadar olan yerlerde yayılış gösterirler (Özdemir, 2014; Tanker, 2007; Baytop, 1996; Hedge, 1986).

Türkiye Lamiaceae familyasının önemli gen merkezlerinden biridir ve bu familya ülkemizde 45 cinste 256'sı endemik olmak üzere yaklaşık 574 türden meydana gelmektedir. Lamiaceae familyasının ülkemizde endemizm oranı yaklaşık % 44,5'tir ve içerdiği takson sayısı bakımından Türkiye'nin en zengin üçüncü familyasıdır (Karakaplan, 2017; Koyuncu vd., 2010, Aytaç ve Yıldız, 1996). Son yapılan çalışmalara göre familyaya ait takson sayısının arttığı gözlemlenmektedir (Göger, 2013; Ellialtıoğlu vd., 2007).

Bu familya bitkileri çoğunlukla çok yıllık otsu bitki, çalı ve ender olarak ağaç formundadır (Yaltırık ve Efe, 1996). Gövdeleri 4 köşeli, yaprakları dekussat dizilişlidir. Gövdelerinde epidermis altında köşe kollenkiması ve uçucu yağ salgılayan salgı tüylerinin bulunuşu önemli özelliklerindedir. Sık rasemus durumunda toplanmış zigomorf ve erdişi çiçekler taşıyıcı yaprakların koltuklarında gelişir. Kaliks 2 dudaklı, korolla tabanda tüpsü, üstte 2 dudaklıdır. Üst dudak 2, alt dudak 3 petalin birleşmesinden oluşur. Birleşmiş petalleri loblarından ayırt edilebilir. Çiçeklerde eksen önündeki stamen körelmiş, diğer 4 tanesi gelişmiştir. Bu dört stamenden 2 tanesinin filamentu uzun, 2 filament tanesinin kısadır. Bazı türlerinde ise 4 stamenden yalnız 2 tanesi verimli kalmış, diğer 2 tanesi ise staminodyuma farklılaşmıştır. Ovaryum üst durumlu ve 2 karpelli olup ayrı bir bölme ile 4 lokulusa ayrılmıştır. Stilus tek stigma çoğunlukla 2 lobludur. Stilusun çiçek dışına kadar uzanışı tipiktir. Ovaryum tabanında yüksük gibi kuşatan ve nektar salgılayan diskus vardır. Entemogam bitkilerdir. 3200 kadar türü vardır (Davis, 1982; Zeybek ve Zeybek, 1994). Lamiaceae familyası

Nepetoideae alt familyasına girmektedir. Nepetoideae alt familyası az çok bilabiat, beş loblu korolla (bazen füzyon ile dört yapraklı) olarak karakterize edilir; korolla tüpüne yerleştirilmiş iki veya dört stamen; ginobazik bir tarzda ayrılan dört adet dörtlü merikardın bir yumurtalığı; bir lob azaltılmış bifid tarzı; dört tek-tohumlu nutlets meyvesi; endosperm olmayan nutlets; alt-bezleri ile kaplı, karşı ya da nadiren dikenli yapraklara sahip dörtgen bir sap; heksakolpate, trinükleotit polen; uçucu yağlar ve rosmarinik asit içerir (Lawrance, 2007; Abu-Asab ve Cantino, 1992).

Bu familya türlerinin en önemli özelliği büyük kısmının hoş kokulu olmaları ve bir kısmının da süs bitkisi olarak yetiştirilmesidir ve bu özellikleri değerlerini daha da arttırmaktadır. Bu familyaya ait birçok cins bu maksatla kültüre alınmaktadır (Göger, 2013; Sertkaya vd, 2010). Lamiaceae familyası üyelerinin büyük bir kısmı uçucu yağlar ve benzeri sekonder metabolitler bakımından zengindir. Bu nedenle gıda, kozmetik, tıp ve eczacılık gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Tanker vd., 1998; Tanker, 2007; Karakaplan, 2017).

2.2. *Mentha L.*

Ballıbabagiller familyasından (Lamiaceae) karakteristik nane kokusuna sahip veya bu kokuya benzeyen bileşime sahip birçok bitkiye nane denmektedir. Nane gibi kokan bitkilerin tümü Ballıbabagiller familyasından olan cinslerden örneğin, *Cyclorrichium*, *Micromeria*, *Acinas*, *Calamintha*, *Ziziphora* gibi cinsler de halk arasında nane gibi kullanılır (Başer, 2006). Nane, bilindiği gibi *Mentha* türlerine verilen genel bir addır ve bu bitkiler çok yıllık sürünücü gövdelere sahip otsu bitkilerdendir. Nane değerli bir tıbbi ve aromatik bitkidir. Anavatanı Orta Avrupa ve Asya olan nane, dünyanın hemen her bölgesinde yayılış göstermekte olup, geniş bir tür zenginliğine sahiptir (Karakaplan, 2017). *Mentha*, ekonomik değerlere sahip olan uçucu yağları ile büyük önem arz eder. Yıllık olarak üretilen yağların miktarı, 23.000 metrik tonu aşmakta ve 400 milyon doların üstünde bir değerdedir. Bu onları üretilen en ekonomik uçucu yağlar yapmaktadır (Lawrence, 2007). Türkiye de yetişen ilaç ve baharat bitkileri, çoğunlukla yerel genotipler olup, bu konudaki çalışmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır. *Mentha L.* temel olarak çoğunlukla Avrasya, Güney Afrika ve Avustralya'nın nemli bölgelerinde büyüyen bitkiler olup, dünyada bu cinse ait 25'ten fazla türün bulunduğu, bu türler arasında Türkiye florasında yaygınlık gösteren cinslerin *M. pulegium*, *M. arvensis*, *M. aquatica*, *M. longifolia*, *M. piperita* ve *M. suaveolens*

olduğunu rapor eden çalışmalar yapılmıştır (Güllüce vd., 2007). *Mentha x piperita*, *M. aquatica* ve *M. spicata*'nın bir melezi olarak kabul edilir (Lawrence, 2007). Pulegonca zengin *M. pulegium* (Filiskin, Yarpuz, Pennyroyal) Türkiye'nin doğal bir bitkisidir. *Mentha*'nın Türkiye'de yetişen türleri Tablo 2.2'de verilmiştir ve Türkiye'deki yayılış alanları Görsel 2.1'de gösterilmiştir. Türkiye'de yetişen 15 takson ve 10 tür bulunmaktadır (Güner, 2012). Avrupa Farmakopesi'nde yer alan *M. piperita* doğal olarak ülkemizde yetişmediğinden rizomlarından genellikle Çukurova bölgesinde kültüre alınarak yetiştirilmekte ve ihraç edilmektedir. Osmanlılar zamanında çok miktarda uçucu yağ üretimi yapıldığına dair bilgiler mevcuttur (Başer, 2014; Celenk vd., 2008).

Nanenin uçucu yağları ve ekstraları binlerce yıldan beri, baharat, gıda koruma, ilaç olarak, tamamlayıcı tıpta ve doğal tedavilerde kullanılmaktadır. Uçucu yağlar, özellikle bakteriyel patojenlere karşı antimikrobiyal özelliktedir. Uçucu yağlar oda sıcaklığında uçucudur, bu nedenle solunum yolu enfeksiyonlarında inhalasyon tedavisi ile kullanılabilir (Singh ve Ruchi, 2013). *Mentha* türlerinden elde edilen uçucu yağların alttür, varyete, bitkinin yetiştirildiği bölge, yükseklik ve iklim koşullarına bağlı olarak, farklı kimyasal içeriklere sahip oldukları bilinmektedir (Toprak, 2005). *Mentha* türleri kendi aralarında kolayca melezlenebildiği için taksonomik açıdan oldukça karmaşıktır (Kokkini, 1992; Kokkini vd., 1995). Nane bitkisinin etkin bileşikleri olarak yapraklar %0,8-4 oranında; uçucu yağ, rosmarinik asit, flavonlar, triterpenik bileşikler, kafeik ve klorojenik asit taşımaktadır. Uçucu yağ miktarları ve içerdikleri bileşenler yetiştirilen türe, ırka ve yetişme koşullarına göre değişmektedir (Deveci vd., 2016). *Mentha* cinsi, alkaloitler, flavanoitler, fenoller, polisakkaritler gibi sekonder metabolitleri de üretmektedir. Gıda ve eczacılık, kozmetik ve pestisit endüstrilerinde aktif olarak kullanılmaktadır (Shinwari vd., 2011).

Osmanlı ve Türk tıbbında da, *Mentha* bitkisinden elde edilen, nane yaprağı ve nane yağı, birçok farklı amaçla ve çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan bir bitkiydi. Eski Mezopotamya Kodeksine bakıldığında, 120 adet madeni ve hayvani, 150 adet ise bitkisel drog bulunmaktaydı ve nane de bu kodeks içerisinde ilaç olarak yer almaktaydı. Ortaçağ'da yaşamış olan ünlü Türk hekimi İbn-i Sina'nın (980-1037) yanı sıra, 15. yüzyılda Fatih Sultan Mehmet döneminde, sarayda kullanılan baharatlar arasında da bulunmaktaydı. Sonbahar mevsiminde sarayda nane çorbası yapılırdı, Topkapı Sarayı'nda bulunan hekimbaşları çorbayı ilaç olarak hazırlayarak halka

bunları sunarlardı. Kırmız, hazine yağı, bazı macunlar ve şerbetler bu ilaçlar arasında olup, nane de bir baharat ve ilaç olarak kırmız ve macunların yapısına girmektedir. Nane 1877 tarihinde yazılan Dustur al-Edviye adı verilen eski Türk Kodekslerinde de kayıtlıdır (Özdemir, 2014).

Botanik özellikleri: 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). Sucul ya da yarı sucul çok yıllık otsu bir bitkidir. Rizomları ince uzun ve boğumludur. Gövdesi çoğunlukla kırmızımsı mor renklidir. Yaprakları çoğunlukla 6 cm uzunluğunda, yumurtamsı ya da yumurtamsı mızrak şeklinde, kenarları dişli, güzel kokulu ve koyu yeşildir. Çiçekleri tüp şeklinde ve çevrel dizili, leylak rengine yoğun küremsi, 15-60 cm uzunluğunda terminal salkım kurul şeklindedir (Köse, 2010).

Anatomik olarak *Mentha* taksonu, Labiatae familyasının diğer üyeleri gibi hem kapitat hem de peltat glandüler trikومları içerir (Lawrance, 2007).

Dünyada kültürü yapılmakta olan üç önemli nane türü;

- İngiliz nanesi (Peppermint): *Mentha x piperita*
- Japon nanesi (Japanese mint): *Mentha arvensis*
- Bahçe nanesi (Spearment): *Mentha spicata*’dır (Simon vd., 1980).

2.2.1. Farmakopelerde kayıtlı olan *Mentha* monografaları

Avrupa Farmakopesi 9.0’da *M. piperitae* türüne ait; yaprak (Peppermint leaf)-Tıbbi nane yaprağı; *M. piperitae folium*, tıbbi nane yaprağı kuru ekstresi (Peppermint leaf dry extract) – *M. piperitae folii extractum siccum*, tıbbi nane uçucu yağı (Peppermint oil) – *M. piperitae aetheroleum* yer alır. *Mentha canadensis* L. türünün çiçekli herbasından mentolün kristalizasyon ile uzaklaştırıldığı “Mentolü kısmen alınmış nane esansı” monografaları bulunmaktadır (Ph. Eur., 2016).

İngiliz Farmakopesinde *Mentha* ile ilgili 4 monograf bulunmaktadır: Peppermint Leaf, Peppermint Oil, Spearment Oil, Dementholised Mint Oil (BP, 2009). Yalnızca *M. spicata*’nın uçucu yağı yer alır.

Amerikan Farmakopesinde kayıtlı 4 monograf bulunmaktadır: Peppermint, Peppermint water, peppermint oil, peppermint spirit (USP, 2018).

Alman Farmakopesinde ise *M. piperitae aetheroleum* kayıtlıdır (DAB, 2015).

Alman Komisyon E'de (German Commission E) mint oil (*Mentha arvensis*), peppermint oil ve peppermint leaf olarak 3 monograf bulunmaktadır (BGA, 2018).

M. piperitae aetheroleum, *M. piperitae folium* monografları da WHO monografları arasında da yer almaktadır (WHO, 2004).

2.3. *Mentha L.* Cinsinin Sistematikteki Yeri

2.3.1. *Mentha L.* cinsinin taksonomik olarak sınıflandırılması

Tablo 2.1 *Mentha spicata*'nın sistematikteki yeri

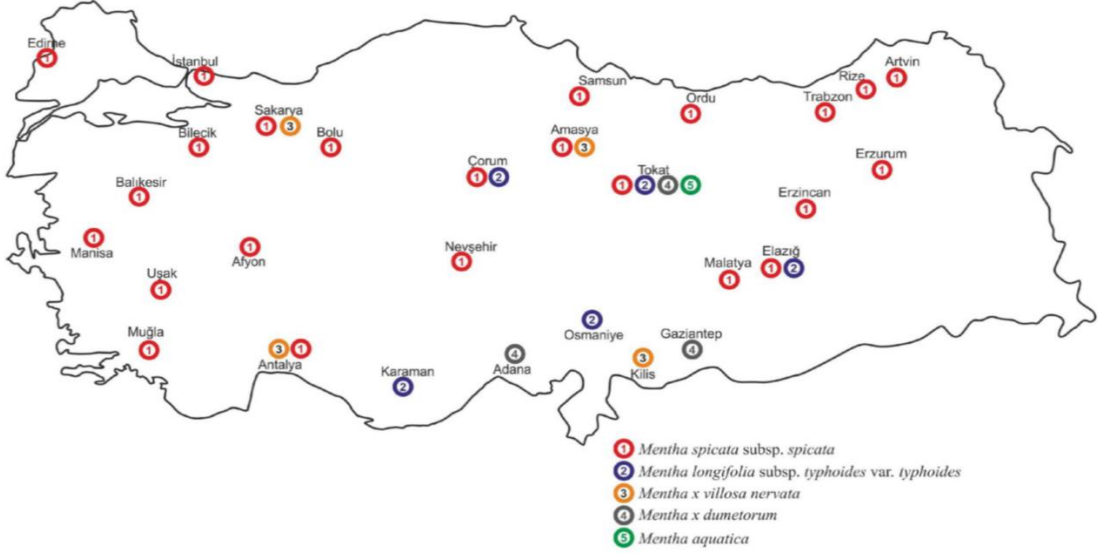
Bölüm	Spermatophyta
Alt Bölüm	Angiospermae
Sınıf	Dicotyledonae
Alt sınıf	Metachlamydeae
Takım	Tubiflorae
Familya	Lamiaceae
Alt Familya	Nepetoidea
Cins	<i>Mentha L.</i>
Tür	<i>Mentha spicata</i>

Tablo 2.2. Türkiye'de yetişen nane türleri (Güner, 2012)

Takson Adı	Türkçe Adı
<i>Mentha aquatica</i>	Su nanesi
<i>Mentha arvensis</i>	Kır nanesi
<i>Mentha longifolia</i>	Pünk
- <i>M. longifolia</i> subsp. <i>longifolia</i>	Pünk
- <i>M. longifolia</i> subsp. <i>noeana</i>	İt nanesi
- <i>M. longifolia</i> subsp. <i>typhoides</i>	Dere nanesi
<i>Mentha pulegium</i>	Yarpuz
<i>Mentha spicata</i>	Eşek nanesi
- <i>M. spicata</i> subsp. <i>condensata</i>	Kıvırcık nane
- <i>M. spicata</i> subsp. <i>spicata</i>	Bahçe nanesi, Eşek nanesi
<i>Mentha suaveolens</i>	Kaba nane
<i>Mentha x dumetorum</i>	Deli nane

<i>Mentha x piperita</i> *	Nane
<i>Mentha x villosa-nervata</i>	Delikara
<i>Mentha x rotundifolia</i>	Marşama

*:*Mentha x piperita* kültüre alınmıştır. Doğal olarak yetişmemektedir.



Görsel 2.1. *Mentha L.*'nin Türkiye'deki Yayılış Alanları (Yetişen, 2011)

2.4. *Mentha L.* Cinsinin Ticaretteki Yeri

Nane bitkisinin yaprakları (*Menthae folium*) ekonomik açıdan en değerli kısımlarıdır (Dualı, 2010). Aynı şekilde uçucu yağının da ilaç ve kozmetik sektöründe farklı kullanım amaçları sebebiyle *Mentha* türlerinin birçok ülkede ticaret amacıyla tarımı yapılmaktadır (Büyükbayraktar, 2014). *M. spicata* (Bahçe nanesi, spearmint), *Mentha x piperita* (Tıbbi nane, kara nane, Peppermint) ve *M. arvensis* var. *piperascens* (*M. canadensis*) (Japon nanesi, Japanese mint) ticari nane türleridir. Türkiye'de nane olarak kullanılan ve yetiştirilen tür *M. spicata*'dır. *Mentha x piperita* az miktarda ve ihracat amacıyla yetiştirilmektedir (Başer, 2014). Türkiye'nin nane ihracatı yıllara göre gerçekleşme sayıları Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Türkiye'nin kuru nane ihracatı (Başer, 2014)

Yıl	Ton	Dolar	Birim İhraç Değeri(\$/kg)
010	572	1574929	2,75
2011	327	1145558	3,50
2012	166	805545	4,84

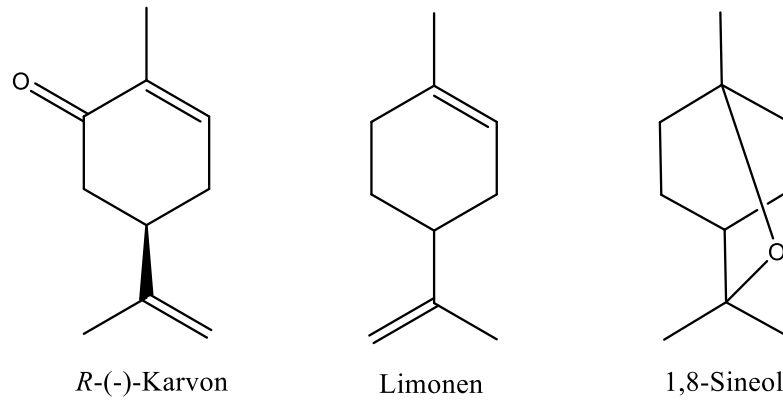
2.5. *Mentha spicata* L.

30-100 cm uzunlukta, çıplak veya grimsi tüylü, kuvvetli kokulu, çok yıllık ve otsu bir bitkidir. Yapraklar sivri uçlu, neredeyse sapsız, çiçekler soluk mavi renkli, dalların ucunda uzun ve dar başak durumunda toplanmış şekildedir. Yetiştirme alanları sulak yerler veya su kenarlarıdır. Bilhassa Kuzey batı ve Anadolu'da yaygın olarak yetişir (Davis, 1982; Baytop, 1984; Eryiğit, 2006). "Spearmint" olarak bilinen, *M. spicata* bitkisi en fazla uçucu yağ veren *Mentha* türüdür. Sinonimleri *Mentha viridis* ve *M. crispa* olan *M. spicata* Akdeniz bölgesi, Güney ve Batı Avrupa, Rusya, Asya, Türkiye ve ABD'nin ılıman bölgelerinde yetişir ve dünyanın pek çok yerinde kültürü yapılır (Dualı, 2010.; Darligton ve Wylie, 1955; Borisova vd., 1977). Bitki baharat olarak kullanımının yanında, özellikle uçucu yağ eldesinde kullanılmaktadır. Bu tür %1-5 arasında uçucu yağ içermektedir. Elde edilen uçucu yağ *Mentha viridis aetheroleum* adı altında bilinir. Bu yağ içinde ana bileşen olarak R-(-)-karvon (%40-70) bulunmaktadır. Diğer ana bileşikler genellikle limonen ve 1,8-sineoldür. *M. Spicata*'nın alttürleri *Mentha spicata* subsp. *spicata* ve *Mentha spicata* subsp. *condensata*'dır. *M. spicata* subsp. *condensata*'nın sinonimi *M. spicata* subsp. *tomentosa*'dır (Davis, 1982). *M. spicata* subsp. *spicata* uçucu yağındaki ana bileşenler Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu alttür Antep nanesi, bahçe nanesi, Rumi nane, yeşil nane olarak da bilinir (Baytop, 1984). *M. spicata* da uçucu yağı ile aranan bir türdür; Spearmint esansı adı verilen, özel kokulu bir esans elde edilir; bu ürün *Mentha x piperita*'daki gibi mentol taşımaz (Tanker vd., 1998). Tablo 2.4'de çeşitli araştırmacıların yaptığı çalışmalarda bulunan ana bileşenler ve yüzdeleri gösterilmiştir.

Türk Standartları Enstitüsü (TSE) *Mentha spicata* için kuru nane adı altında bir standart belirlemiştir. Bu standarda göre kuru nane, kırılmış ufalanmış kuru yapraklardan oluşur. Bu yapraklar *M. spicata* L. kültüründen çiçek açma döneminden önce veya başlangıcında toplanarak kurutulur. Yapraklar donuk veya griye çalan

yeşildir. Kendine özgü, lezzet ve kokuda, tatlımsı aromada olmalı; yabancı kokular ve çürük bitki kokuları veya toprak kokusu almış olmamalıdır. Kuru nane içerisinde canlı böcek ve küf olmamalı ve çıplak gözle veya bazı özel durumlarda mikroskopla bakıldığında, böcek, böcek kalıntıları ve kemirgen yeniği görülmemelidir (TSE, 2001).

Ülkemizde en çok ekilen ve kullanılan nane, bahçe nanesidir. Hemen her evde nane olarak kullanılan bitki bu nane türüdür. Nane bahçelerde kolayca yetiştirilebildiği gibi tarımı da özellikle ülkemizde Gaziantep yöresinde yapılır. Kurutulmuş yaprakları bütün ya da kaba toz edilmiş halde satılır ve bu şekilde de kullanılır. Bu türün uçucu yağında bulunan ana bileşik *R*-(-)-karvondur. Bu bileşiğin *S*(+) formu dereotu (*Anethum graveolens*) ve keraviye (*Carum carvi*) meyve yağlarında bulunur ve daha farklı kokuya sahiptir. İngiliz Farmakopesi'ne göre uçucu yağdaki *R*-(-)-karvon miktarı %55'ten az olmamalıdır (Başer, 2006). *R*-(-)-karvonca zengin kemotipler ekonomik öneme ve çok yönlü kullanıma sahiptir (Özdemir, 2010). Bahçe nanesi uçucu yağının ratlarda yapılan çalışmalarda LD₅₀ toksik dozunun >5 g/kg olduğu belirlenmiştir. Aromaterapide inhalasyonla bulantı ve kusmaya karşı, haricen kas krampları ve baş ağrısında kullanılan *M. spicata* uçucu yağı ciltte ve mukoza dokusunda hafif hassasiyete sebep olabilmektedir (Tisserand, 2004).



Şekil 2.1. *Mentha spicata* subsp. *spicata* uçucu yağı ana bileşenleri

M. spicata alt türlerine ait tayin anahtarı aşağıdaki gibidir (Davis, 1982).

1. Gövde yaprakları tabanda geniş, alt tarafında yeşil ve tüysüzden kaba gri-yeşil, gri-kılsı çıkıntı değişen şekillerde tüylü; tüyler sert kurduğunda kıvrılmaz (keçe gibi görünmez), spika alt kısımda kesintili, az dallanmış biçimde olduğunda *spicata*,

2. Bitki tüysüz veya tüylü, kenarları yassı ve alt tarafında başlıca basit tüylü, gövde yaprakları 35-75 mm uzunluğunda ve genellikle genişliği 12 mm'nin üstünde, spika 40-80 (-110) mm, alt kısımda kesintili biçimde olduğunda subsp. *spicata*,

3. 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 biçimde olduğunda subsp. *tomentosa* olarak isimlendirilirler.

M. spicata subsp. *spicata* 'ya Anadolu'da farklı isimler verilmiştir (Görsel 2.2). Aydın yöresinde nane, Balıkesir'de eşek nanesi, kurbağa nanesi, su nanesi, Çanakkale'de dere nanesi, Giresun'da anuk, nane, Isparta'da yarpuz, Trabzon'da nane olarak bilinmektedir (Tuzlacı, 2006). *M. spicata* subsp. *spicata* türünün Türkiye'deki yayılış alanları Görsel 2.3'de gösterilmiştir.

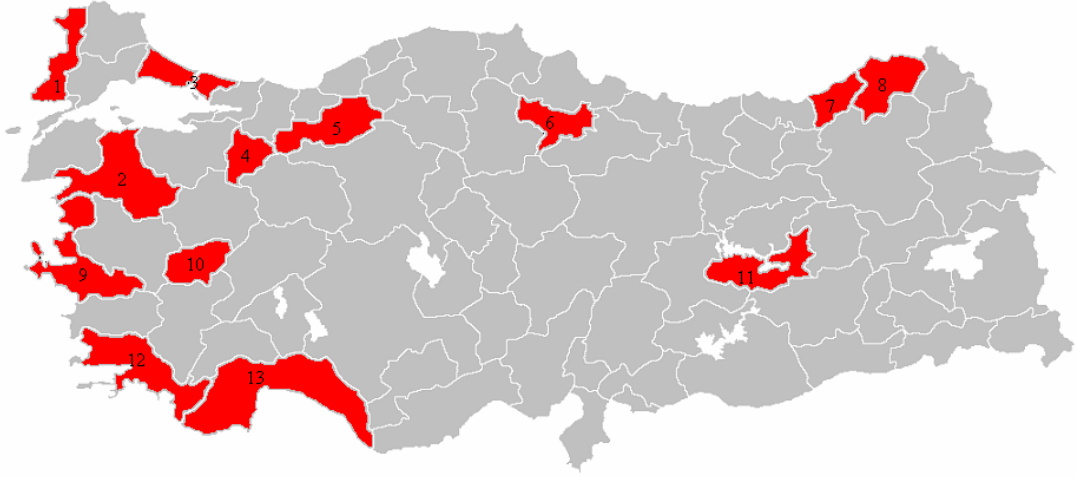
Çiçeklenme zamanı Haziran - Eylül ayları arasındadır. Göl ve nehir kıyılarındaki nemli alanlarda, hendeklerde, deniz seviyesinden 2200 metre yüksekliğe kadar yayılış göstermektedirler (Aydın, 2012).



Görsel 2.2. *Mentha spicata subsp. spicata* ([http 1](#))



Görsel 2.3. *Mentha spicata subsp. spicata* kültürü ([http 2](#))



Görsel 2.4. *Mentha spicata subsp. spicata*'nın Türkiye'deki yayılış alanları

1: Edirne; 2: Balıkesir; 3: İstanbul; 4: Bilecik; 5: Bolu; 6: Tokat; 7: Rize; 8: Artvin; 9: İzmir; 10: Uşak; 11: Elazığ; 12: Muğla; 13: Antalya (Yetişen, 2011)

Tablo 2.4. *Mentha spicata subsp. spicata*'da yapılan bazı uçucu yağ analiz çalışmaları (Lawrence, 2007)

No	Saptanan ana bileşenler
1.	Karvone (% 67.3–80.0)
2.	Karvone (% 40.1) Neodihidrokarveol (% 16.5) Dihidrokarvil asetat (% 10.8) Dihidrokarveol (% 10.1)
3.	<i>cis</i> -Dihidrokarvon (% 21.6) <i>trans</i> -Dihidrokarvon (% 21.2)
4.	Dihidrokarvil asetat (% 24.8) Neoizodihidrokarvil asetat (% 20.9) Karvon (% 20.4)
5.	Karvon (% 35.2) Dihidrokarvon (% 21.5) Dihidrokarvil asetat (% 12.3)
6.	Karvon (% 68.0) 1,8-Sineol (% 16.0)
7.	Dihidrokarveol (% 34.8) Karvon (% 33.4) <i>cis</i> -Dihidrokarvon (% 11.4)
8.	Dihidrokarveol (% 37.8) <i>cis</i> -Dihidrokarvon (% 32.0)
9.	Karvon (% 22.4) Linalol (% 11.3)

2.6. *Mentha spicata*'nın Tıbbi Amaçlarla ve Gıda Olarak Kullanımı

M. spicata (Bahçe Nanesi) halk tarafından en çok kullanıma sahip olan ve en iyi bilinen baharatlardan biridir. Baharat olarak kullanılmasının yanında, gaz söktürücü, koku verici ve mide bulantısını önleyici olarak kullanılmaktadır (Baytop, 1984). Tıbbi olarak; dâhilen, safra kanalı ve gastrointestinal sistem kramplarında, irite kolon sendromunda, şişkinlik ve mide gazı gibi sindirim sistemi problemlerinde, oral ve farenjiyal mukoza iltihabında, öksürük ve soğuk algınlığı tedavisinde kullanılmaktadır. Haricen, inhalasyon yoluyla soğuk algınlığına, nevrojjiye, kas kasılmaları ve kramplara karşı kullanılmaktadır (Başer, 2006; Göger, 2013; Büyükbayraktar, 2014; Ellialtıoğlu vd., 2007).

M. spicata uçucu yağı, koku özelliği ve biyolojik etkileri ile gıda, içki, parfümeri, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan ticari bir uçucu yağdır (Başer, 1997; Dualı, 2010). Diş macunları ve cikletlere koku verici olarak kullanılmaktadır (http:2).

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 enflamasyon durumlarında kullanıldığını belirtilmiştir (Guedon ve Pasquier, 1994; Olennikov ve Tankhaeva., 2010; Deans, 2007; Padmini vd., 2010). Zehirler için panzehir özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur. İnflamasyon, ateş, bronşit, infantil sıkıntılar, gebelikte kusma ve histeri için de kullanıldığını dair bilgiler mevcuttur (Akdoğan vd., 2007; Öztürk vd., 2002).

Nane, antifungal, antiviral, antimikrobiyal, insektisit, antioksidan, alerjenik, diüretik ve uyarıcı olarak kullanılır. Ateş, bronşit, soğuk algınlığı, kramp, gastrit, baş ağrısı, hazımsızlık ve bulantı tedavisinde kullanılır (Almeida vd., 2012). *M. spicata* subs. *spicata* Türkiye'de geleneksel tedavide astımda kullanılan bitkiler arasındadır (Melikoğlu vd., 2015). *M. spicata* uçucu yağlarının, egzersiz performansı ve solunum fonksiyon parametreleri üzerindeki etkinliği bulunmuştur (Jaradat vd., 2016).

M. spicata uçucu yağı, aromatik bir preparat olarak kullanılır. Belirlenmiş terapötik dozajların uygun şekilde uygulanmasıyla herhangi bir sağlık tehlikesi veya

yan etkisi bilinmemektedir. Uçucu yağ, mentol ve *L*-karvon içeriğiyle zayıflatma potansiyeline sahiptir (PDR, 2013).

2.7. *Mentha spicata* Uçucu Yağları ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Günümüzde tıbbi bitkilerin ve bu bitkilerden sentezlenen uçucu yağların saf olarak kullanılması ve özellikle etkin maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi, hem ekonomik hem de bilimsel açıdan oldukça önemlidir. Elde edilen sonuçlar, bu bitkilerin uçucu yağlarının antimikrobiyal özellik taşıdığını kanıtlamaktadır. Uçucu yağ ve bileşenlerinin farmakolojik özellikleri de incelenerek tıp, endüstri ve kozmetik sektörlerinde kullanılmasının faydalı olabileceği belirtilmektedir (Köse, 2010).

Nane uçucu yağının bazı bakteri türleri üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Pek çok araştırmacı değişik türdeki nanelerden sentezlenen yağların antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde çalışmaları yapmış, bu çalışmalar yağların antimikrobiyal aktiviteleri ve kimyasal bileşimiyle arasında sıkı bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır (Ertürk, 2010).

M. spicata üzerinde biyolojik çalışmaların yürütülebilmesi amacıyla bitkinin toprak üstü kısımları, su ve dietil eter ile ekstraksiyona tabi tutulmuş, araştırmada 180–240 g ağırlığında, 2–3 aylık, 50 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanılmış, sıçanlar 5 gruba ayrılarak belirli aralıklarla ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Deney sonucunda *M. spicata*'nın ekstreleri ve kuru tozunun hayvan yemlerine katılmasının besleyici özellik katabileceği; ancak proteinlere, DNA'ya ve membran lipidlerine vereceği doğal oksidasyon reaksiyonlarının zararlı etkilerine karşı koruyucu etki sağlayamayacağı, dolayısıyla da antioksidan güce etkisinin az olduğu bildirilmiştir (Özdemir ve Sözbilir, 2016). Nananin antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı ve serbest radikal üretiminin arttığı durumlarda, fitokimyasal ve yardımcı tedavi desteği olarak vücuda destek olabileceği düşünülmektedir (Özdemir, 2010).

M. spicata'nın antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri için ekstrelerinin bileşimleri değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivite, antioksidan aktivite indeksi ile belirlenmiş ve antimikrobiyal aktivite, difüzyon yöntemi ile ve *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*'ye karşı minimum inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Metanollü ekstre, toplam fenolik bileşiklerin ve daha güçlü antioksidan aktivitenin daha yüksek olduğunu gösterirken, sadece uçucu yağı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Nane uçucu yağı *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı kuvvetli bir etki göstermiştir (Scherer, 2013).

M. spicata uçucu yağında yüksek miktarda bulunan terpenler *R*-(-)-karvon ve limonen (*S*)-(-)-izomerlerini içerdiğini ve *R*-(-)-karvon izomerinin antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle *Microsporum gypseum* türüne yüksek derecede etkili olduğu, antibakteriyel özelliğinin ise *Streptococcus mutans*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* üzerinde Kanamisin antibiyotigininkine yakın olduğu bildirilmiştir. Limonenin ise düşük antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Yetişen, 2011).

Polikistik over sendromunda hirsutizm, artmış androjen seviyesine bağlı olarak önemli kozmetik ve psikolojik problemlere yol açar. Türkiye'de yapılan son araştırmalar, nane çayının dişi bireylerde hirsutizmde antiandrojenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Grant, 2010).

Nane uçucu yağlarının ve bazı izolatlarının antibakteriyel ve antifungal özellikleri ile kullanıldığını belirtilmektedir (Lawrence, 2007). *M. spicata* ve *Anethum sowa* Roxb'nin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş, hidrodistilasyonla uçucu yağlar elde edilmiştir. *M. spicata* uçucu yağından izole edilmiş bileşiklerin (karvon, limonen) *in vitro* biyoaktivite değerlendirmesi, karvonun optik izomerlerinin, insan patojenik mantar ve bakteri spektrumuna (*Colletotrichum falcatum*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*) karşı aktif olduğunu ortaya çıkarmıştır (Aggarwal vd., 2002).

M. spicata uçucu yağı DPPH radikal süpürücü etki ve β -karoten testlerinde etkili görülmüş fakat *M. piperita*'nın etkisi daha yüksek olduğundan *M. spicata*'nın gıda endüstrisi için kullanımı tasviye edilmiştir (Rasoolia vd., 2008).

M. spicata olarak alınan bitkiler yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış, rozmarinik asit seviyelerinde düşüş gözlenmiştir, rozmarinik asit nanenin antioksidan kapasitesine önemli seviyede katkı sağladığından, yüksek sıcaklık rozmarinik asit seviyesini düşürmüş ve nanenin antioksidan etki seviyesi azalmıştır (Fletcher vd., 2005).

M. spicata uçucu yağı *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* ve *M. nanum* üzerinde ketokanozol ve mikanazolden daha etkili bir ajan olarak bulunmuşlardır (Pandey vd., 2002).

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 rağmen antioksidan aktivitesi daha yüksek olarak bulunmuştur (Malik vd., 2013).

M. spicata'nın dietileter, metanol ve diklorometan ekstraları DPPH radikal süpürücü etki bakımından değerlendirilmiş, sadece dietil eter ekstresinin güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülürken diğer 2 ekstrede sonuçlar zayıf olarak bulunmuştur (Choudhury vd., 2006).

M. spicata'nın hipotalamusa olan oksidatif stresi üzerine araştırmalar oksidatif stresi azalttığını rapor edilmiştir (Kumar vd., 2008).

M. spicata'nın sulu ekstresinin çok güçlü lipit koruyucu ve radikal süpürücü etkisi olduğu gözlenmiştir (Kanatt vd., 2007).

M. spicata'nın Etanol ekstresi, sulu fraksiyonunda antigenotoksik etki gözlenmiştir. Bununla beraber fareler üzerinde yapılan *in vivo* deneylerde antioksidan enzim seviyelerinde artış görülmüştür (Arumugam ve Ramesh, 2009).

M. spicata uçucu yağı, serbest radikal süpürme yeteneği ile linoleik asit oksidasyonu inhibisyonu yaparak iyi bir antioksidan aktivite göstermiştir. Nane yağının ve başlıca bileşenlerinin (*cis*-karveol ve L-karvon) antimikrobiyal aktivitesini, dört farklı bakteri türüne karşı disk difüzyonu ve minimum inhibitör konsantrasyonunu araştırmak için MİK testleri yapılmıştır: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, ve *Pasturella multocida* ve beş patojenik mantar: *Rhizopus solani*, *Mucor mucedo*, *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae* ve *Fusarium solani*'ye karşı *cis*-karveol ve karvon, 13.5–30.0 mm ve 17.5-24.9 mm inhibisyon bölgeleri ve sırasıyla MİK değerleri 0.10–0.52 mg/mL ve 0.16-0.33 mg/mL'de iyi antibakteriyel aktivite sergilemişlerdir. Test edilen tüm mikroorganizmalar, nane yağının antimikrobiyal etkisinden güçlü bir şekilde etkilenmiştir (Hussain vd., 2010).

Nane uçucu yağları ile jojoba, kayısı ve badem taşıyıcı yağlarından oluşan %1,5' lik karışımla gerçekleştirilen aromaterapi uygulamasında hastaların depresyon, ağrı ve yorgunluk seviyelerini anlamlı şekilde azalttığı bulunmuştur (Gök Metin ve Özdemir, 2016).

Aromaterapinin hemodiyaliz hastalarında görülen kaşıntı üzerine etkisini tespit etmek amacıyla 24 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada; nane, çay ağacı ve lavanta yağlarını karıştırmış, tatlı badem yağı ile dilüe ederek %5'lik bir solüsyon hazırlamışlardır. Çalışmada iki hafta boyunca devam eden aromaterapi uygulaması sonunda deney grubunda bulunan hastaların kaşıntılarının azaldığı ve aradaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğunu saptamışlardır (Shahgholian ve Dehghan, 2010).

Nane uçucu yağı inhalasyonuna maruz bırakılan sıçanların sinüs mukozasında 1,8-sineol temel bileşenlerden biri olarak tespit edilmiştir. Nane uçucu yağının inhalasyon yolu ile kullanımında sinüs mukozasına ulaşım miktarının araştırılmasını yapılan bu çalışmada, inhalasyon yolu ile kullanıldığında, uçucu yağın, sinüs mukozasına ulaştığı gösterilmiştir. Yıllardır tedavi alanında güvenle kullanılan ilaçlara benzer şekilde, antienfektif, antioksidan ve antiallerjik etkinliği göstermiştir (Töre, 2016).

Karvon ve anetolün nanopartiküller üzerinde etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada, nanoparçacıklar, emülsiyon çözücü buharlaştırma ve nanopresipitasyon yöntemleri kullanılarak hazırlanmış, nanopresipitasyon yöntemi daha küçük boyutlu nanopartiküller (sırasıyla anetol ve karvon için 158 ve 126 nm), daha dar boyut dağılımı (0,08-0,2 PDI), daha yüksek ilaç yüklemesi (sırasıyla anetol ve karvon için % 14,73 ve % 12,32) olarak başlatılmıştır. İlaç salınımı çalışmaları, in vitro 37 ° C'de 4 gün süreyle karvon ve 9 gün anetol için yapılmıştır. Mikrobiyal analizde, *Salmonella typhi*'ye karşı anetol yüklü nanopartiküllerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 227 mg / mL idi ve karvon yüklü nanopartiküllerin MİK'si sırasıyla *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus coli*'ye karşı 182-374 mg / mL idi. Antimikrobiyal çalışmalar, uçucu yağ yüklü PLGA nanopartiküllerin biyomedikal ve gıda uygulamalarında yararlı olabileceğini düşündürmektedir (Manesh vd., 2013).

Yapılan bir çalışmada; karvonun aktivitesi göz önüne alındığında (+)- ve (-)-karvon, (+) - ve (-)-hidroksidihidrokarvon ve a, p-epoksikarbonun sitotoksik, kemopreventif ve antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesini amaçlamıştır. (+)-Hidroksi dihidrokarbon (HC+), (-)-hidroksidihidrokarvon (HC-) ve a, p-epoksikarbon (EP) sentezi; öncü madde olarak (+) – karvon (C +) veya (-) – karvon (C -) kullanılarak elde edilmiştir. Antifungal aktivitesi *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. albicans* ve *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesine karşı değerlendirilmiştir. Sitotoksikite deneyleri, insan kanser çizgili hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları, tümör ve normal hücre çizgileri üzerinde sitotoksikite göstermemiştir. Tüm bileşikler *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'e karşı zayıf antifungal aktivite göstermiştir. EP ve C +, *C. krusei*'ye karşı orta derecede aktivite göstermiştir. Sonuçlar, karvonların potansiyel kullanımını göstermektedir. Hücre soylarında sitotoksikitenin olmaması, bu bileşiklerin kullanımının güvenliği göstermektedir (Moro vd., 2017).

2.8. Farmakope ve Monograf Kavramı

Farmakope, İlaç üretiminde kullanılan etkin ve tüm yardımcı maddelerin fizikokimyasal özellikleriyle bunların nitel ve nicel analiz yöntemlerinin yer aldığı, yasal ve bilimsel olarak uyulması gereken ulusal ve uluslararası kuralları ve yöntemleri içeren dokümandır. Monograflar ise kimyasal/biyolojik etkin ve yardımcı maddeler, bitkisel droglar ve bitkisel preparatlar ile bitmiş ürünlerin tanımını, içeriğini, özelliklerini (görünüm, çözünürlük, erime ve kaynama noktası gibi) tanıma-teşhis analizlerini, miktar tayinini, ambalajlama ve saklama koşullarını, safsızlıklarını tanımlayan farmakope bölümüdür (http:3).

2.9. Türk Farmakope Tarihçesi

Osmanlı İmparatorluğu Döneminde 6 adet Kodeks ve eş değeri doküman ile 8 adet kitabın yayımlandığı bilinmektedir.

1. Pharmacopoeia Geniki (Genel Farmakope): Türkiye'deki ilk basılı kodeksin Osmanlı İmparatorluğu döneminde 1818 yılında Farmakopii Genike (Genel Farmakope) adıyla İstanbul'da yayımlandığı bilinmektedir.

2. Pharmacopoeia Castrensis Ottomana/Pharmacopoe Militaire Ottomane (Osmanlı Askeri Farmakopesi): Osmanlı Askeri Tıp ve Eczacılık Okulu Müdürü Dr. Karl Ambros (Charles Ambroise) Bernard tarafından, Avusturya Askeri Kodeksinden çevrilerek uyarlanan farmakopenin Latince ve Fransızca olarak yazıldığı, dipnotların İtalyanca verildiği, madde isimlerinin Latin karakterleri ile Türkçe gösterildiği bilinmektedir.

3. Vade Mecum Tascabile di Materia Medica e Farmaceutica: Osmanlı İmparatorluğu döneminde Dr. Gio. Spagnolo tarafından yazılmış ve 1859 yılında İstanbul'da "Vade Mecum Tascabile di Materia Medica e Farmaceutica" adıyla basılmıştır.

4. Dustur'ul Edviye: Dustur'ul Edviye Osmanlı İmparatorluğu Döneminde Dr. Hüseyin Sabri tarafından Fransız Farmakopesi-1866'dan Osmanlı Türkçesiyle çeviri yapılarak 544 sayfa olarak hazırlanan doküman 1874 yılında İstanbul'da basılmıştır

5. Annuaire Oriental de Medecine et de Pharmacie: Annuaire Oriental de Medecine et de Pharmacie, Osmanlı İmparatorluğu Döneminde Pierre Apery tarafından yazılan doküman 1892 yılında İstanbul'da Fransızca, üç bölümden oluşmuş ve 440 sayfa olarak basılmıştır.

6. Guide Complet pour les Pharmaciens Civils et Militaires: Guide Complet pour les Pharmaciens Civils et Militaires, Osmanlı İmparatorluğu Döneminde Askeri Müfettiş olan Mehmet Süleyman tarafından Osmanlı Türkçesiyle 224 sayfa olarak hazırlanarak 1912 yılında basılmıştır (Özkan, 2016).

2.10. Türk Farmakopesi

Türkiye Cumhuriyeti'nin 29 Ekim 1923'te kurulmasından üç yıl sonra 17 Mart 1926 tarihinde Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren 767 sayılı Türk Kodeksi Hakkında Kanun ve 663 sayılı Kanun Hükmünde Kararname kapsamında hazırlanan Kodeks ve Farmakopeler incelendiğinde;

- Türk Kodeksi 1930,
- Türk Kodeksi 1940,
- Türk Kodeksi 1948,
- Türk Kodeksi 1954,
- Türk Farmakopesi 1974,
- Türk Farmakopesi-I, Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu 2004 ve
- Türk Farmakopesi-II, Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu 2016 yılında yayımlanmıştır (Özkan, 2016).

2.11. Avrupa Farmakopesi

Günümüzde insan sağlığında kullanılacak olan ilaç hammaddelerinin ve ilaçların dünya çapında standardını belirlemek üzere resmi bir otorite kurulması zorunlu hale getirilmiştir. Bu amaçtan yola çıkılarak 1964 yılında Avrupa Konseyi, Avrupa Farmakopesi'ni kurmuştur. Avrupa Farmakopesi'nin amacı, insan sağlığında ve veteriner hekimlikte kullanılacak maddeler için ortak kalite standartları belirlemektir. Avrupa Farmakopesi Detaylandırılması Sözleşmesi 1964 yılında Avrupa Konseyi tarafından kabul edilmiş ve Avrupa Farmakopesi'nin Avrupa'da üretilen ilaçların kalitesini güvence altına alması için temeller atılmıştır (Saltan İşcan, 2016).

Avrupa Farmakopesi, Avrupa ve ötesinde yüksek kalitede ilaçların verilmesine katkıda bulunan farmakolojik standartlar için Avrupa'nın yasal ve bilimsel bir ölçütüdür. Ph Eur. 38 Avrupa ülkesinde geçerlidir ve dünya çapında 100'den fazla ülkede yaygın olarak kullanılmaktadır. 9. baskısı 2016 ortalarında piyasaya sürülmüş, 2017'de uygulamaya konmuştur. 121 yeni ve 1.403 tekrar gözden geçirilmiş metinle, 9.

baskısına ait içeriğin %50'den fazlası, 8. baskıya kıyasla yenidir (9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5) ve İngilizce ya da Fransızca olarak da baskısı mevcuttur. 9. baskı, 3 giriş cildinden (9.0) oluşmaktadır ve 8 adet kümülatif olmayan eklerle tamamlanır (9.1 ila 9.8). 9. Baskı (Ek 9.5 dâhil) 2376 monograf (dozaj formları dâhil), 361 genel metin (genel monograf ve analiz yöntemleri dâhil) ve yaklaşık 2690 reaktif tanımını içermektedir (http-4).

Çalışmamızda *M. spicata* subsp. *spicata*'nın farklı yörelerden kültürü yapılan ve ticari olarak piyasaya sunulmuş örneklerinden temin edilmiş, ülkemizin resmi farmakopesi olan Avrupa Farmakopesi'nde uçucu yağ taşıyan bitkisel drog monografı için istenen analizlerden oluşan bir monografi hazırlanmıştır. Avrupa Farmakopesi 8.0'da yer alan "*M. piperita*" monografında yer alan testler uygulanmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu bölümde deneysel çalışmalarda kullanılan bitkisel materyaller ve kaynakları, standart bileşenler, cihazlar, apareyler, kimyasal maddeler, çözücüler, reaktifler, gereçler ve yöntemler detaylı olarak sunulmuştur.

3.1. Bitkisel Materyal

Türkiye'nin farklı bölgelerinden temin edilen 10 adet bahçe nanesi bitkisinin kaynağı ve materyal tiplerine ait bilgiler, çalışılan materyallere ait fotoğraflar görselde verilmiştir. Ambalajlı ürünler marketler ve aktarlardan, taze materyaller kültür yapan çiftçiden tarafımızdan temin edilmiştir. Taze temin edilen örnekler gölgede tarafımızdan kurutulmuştur. Tüm haldeki droglar ayıklanarak, yalnızca yaprakları çalışma materyali olarak kullanılmıştır (Tablo 3.1, Görsel 3.1).

Tablo 3.1. *Deneylerde kullanılan droglar ve kaynakları*

Örnek	Durumu/Kaynağı
N1	Ambalajlı kaba toz/Baharat Firması, Nisan, 2017
N2	Ambalajlı kaba toz/Baharat Firması, 2017
N3	*Taze örnek, kültür/Afyon, Haziran 2017
N4	*Taze örnek, kültür/Düzce, Haziran, 2017
N5	*Taze örnek süpermarket/Eskişehir, 2017
N6	*Taze örnek, kültür/Antalya 2017
N7	Açık örnek, Aktar/Isparta, 2017
N8	Ambalajlı kaba toz/ Baharat Firması, İstanbul, 2017
N9	Ambalajlı kaba toz/Baharat Firması, Eskişehir 2016
N10	Açık örnek, Aktar, Gaziantep, 2017

*Taze temin edilen örnekler, laboratuvarında gölgede ve havadar bir ortamda kurutulup, kilitli plastik torbalarda muhafaza edilmiştir.



Görsel 3.1. Test edilen örneklerden bazıları

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Standart Maddeler

Monograf hazırlama çalışmalarında kullanılan kimyasal madde ve çözücüler ile bunların marka ve saflık dereceleri Tablo 3.2’de listelenmiştir. Tablo 3.2’de yer alan çözücüler standart maddelerin çözülmesinde, örnek hazırlamada, ekstraksiyonda, reaktiflerin hazırlanmasında ve İTK mobil faz hazırlanmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Deneylerde Kullanılan Çözücü/Kimyasal Maddeler ve Saflıkları

Çözücü/Kimyasal Madde	Marka/Saflık
1,8-Sineol (MA:154)	Aldrich ($\geq\%98$)
Anisaldehit	Merck ($\geq\%98$)
Aseton	Panreac (Ph. Eur. Grade)
Diklorometan	Aldrich ($\geq\%99$)
Etanol	Merck (Ph. Eur. grade)
Etil asetat	Merck ($\geq\%99$)
Etil Asetat	Merck ($\geq\%98$)
Glasiyal asetik asit	Carlo Erba (Ph. Eur. Grade)
Hidroklorik asit	Carlo Erba (Ph. Eur. grade)
Kloralhidrat	Merck (Ph. Eur. Grade)
Limonen (MA:136)	Aldrich ($\geq\%99$)
Metanol	J.T. Baker (HPLC grade)
<i>n</i> -hekzan	Aldrich ($\geq\%95$)
<i>R</i> -(-)-karvon (MA:150)	Aldrich ($\geq\%98$)
Sülfürik Asit	Carlo Erba (Ph. Eur. Grade)
Toluen	Merck (Ph. Eur. grade)
Vanilin	Merck ($\geq\%99$)

3.3. Kullanılan Kimyasal Reaktifler

Tüm reaktifler Avrupa Farmakopesi 8.0'de tarif edilen şekilde hazırlanarak kullanılmıştır.

Anisaldehit R.: 0.5 mL anisaldehit çözeltisi, 10 ml glasiyel asetik asit, 85 ml metanol ve 5 mL sülfürik asit çözeltileri sırası ile karıştırılarak hazırlanır.

Vanilin sülfürik asit reaktifi: %1 lik etanolik vanilin çözeltisine 1,5 ml derişik sülfürik asit ilave edilerek hazırlanmıştır.

Kloralhidrat R.: 80 g kloralhidrat, 20 ml distile su içinde ultrasonik banyoda çözülerek hazırlanmıştır.

HCl R. Çözeltisi: 70 g HCl ($d_{HCl}=1,19$ g / ml =>70 g HCl= 58,8 ml) distile su ile 100 ml'ye seyreltilir.

3.4. Kullanılan Cihaz ve Apeyler

Deneylerde kullanılan cihaz ve apareylere ait bilgiler Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Deneyler kullanılan cihaz/aparey ve markaları

Kullanılan Cihaz/Aparey	Marka
Volumetrik Su Miktar Tayini Apareyi	İldam
Clevenger apareyi	İldam
Gaz kromatografisi/Alev iyonlaşma dedektörü	Shimadzu GC 2010
Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi	Shimadzu QP-2010
UV Lambası	Camag
Vortex	IKA
Kül Fırını	Nabertherm
Isıtıcıli manyetik karıştırıcı	Heidolph
Işık mikroskobu (kamera entegre)	Leica DM750
Etüv	3M

3.5. Deneysel Çalışmalar ve Yöntemler

3.5.1. Mikroskopik inceleme

Toz haline getirilen örnekler, kloralhidrat reaktifi kullanılarak, bek alevinde buharı solunmadan dikkatlice kaynatılmış, soğuduktan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mikroskopik görüntüler Leica DM750 binoküler ışık mikroskobuna entegre ICC50 HD kamera ile kaydedilmiştir. İncelemede toz dogların mikroskopik ayrımında önemli karakterler olan örtü tüyleri, salgı tüyleri, diasitik stoma ve yaprağa ait diğer önemli kısımlar dikkate alınmıştır. Bazı yapıların büyüklükleri, mikrometrik lam ve görüntüleme programının ölçüm özelliğinden faydalanılarak ölçülmüş, fotoğraflara ölçek yerleştirilmiştir.

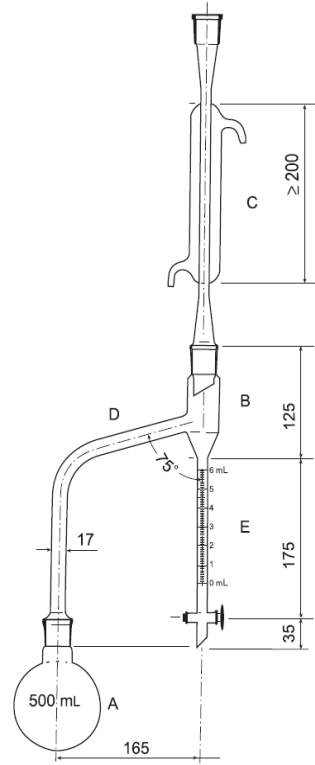
3.5.2. Su miktar tayini

500 ml'lik distilasyon balonuna 200 ml toluen R ve 2 ml su R konulmuştur. Balon üzerine su distilasyon apareyi (Görsel 3.2) kurulmuş ve ısıtma başlatılmıştır. İşleme, dereceli kısımda su miktarında artış olmayana kadar, 60-90 dk boyunca devam edilmiştir. Süre sonunda aparey soğumaya bırakılmıştır. Dereceli kısımdan toluenin absorbe etmediği su miktarı okunmuştur (a). Daha sonra, su miktar tayini yapılacak olan drogtan 10 g tartılarak, aynı distilasyon balonu içerisine yüklenmiş ve işlem başlatılmıştır. Apareyin dereceli kısmında biriken su miktarında değişme olmayıncaya kadar işleme devam edilmiştir. İşlem tamamlanınca sistem soğutulmuş ve dereceli kısımda biriken toplam su miktarı okunmuştur (b). Okunan miktardan ilk işlemde elde edilen su miktarı çıkartılmıştır. Elde edilen sonuç üzerinden 100 g droğun taşımış olduğu su miktarı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Su Miktarı } = [(b-a)/10] \times 100 \quad (3.1)$$

a: birinci distilasyonda elde edilen suyun milimetre cinsinden miktarı

b: İkinci distilasyonda elde edilen toplam suyun milimetre cinsinden miktarı



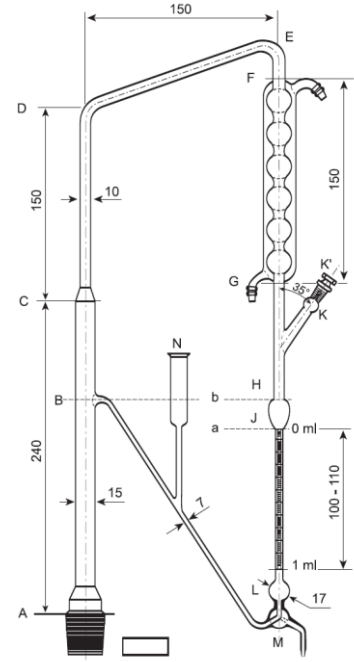
Görsel 3.2. Avrupa Farmakopesi'nde tanımlanan volumetrik su miktar tayini apareyi

3.5.3. Yabancı madde miktar tayini

İncelenecek materyalden 50 g tartılmış, ince bir tabaka halinde zemin üzerine yayılmıştır. Yabancı madde çıplak göz ile incelenmiştir. Yabancı maddeler ayrılmış, tartılıp yüzdesi hesaplanmıştır.

3.5.4. Uçucu yağ miktar tayini

Bitkisel materyalden uçucu yağ eldesi amacı ile laboratuvar ölçekte Clevenger apareyinde (Görsel 3.3) 50 g toz haline getirilmiş kuru drog 2 L'lik balona doldurulduktan sonra üzerine 1000 ml distile su ilave edilmiştir. 3 saat süre ile distilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda apareyin soğuması beklenmiştir. Apareyin uçucu yağın toplandığı ölçekli kısımdan miktarı ml cinsinden okunmuştur. Buradan yüzde uçucu yağ miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen uçucu yağlar çeşitli analiz işlemleri için +4 °C buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Görsel 3.3. Clevenger aпараты (Avrupa Farmakopesinde tarif edilen)

3.5.5. Bütün kül

İlk olarak temizlenmiş olan krozeler, 600°C kül fırınında 1 saat beletildikten sonra desikatörde sabit tartıma gelmesi sağlanmıştır. Krozelerin darası alınmıştır. Krozelere, kül miktarı tayin edilecek droglardan 1'er g tam tartım alınmıştır. Numuneler, kül fırınına konulunca alevlenme meydana gelmemesi için, 100-105°C sıcaklıktaki etüvde 1 saat beletilmiştir. Süre sonunda numuneler 600°C ($\pm 25^\circ\text{C}$)'ye ayarlanmış kül fırınında tutulmuştur (Numunelerde deneme sonunda siyah partiküller gözlenmediğinde işlemlere son verilir). Buradan desikatöre alınan numuneler, sabit tartıma getirilmiştir. Tartım alınmıştır. Son tartımdan boş krozenin darası çıkartılmış ve elde edilen kül miktarı üzerinden yüzde hesaba geçilmiştir.

3.5.6. Asitte erimeyen kül miktar tayini

Bütün kül işleminden çıkmış kül üzerinden yapılmaktadır. Bütün külden elde edilen kül üzerine 15 ml distile su ve 10 ml HCl R eklenmiştir. Bek alevinde, karıştırılarak 10 dk yavaşça kaynatılmıştır. Çözelti soğuduktan sonra kül bırakmayan filtre kâğıdından süzölmüştür. Filtre kağıdı, turnusol kağıdı nötr renk alana dek sıcak distile su ile yıkanmıştır. Nötralizasyon tamamlandıktan sonra filtre kâğıdı uygun şekilde katlanmıştır. Kroze içinde 100-105°C etüvde 1 saat kurumaya bırakıldıktan sonra 600°C ($\pm 25^\circ\text{C}$)'ye ayarlanmış kül fırınında 3 saat tutulmuştur. Desikatörde

soğumaya bırakılan küller sabit tartıma getirilmiştir. Elde edilen miktar üzerinden yüzde hesabına geçilmiştir.

3.5.7. İnce tabaka kromatografisi

Bu deneyde öncelikle Avrupa Farmakopesi 8.0'da yer alan “*Tıbbi Nane Yaprağı*” monografında yer alan İTK koşulları denenmiştir. Ayrıca distilasyon ile uçucu yağ veriminin belirlenmesi deneyinden elde edilen uçucu yağ örnekleri de kullanılarak İTK profili ayrıca ortaya konmuştur.

Çalışmalarda tümü Merck marka Silikagel F₂₅₄, Diol ve HPTLC plak kullanılmıştır. 10 x 10 cm ebadında kesilmiş plaklar ve hazır cam plaklar (10x10) 1 saat süreyle 100°C'ye getirilmiş etüvde aktive edilerek kullanılmıştır. Developpe işlemine geçmeden önce süzgeç kâğıdı cam kromatografi tankına yerleştirilmiştir. Tanka hazırlanan mobil faz ilave edilmiştir. En iyi çözücü sistemini belirlemek için 9 farklı mobil faz denenmiştir (Tablo 3.4). Test çözeltileri 0,2 g toz haline getirilmiş drog üzerine 2 ml *diklorometan* ilave edilip 5 dk çalkalanarak flakonlara adi süzgeç kâğıdından süzülerek hazırlanmıştır. Uçucu yağ çözeltisi ise 40 µl uçucu yağ 1 ml *n*-hekzan ile çözülmüştür. Şahit çözelti 40 µl *R*-(-)-karvon, 80 µl 1,8-sineol, 200 µl limonen ve 10 ml *n*-hekzan R'de çözümlenerek hazırlanmıştır. Plaklara test çözeltisinden 10 µl, şahit çözeltiden 10 µl yuvarlak leke halinde uygulanmıştır. Tank çözücü sistemi ile doyduktan sonra developpe işlemine başlanmıştır. İşlem bittikten sonra tanktan çıkarılan İTK plakları oda sıcaklığında kurutulup ilk önce UV lamba altında gözlenebilen lekeler işaretlenmiştir.

Plakların üzerine çeker ocak altında taze hazırlanmış olan uygun reaktifler püskürtülmüş ve gerekli ise manyetik ısıtıcıda 100-105°C'de ısıtılarak renklenmesi sağlanmıştır. 4 farklı reaktif kullanılarak (Anisaldehit reaktifi, Vanilin sülfirik asit reaktifi, iyot R) en uygun olanı belirlenmiştir.

Kromatogramda test çözeltisi ile elde edilen ana leke, referans çözeltisi ile elde edilen leke ile görsel olarak, her iki lekenin rengi, boyutları ve tutunma faktörü (R_f)'ne göre karşılaştırma yapılmıştır.

Tablo 3.4. İTK'da kullanılan mobil fazlar

	1. Çözücü	2. Çözücü	Oran
1.	Diklorometan	-	100
2.	Diklorometan	Aseton	90:10
3.	Toluen	Etil Asetat	95:5
4.	<i>n</i> -Hekzan	Etil Asetat	95:5
5.	<i>n</i> -Hekzan	Etil Asetat	90:10
6.	<i>n</i> -Hekzan	Etil Asetat	98:2
7.	Diklorometan	Aseton	95:5
8.	Diklorometan	Aseton	2:1
9.	<i>n</i> -Hekzan	Etil Asetat	1:1

3.5.8. Gaz kromatografisi (GK) ve gaz kromatografisi/ kütle spektrometresi (GK/KS) ile uçucu yağın kimyasal bileşiminin belirlenmesi

10 farklı örnekten elde edilen ve susuz sodyum sülfat ile suyu çekilen uçucu yağlardan 3 mg, 1 ml *n*-hekzanda çözülerek hazırlanan numuneler, GK ve GK/KS sistemleri ile analiz edilmiştir. GK sisteminde AİD dedektörü (FID-Flame Ionization Detector- Alev iyonlaşma dedektörü) ile tespit edilen bileşiklerin integrasyonları yapıldıktan sonra, bağıl yüzdeleri belirlenmiştir. GK/KS sistemi ile bileşenlerin kütle spektrumları alınmıştır. Değerlendirme işlemleri Wiley ve MassFinder Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılarak yapılmıştır. Analiz program ve şartları dâhilinde 10 numuneye ait uçucu yağdaki bileşenler relatif yüzde olarak belirlenmiştir.

3.5.8.1. GK analiz koşulları

Analiz Shimadzu 2010 sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AİD Dedektör sıcaklığı 250°C' dir. GK/KS sistemi ile uyumlu tutunma zamanları elde edilebilmesi için 25 m x 0.25 mm Ø, 0.25 mm film kalınlığında CPSil-5CB kullanılmış ve aşağıda verilen sıcaklık programı uygulanmıştır.

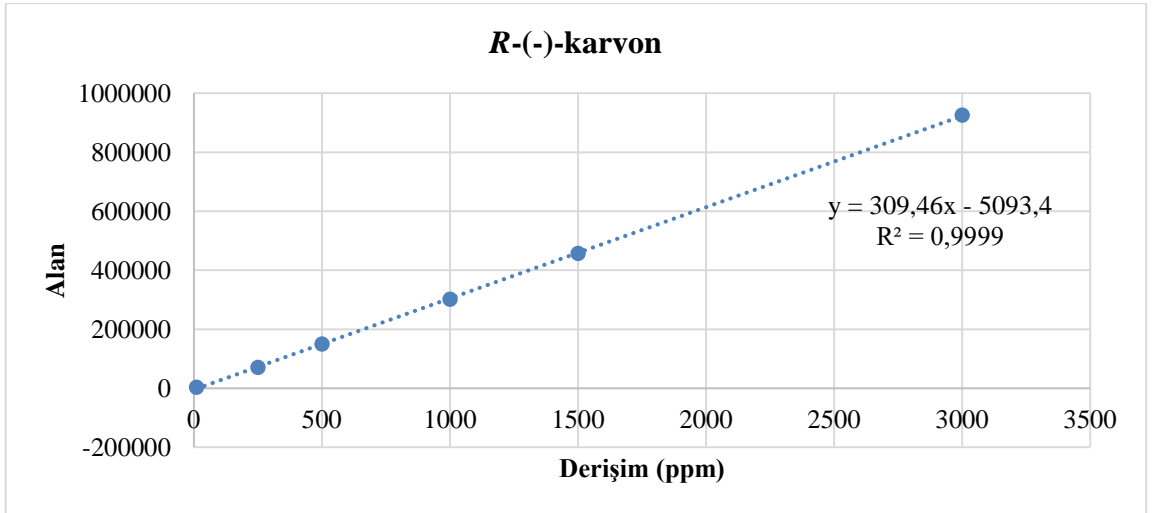
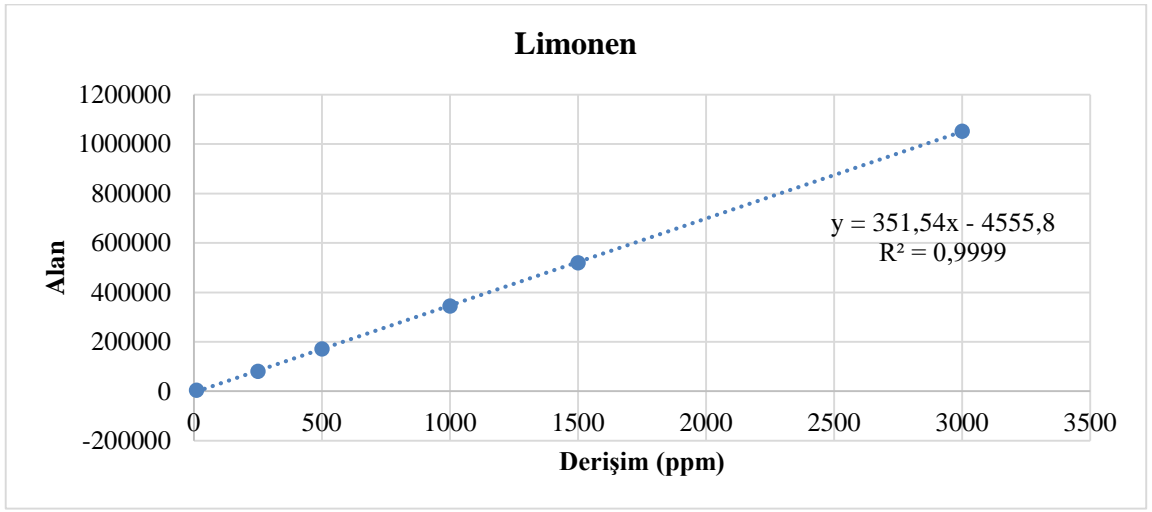
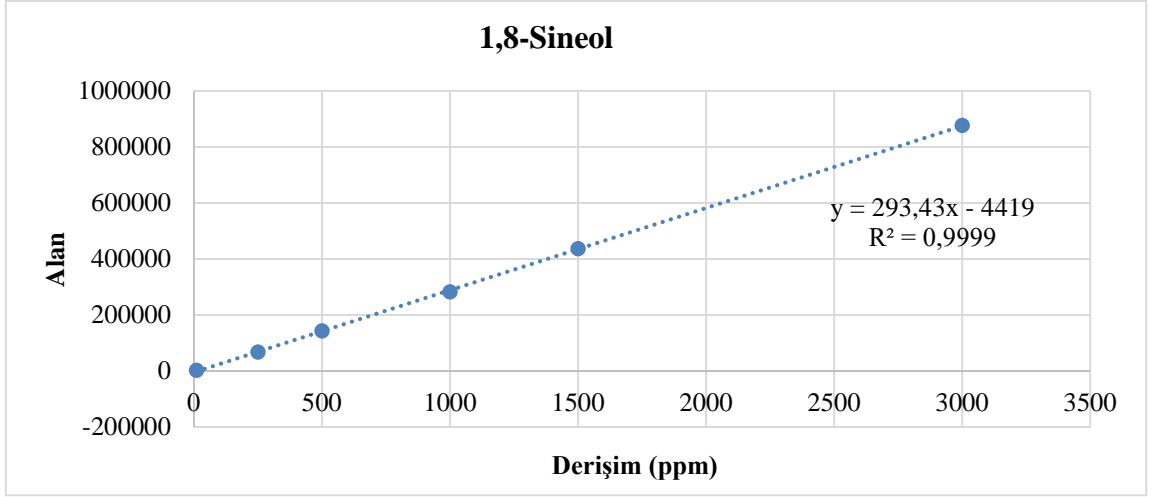
3.5.8.2. GK/KS analiz koşulları

GK/KS analizlerinde Shimadzu QP2010 Plus sistemleri kullanılmıştır. GK sisteminde kullanılan kolonun aynısı ile taşıyıcı gaz akış hızı 1 ml/dak. olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklık programı, 60°C 'de 10 dak, 4°C/dk artışla 260°C'ya çıkarılıp, 260°C 'de 5 dk tutulmuştur. Split oranı 50:1'dir. Enjeksiyon portu sıcaklığı 260°C olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrumları (MS) 70 eV elektron enerjisi uygulanarak ve *m/z* 35-450 kütle aralığında alınmıştır.

3.5.9. Uçucu yağın kantitatif analizi

Çalışmamızda temin edilen analitik saflıkta *R*-(-)-karvon, 1,8-sineol ve limonen için AİD dedektörlü GK kullanılarak kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Uçucu yağların GK/KS ve GK/AİD analizinden elde edilen alan relatif yüzdelerin hesaplandığı kromatogramlar incelenerek en büyük ve en küçük alan değerlerine göre kalibrasyon eğrisinde kullanılacak derişim aralığı 10-3000 ppm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.3).

3 mg/ml'lik konsantrasyondaki numune çözeltileri kullanılmıştır. Cihazın yazılım programı kullanılarak integrasyon sonunda kromatogramda gözlenen standartlara ait piklerin gerçek miktar tayinleri aşağıda verilen alan/derişim grafiklerine göre hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. R-(-)-karvon, 1,8-sineol ve limonen için kalibrasyon eğrileri (10, 50, 500, 1000, 1500, 3000 ppm)

3.5.10. Ekstrenin mikrobiyolojik analizi

Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre “Çay, bitki ve meyve çayları ve bunların karışımları” ile “Baharat, bitki ve/veya bunların karışımları (toz, macun formları, karışımları vb.)” maddelerindeki mikroorganizmaların bir kısmı aranarak, çalışmamız kapsamında baharat olarak temin edilen hazır ambalajlı örneklerin mikrobiyolojik kalitesi ortaya konmuştur. Tüm analizler TEMPO® hazır protokollere göre yapılmıştır. Numunelerden 5'er g tartılarak 45 ml peptonlu suda seyreltilmiştir. Numuneler pedallı homojenizatörde homojenize edilmiştir. Numunelerden TEMPO® (bioMérieux) sisteminin özel filtreli torbasında süzülerek, süzüntüden 1'er ml çekilip 3'er ml peptonlu su eklenip toplamda 1/40 oranında dilüsyonlar hazırlanmıştır. Sistemin kendi kit ve kartlarına solüsyonlar pipetlenerek Tablo 3.5'teki uygulama süreleri ve sıcaklıklar baz alınarak inkübasyona bırakılmıştır.



Görsel 3.4. TEMPO®, QI otomatik sayım sistemi

Tablo 3.5. Ticari örneklere uygulanan mikrobiyolojik analizler ve inkübasyon koşulları

	Maya-Küf	<i>B. cereus</i>	Total Koliform	Koliform	Enterobakter	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
N1	72-76 saat, 24±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 35±1°C	22-27 saat, 35±1°C	24-27 saat, 37±1°C	24-27 saat, 37±1°C
N2	72-76 saat, 24±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 35±1°C	22-27 saat, 35±1°C	24-27 saat, 37±1°C	24-27 saat, 37±1°C
N7	72-76 saat, 24±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 35±1°C	22-27 saat, 35±1°C	24-27 saat, 37±1°C	24-27 saat, 37±1°C
N8	72-76 saat, 24±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 35±1°C	22-27 saat, 35±1°C	24-27 saat, 37±1°C	24-27 saat, 37±1°C
N9	72-76 saat, 24±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 35±1°C	22-27 saat, 35±1°C	24-27 saat, 37±1°C	24-27 saat, 37±1°C
N10	72-76 saat, 24±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 30±1°C	22-27 saat, 35±1°C	22-27 saat, 35±1°C	24-27 saat, 37±1°C	24-27 saat, 37±1°C

3.5.11. Sıvı kromatografisi

Bu deneyde öncelikle Avrupa Farmakopesi 8.0'da yer alan "Tıbbi nane kuru yaprak ekstresi" monografında yer alan, Rozmarinik asit içeriği belirlenmesinde kullanılan sıvı kromatografisi şartları uygulanmıştır. Çalışmada test çözeltisi için; 0,4 g droğa 15 ml etanol (%50) eklenerek, ultrasonik banyoda tutulmuş ve 20 ml'lik balon jöjeye süzölmüştür. Erlen ve süzöntü etanol (%50) R ile yıkanarak aynı çözücüyle 20 ml'ye tamamlanmıştır.

Şahit çözeltili (a) : 5 mg rozmarinik asit, etanol (%50) içinde çözüölür, 50 ml'ye tamamlanır.

Şahit çözeltili (b) : 5 mg ferulik asit şahit çözeltili(a) içinde çözüölür ve aynı çözeltili 50 ml'ye tamamlanır.

Kolon: 0,25 m, 4,6 mm.

Sabit faz: kromatografi için oktadesilsilil silika jel R (5 µm)

Mobil faz (a) için: 5 ml fosforik asit, 95 ml asetonitril, 400 ml distile su ile hazırlandı.

Mobil faz (b) için: 5 ml fosforik asit, 200 ml metanol, 295 ml asetonitril ile hazırlandı.

Zaman (dk)	Hareketli faz A (%h/h)	Hareketli faz B (%h/h)
0-20	100 → 55	0 → 45
20-25	55 → 0	45 → 100
25-30	0 → 100	100 → 0

Akış hızı: 1,2 ml/dk

Tanıma: spektrofotometre, 330 nm.

Uygulama: 20 µl

Ekstrelerdeki rozmarinik asit yüzdesi hesaplamak için aşağıdaki formöl kullanılmıştır.

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 0,2}{A_2 \times m_2}$$

(3.2)

A₁: test çözeltilisi ile elde edilen kromatogramda rozmarinik aside karşı gelen pik alanı

A₂: şahit çözeltili (a) elde edilen kromatogramda rozmarinik aside karşı gelen pik alanı

m₁: test çözeltilisi hazırlamak için kullanılan ekstrenin ağırlığı, g;

m₂: şahit çözeltili (a) hazırlamak için kullanılan rozmarinik asit CRS ağırlığı, g;

p: rozmarinik asit CRS içindeki % rozmarinik asit içeriği.

4. BULGULAR VE YORUMLAR

4.1. Makroskobik İnceleme

Tüm halde veya kırılğan küçük parçalar halinde kaba toz formunda olan örnekler, incelenmeden önce tunç havanda ince toz hale getirilmiştir. Örnekler karakteristik, keskin ve aromatik kokuludur. Örneklerde kahverengimsi-yeşil veya yeşil bazen kahverengimsi-mor damarlar gözlenmiştir.

4.2. Mikroskobik İnceleme

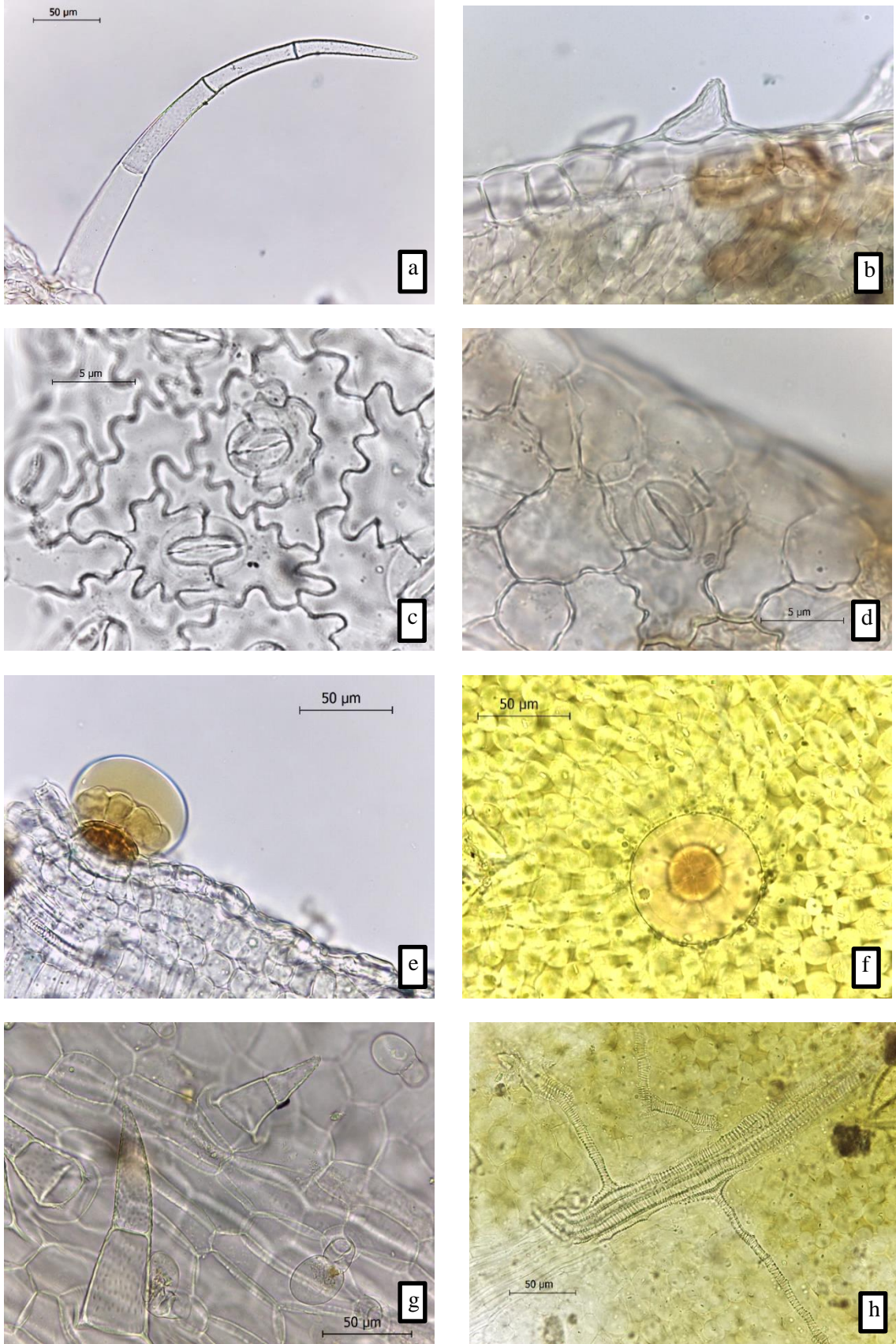
Örneklerin tümü ortak özelliklere sahip olup, farklı morfoloji veya tipte mikroskobik karakteristik parçalara rastlanmamıştır. Kloralhidrat reaktifi ile ısıtılarak hazırlanan preparatlarda yaygın şekilde, kütikulası çizgicikli tek sıralı çok hücreli örtü tüyleri ile tek hücreli diş tüylere rastlanmıştır. Başı ve sapı tek hücreli salgı tüyleri ile 60-70 µm çapında başı sekiz sapı tek hücreli Lamiaceae tipi salgı tüyleri mevcuttur. Diasitik tipteki stomalar yaprağın her iki yüzeyinde de (amfistomatik) mevcuttur. Alt epiderma karakteristik dalgalı duvarlara sahiptir. İletim demetleriyle bir arada bol miktarda palizat parenkiması parçaları mevcuttur (Görsel 4.1).

4.3. Volumetrik Su Miktar Tayini

Yapılan deneyler sonucu elde edilen yüzde su miktarları Tablo 4.1'de verilmiştir. Numunelerde bulunan su miktarları %3 ile %13,86 arasında değişmektedir. Avrupa Farmakopesine göre Tıbbi nane yaprağı monografında olması gereken miktar maksimum %11'dir (110 ml/kg). 2, 5 ve 6-10 no'lu örnekler %11'in altında su taşımaktadır. Tüm verilere ait ortalama değerler tablonun altında verilmiştir. TSE verilerine göre su miktarı maksimum %10 olmalıdır. 1, 3 ve 4 no'lu örnekler bu değer üzerinde.

4.4. Yabancı Madde Miktar Tayini

10 farklı numunede yapılan yabancı madde miktar tayini sonucu elde edilen yüzde değerler Tablo 4.1'de verilmiştir. Yapılan tartımlarda %0,9 ile %1,9 arasında belirlenmiştir. TSE verilerine göre yabancı madde miktarı maksimum %0,1 olmalıdır.



Görsel 4.1. *M. spicata* subsp. *spicata* mikroskobik incelemesi (a, b: örtü tüyü; c, d: Alt ve üst epiderma diasitik stoma; e, f: salgı tüyleri; g: örtü ve salgı tüyleri, h: iletim demetleri ve palizat parenkiması)

4.5. Uçucu Yağ Miktar Tayini

Clevenger aparatı kullanılarak 3 saatlik distilasyon sonucu kuru drog üzerinden hesaplanmış uçucu yağ verimleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Avrupa Farmakopesi’nde Tıbbi nane yaprak monografında uçucu yağ miktarı parçalanmış drogta en az 9 ml/kg (%0,9), bütün drogta ise 12 ml/kg olarak verilmiştir. 03, 04, 05, 06 no’lu droglar bütün droglardır. 05 no’lu örnek dışında elde edilen uçucu yağlar, %1,2 değerinin üstündedir. 01, 02, 07, 08, 09 ve 10 no’lu örnekler parçalanmış toz haldeki droglardır. 02, 08 ve 09 no’lu örnekler dışında elde edilen uçucu yağ miktarları %0,9’un üzerindedir. TSE verilerine göre uçucu yağ miktarı minimum %0,7 olmalıdır. 8 numaralı örnek haricindekiler bu değer üzerinde.

4.6. Kül Miktar Tayini

Toplam kül miktarı Tablo 4.1’de gösterilmiştir. En yüksek toplam kül miktarı 10 nolu örnekte tespit edilmiştir. Avrupa Farmakopesi 8.0’a göre nane yaprağı monografında maksimum toplam kül miktarı %15’tir. TSE verilerine göre kül miktarı maksimum %10’dur. Tüm örnekler bu değer altında kalmıştır.

4.7. Asitte Erimeyen Kül Miktar Tayini

Asitte erimeyen kül miktarı Tablo 4.1’de verilmiştir. Bu değere en yakın örnek 10 numaralı örnektir. 09 numaralı örnek bu değer üzerinde, diğer örnekler bu değer altında kalmıştır. TSE verilerine göre asitte erimeyen kül miktarı maksimum %2,5’tur. 9 no’lu örnek haricindekiler bu değer altındadır.

Tablo 4.1. *Analiz sonuçları*

Örnek	% su miktarı	% yabancı madde miktarı	% uçucu yağ verimi	% toplam kül	% asitte erimeyen kül
N01	13,00	0,09	1,00	7,84	0,12
N02	8,00	0,20	0,89	7,90	0,44
N03	13,86	1,98	1,56	9,02	0,54
N04	10,82	1,18	1,82	6,84	0,24
N05	9,90	0,39	1,03	8,00	0,80
N06	6,58	0,37	1,25	7,70	0,73
N07	4,92	0,41	1,28	8,18	1,05
N08	9,96	0,50	0,50	9,38	1,01
N09	3,00	0,56	0,85	8,32	2,94
N10	6,85	0,39	1,79	9,50	1,15
Ortalama	8,69	0,61	1,19	8,27	0,91
Std.	11	8	0,9/1,2*	15	1,5
Std.*	10	0,1	0,7	10	2,5

Std. : Avrupa Farmakopesi Nane Yaprağı monografındaki limit değerler

Std.: TSE kuru nane standartındaki limit değerler*

**: parçalanmış drogda en az %1,2, bütün drogda en az %0,9.*

4.8. İnce Tabaka Kromatografisi

10 adet numunenin farmakopede tarif edildiği şekilde hazırlanan diklorometan ekstreleri ve *n*-hekzanda hazırlanan uçucu yağlarının farklı çözücü sistemlerinde İTK analizleri yapılmıştır. En iyi ayırım sağlayan çözücü sistemi *n*-Hekzan: Etil Asetat (9:1) olarak belirlenmiştir. UV lamba altında (254 nm ve 364 nm) belirgin lekeler işaretlenmiştir. Belirteç olarak anisaldehit-sülfürik asit reaktifi kullanılmıştır. Uçucu yağ ve diklorometan ekstrelerine ait şahit çözelti ve test çözeltisiyle elde edilen kromatogramdaki lekeler Görsel 4.2 ve Görsel 4.3'te belirtilmiştir.

Test çözeltisi: 0.2 g ince toz edilmiş bitkisel drog 2 ml diklorometan eklenerek, 5 dk çalkalanıp ve süzölmüştür.

Şahit çözelti: 40 µl R-(-)-karvon, 80 µl 1,8-sineol, 200 µl limonen, 10 ml n-hekzan R'de çözümlere hazırlanmıştır.

Plak: Silika jel F₂₅₄

Hareketli faz: n-Hekzan: Etil Asetat (9:1, h/h)

Uygulama: 10 µl yuvarlak leke

Sürüklenme: 10 cm üzerinden ilerleme

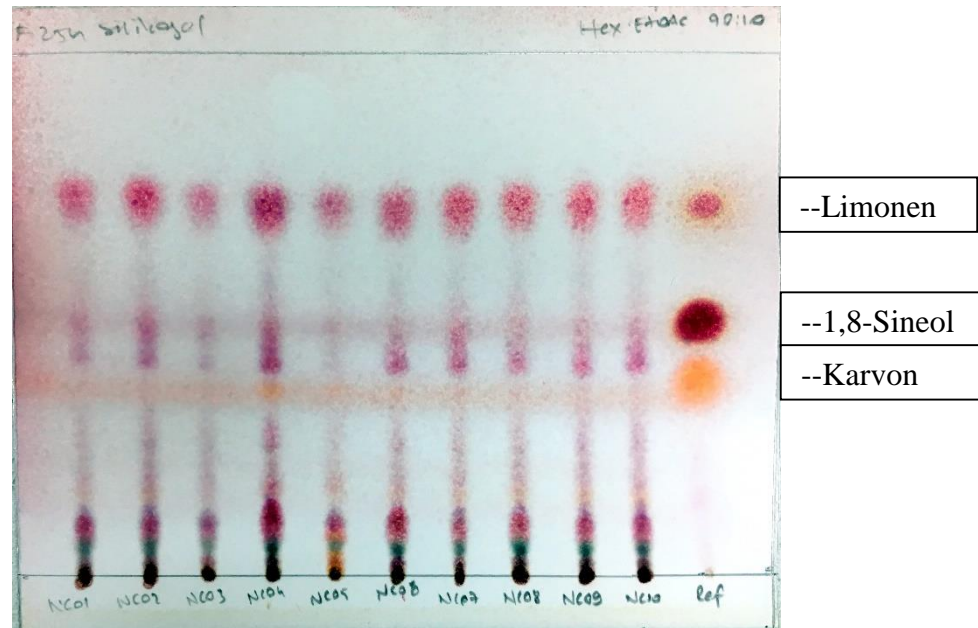
Kurutma: Havada

Tespit: Anisaldehit R. püskürtölür, 100-105°C 5-10 dk ısıtılır, gün ışığında incelenir.

Sonuçlar: Şahit çözelti ile elde edilen kromatogramda orta kısımda aşağıdan yukarı doğru sırasıyla turuncu leke (karvon), pembe-mor leke (1,8-sineol) ve pembe leke (limonen) göröldü. Test çözeltisiyle elde edilen kromatogramda en altta mor-siyah lekeler, onun üstünde kahverengi leke, onun üstünde mavi leke ve daha üstünde kırmızı-mor leke, orta kısımda karvon ve 1,8-sineole ait lekeler göröldü. Daha yukarıda limonene ait leke gözlemlendi (Görsel 4.2).

Plāğın Tepesi	
Limonen: Pembe leke	Pembe leke
1,8-sineol: Kırmızı-Mor Leke	Kırmızı-Mor leke
R(-)-karvon: Turuncu leke	Turuncu leke

	Kırmızı-Mor leke
	Kahverengi leke
	Mor-Siyah leke
Şahit Çözelti	Test Çözeltisi



Görsel 4.2. Toz droktan n-hekzan ile hazırlanan test çözeltisi İTK kromatogramı

Test çözeltisi: 40 µl uçucu yağ 1 ml *n*-hekzanda çözüldü.

Şahit çözelti: 40 µl R(-)-karvon, 80 µl 1,8-sineol, 200 µl limonen, 10 ml *n*-hekzan R'de çözüldü.

Plak: Silika jel F₂₅₄

Hareketli faz: *n*-Hekzan: Etil Asetat (9:1, h/h)

Uygulama: 10 µl yuvarlak leke

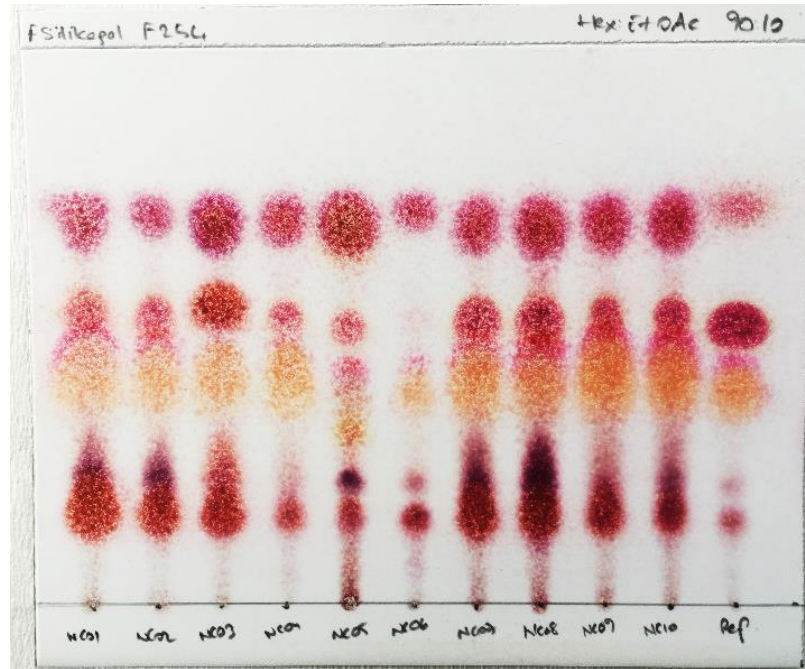
Sürüklenme: 10 cm üzerinden ilerleme

Kurutma: Havada

Tespit: Anisaldehit çözeltisi R. püskürtüldü, 100-105°C 5-10 dk ısıtıldı, gün ışığında incelendi.

Sonuçlar: Test çözeltisinde plağın en altında koyu kırmızı leke, yukarıya doğru mor lekeler görülür. Orta kısımda turuncu (R(-)-karvon), mavi-mor leke (1,8-sineol), pembe leke (limonen) görüldü (Görsel 4.3).

Plâğın Tepesi	
Limonen: Pembe leke	Pembe leke
1,8-sineol: Kırmızı-Mor Leke	Kırmızı-Mor leke
R-(-)-karvon: Turuncu leke	Turuncu leke
	Mor leke
	Koyu kırmızı leke
Şahit Çözelti	Test Çözeltisi

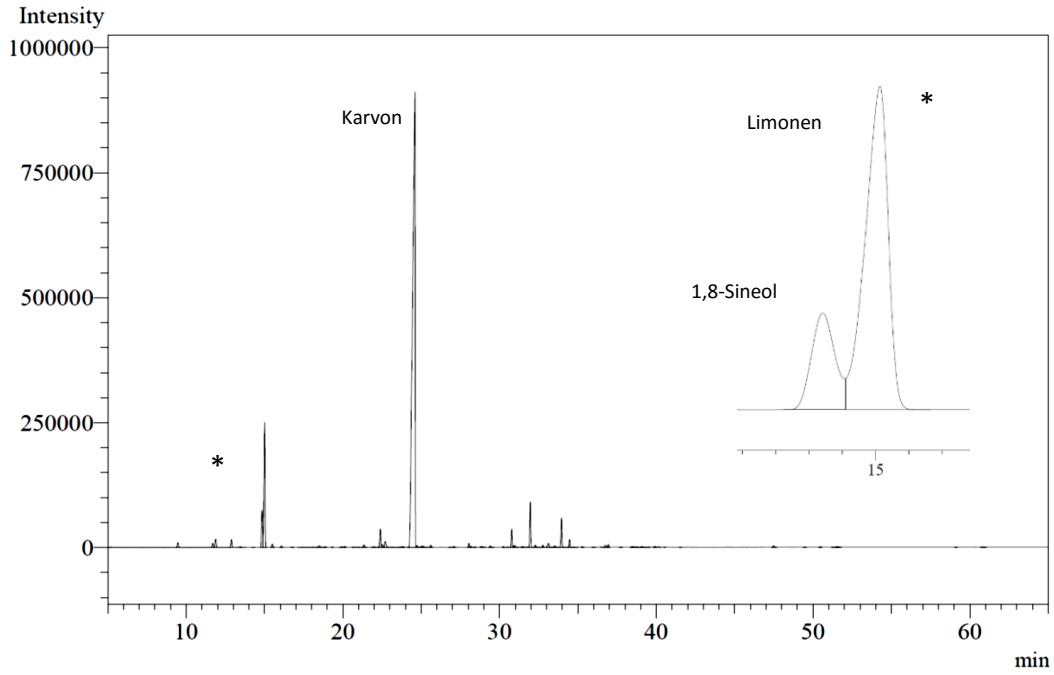


Görsel 4.3. Uçucu yağların İTK kromatogramı

4.9. Uçucu Yağ Bileşimi

M. spicata numunelerinden elde edilen uçucu yağların bileşimleri GK-AİD ve GK/KS sistemleri ile belirlenmiş, genel olarak %1 den büyük ana bileşenlerin bağlı % miktarları sunulmuştur. Uçucu yağlarda ana bileşenler karvon (%26,6-83,2), 1,8-sineol (%-0,3-4) ve limonen (%0,2-10) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu iki majör bileşik dışında değişen oranlarda sabinen, 3-oktanol, dihidrokarvon, α -terpineol, dihidrokarveol, β -burbonen, β -karyofilen, germakren-D, bisiklogermakren, spatulenol ve karyofillen oksit gibi mono ve seskiterpenler de saptanmıştır (Tablo 4.2).

Analizi yapılan *M. spicata* uçucu yağlarında karvon oranının %26,6-83,2 arasında değiştiği görülmektedir. Tablo 4.2 incelendiğinde 05 numaralı örnekteki karvon oranı %26,6 olup diğer örneklere göre daha düşük bir yüzdeye sahiptir. 05 numaralı örnekte seskiterpenlerin yüksek bir yüzdeye sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.1. *Mentha spicata* uçucu yağına ait örnek bir kromatogram (N04)

4.10. Uçucu Yağda 1,8-sineol, Limonen ve R(-)-karvon Miktar Tayini

GK-AİD kullanılarak 10-3000 ppm aralığında derişimde hazırlanan standart maddeler ile çizilen kalibrasyon eğrisine göre uçucu yağlarda R(-)-karvon, 1,8-sineol ve limonenin 3 mg/ml olarak hazırlanan çözeltildeki gerçek miktarları (mg/ml) belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Numunelere ait uçucu yağların kompozisyonu ve miktar tayini sonuçları

**Bileşenler %	N01	N02	N03	N04	N05	N06	N07	N08	N09	N10
Sabinen	-	-	1,79	-	-	-	-	-	-	-
3-Oktanol	-	-	-	-	1,29	-	-	-	-	-
1,8-Sineol*	1,0	3,9	0,33	2,61	2,47	1,26	0,5	0,49	1,23	0,31
	16	144	24	102	87	17	26	25	53	21
Limonen*	0,33	2,98	2,29	8,6	9,8	2,96	0,25	0,27	0,46	0,23
	37	96	81	259	262	77	19	19	26	19
Dihidrokarvon	1,68	0,89	1,72	1,24	-	1,36	1,14	-	-	-
α -Terpineol	-	1,15	-	-	-	-	1,02	1,4	-	1,18
Dihidrocarveol	7,57	3,52	4,21	-	-	1,39	2,96	3,13	-	-
Karvon*	71,4	72,33	65,9	76,1	26,7	72,4	78,8	68,07	83,17	80,18
	2108	2310	2238	2489	783	2117	2128	1717	2632	2207
β -Burbonen	-	-	1,2	1,13	2,66	1,47	-	-	-	-
b-Karyofillen	3,4	2,5	-	2,89	14,02	4,3	3,32	4,49	3,3	4,5
Germacren-D	-	-	3	1,77	8,92	3,82	-	-	-	-
Bisiklogermacren	-	-	-	-	1,52	-	-	-	-	-
Spatulenol	-	-	-	-	-	-	1,43	-	-	-
Karyofillen oksit	1,34	1,46	-	-	-	-	1,36	-	-	1,45

*Bölünmüş alt satırdaki değerler mg/ml'dir.; ** Ana bileşenler tabloya alınmıştır.

4.11. Droğun Mikrobiyolojik Analizi

Ambalajlı toz halde satın alınan örneklerde yapılan gıda analizleri sonucu Tablo 4.3’de verilmiştir. Örneklerde maya-küf, *Bacillus cereus*, Total Koliform, Koliform, *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterileri kontrol edilmiştir. Tablo 4.4’deki veriler 2009 ve 2011 Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği’ndeki baharat ile kahve-çay referans değerlerine aittir. Tüm örnekler 1/40 dilüsyon uygulanmıştır ve tablodaki sonuçlar KOB/g birimi ile verilmiştir.

Tablo 4.3. Numune sonuçları

Örnek KOB/g	Maya-Küf	<i>B. cereus</i>	Total Koliform	Koliform	<i>Enterobakter</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
N01	<100	<100	5,3x 10 ³	<100	2,1x10 ²	1,1x10 ⁴	<100
N02	<100	<100	4,6x 10 ³	<100	8,2x10 ⁴	<100	<100
N07	10 ²	<100	9,5x 10 ³	100	3,9x 10 ³	<100	<100
N08	10 ²	<100	5,1x 10 ³	100	1,2x 10 ³	1,0x10 ³	<100
N09	2,1x10 ²	<100	4,3x10 ⁴	<100	-	3,3x 10 ³	<100
N10	4,1x10 ²	<100	2,2x10 ⁴	1,2x10 ³	>4,9x10 ⁵	4,6x 10 ³	<100

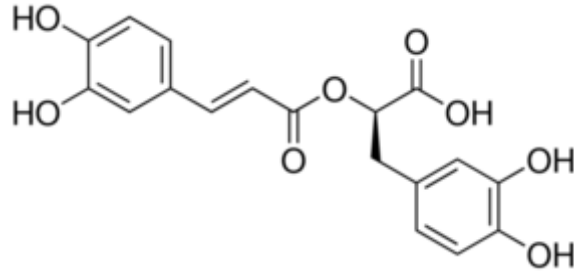
KOB/gr: Numunenin her 1 gramındaki koloni oluşturan mikroorganizma birimi, “-“ sonuç alınmadı

Tablo 4.4. Tablodaki veriler 2009 ve 2011 tarihli Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği’nde sınır değerlerdir (KOB/g)

Tebliğler	Maya-Küf	<i>B.cereus</i>	Total Koliform	Koliform	<i>Enterobakter</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
2011 (Baharat)	-	10 ³ -10 ⁴	-	-	-	10 ³ -10 ⁴	-
2011 (Kahve ve Çay)	10 ⁴ -10 ⁵	-	-	-	-	-	-
2009 (Baharat)	10 ⁴ -10 ⁵	10 ³ -10 ⁴	-	-	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	-
2009 (Kahve ve Çay)	10 ³ -10 ⁴	-	-	10 ² - 10 ³	-	-	-

4.12. Sıvı Kromatografisi

Örneklerin Avrupa Farmakopesi 8.0, *Mentha piperitae* yaprak ekstresi monografına göre içerdikleri rozmarinik asit miktarı belirlenmiştir. Ekstrelerin içerdikleri rozmarinik asit (Şekil 4.2) yüzdesi %0,3-1,14 arasında değişmektedir. Ekstrelerde yapılan analiz sonuçları Tablo 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Rozmarinik asit

Tablo 4.5. YBSK ile belirlenen rozmarinik asit içeriği

Örnek	Rozmarinik asit içeriği (%)
N01	0,44
N02	0,30
N03	0,19
N04	0,42
N05	1,14
N06	1,06
N07	0,44
N08	0,36
N09	0,44
N10	0,46
Std.*	0,5

*Std: Tıbbi nane yaprağı kuru ekstresi monografındaki değer

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda halk arasında bahçe nanesi olarak bilinen *M. spicata* subsp. *spicata* türünün kültür formları ve baharat olarak çeşitli kaynaklardan temin edilen örnekleri ile bir Avrupa Farmakopesi Monografi hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla Avrupa Farmakopesi'nin, bitkisel droglar ve bitkisel drog preparatlarında monograf hazırlanması için yayımladığı rehberde yer alan kalite kontrol testlerinden uygun olanlar temin edilen 10 adet örnek için uygulanmıştır. Elde edilen bulgular Avrupa Farmakopesi 8.0'de yer alan 'Tıbbi nane yaprağı (Peppermint leaf), tıbbi nane uçucu yağı (Peppermint oil) ve tıbbi nane kuru yaprak ekstresi (Peppermint leaf dry extract)' monograflarındaki bilgiler ve TSE kuru nane standardındaki değerlerle karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

Temin edilen 10 örneğin binoküler ışık mikroskopu ile incelenmesi sonucu örneklerde Lamiaceae familyasına özgü örtü ve salgı tüyleri taşıyan epiderma parçaları, yüzeyden ve alttan görünümde diasitik stoma, tek sıra üzerine dizili 3-8 hücreli, uzun, genellikle parçalanmış örtü tüyleri, 2 tipte salgı tüyleri; küçük-yuvarlak, tek hücreli ve genişlemiş oval başlı-tek hücreli saplı, enine kesitte kısa ve koni şeklinde tek veya iki hücreli örtü tüyleri, iletim demetleri ve palizat parenkiması tabakası gözlenmiştir (Görsel 4.1.). 10 örnek aynı türe ait olduğundan herhangi bir farklılığa rastlanmıştır.

Numunelerde bulunan su miktarları %3 ile %14 arasında değişmektedir. Avrupa Farmakopesi tıbbi nane yaprak monografında olması gereken oran maksimum %11'dir (110 mL/kg). 1 ve 3 numaralı örnekler %11'in üstünde su taşımaktadır (Tablo 4.1). Avrupa Farmakopesindeki bitkisel drog monografları incelendiğinde, havada kurutulmuş bitkisel drogların genellikle %11'dan fazla su taşımaması gerektiği bildirilmiştir. TSE verilerine göre su miktarı %10'un altında olmalıdır. 1, 3 ve 4 no'lu örnekler bu değerin üzerindedir. Bu sonuç bize bu iki droğun uygun şekilde kurutulmadığı veya saklanmadığını, yüksek nem oranı ile enzimatik faaliyetlerin devam edeceği ve/veya fungal üremenin olabileceğini işaret etmektedir.

10 farklı numunede yapılan yabancı madde miktar tayini sonucunda, tüm droglarda % 0,1 ile % 2 arasında yabancı maddeye rastlanmıştır. Farmakopedeki en yakın drog olan tıbbi nane yaprağında kahverengi lekeli yapraklarda maksimum %8 ve çapı 1,5 mm'den büyük olmayan saplar için maksimum %5 limit değer olarak belirlenmiştir. Bu monografa göre droglar yabancı madde miktar limit değerleri içerisindedir. TSE verilerine göre yabancı madde miktarı %0,1'in altında olmalıdır. 1

no'lu örnek haricindekiler bu değerin üzerindedir. Bu durum bize hasat aşamasında gövde, kök parçalarının karışmış olabileceğini, kurutma ve ambalajlama aşamalarında kirliliklerin bulaşmış olabileceğini gösterebilir.

Avrupa Farmakopesi Tıbbi nane yaprağı monografına göre parçalanmış drogda uçucu yağ miktarı en az 0,9 mg/ml (% 0,9), bütün drogda en az 1,2 mg/ml (%1,2) olarak verilmiştir. 03, 04, 05, 06 numaralı örnekler taze, bütün droglardır. 05 numaralı örnek hariç diğer örneklerde uçucu yağ oranı %1,2'den yüksek çıkmıştır. 01, 02, 07, 08, 09, 10 numaralı örnekler parçalanmış toz haldeki droglardır. 02, 08 ve 09 nolu örnekler dışındaki tüm numunelerde uçucu yağ miktarı %0,9'dan yüksek çıkmıştır. TSE verilerine göre uçucu yağ miktarı %0,7'den az olmamalıdır. Yalnızca 8 no'lu örnek bu değerin altında kalmıştır (Tablo 4.1). 02, 05, 08, 09 numaralı örneklerde uçucu yağ veriminin düşük çıkmasını, toprak koşulları, biyotik çevre koşulları, hasat şartları ve mevsimi, kurutma koşulları gibi nedenler etkilemiş olabilir. Yapılan uçucu yağ analiz çalışmaları incelendiğinde bu türe ait yağ verimlerinin çalışmamız verileri ile uyumlu şekilde %0,6-2,5 civarında olduğu görülmüştür (Başer vd.,2012; Salehi, 2018; Snoussi, 2015; Foda vd.; 2010, Lawrance, 2007).

Bitkisel materyaldeki inorganik maddeler, fizyolojik ve fizyolojik olmayan olarak iki tiptedir. Kalsiyum oksalat gibi tuzlar doğal inorganik maddelerdir ve toplam kül miktarı ile tespit edilebilirler. Ancak bu külün içerisinde topraktan bulaşan silikanın varlığını belirlemek üzere asitte erimeyen kül miktarı tayini deneyi yapılır. Toplam külden kalan kül seyreltik asitle ısıtılınca çözünmeyen silika ikinci bir süzme ve tartımla tespit edilir (Rao ve Xiang, 2009). Örneklerimizde en yüksek toplam kül ve asitte erimeyen kül miktarı sırasıyla % 9,5 ve % 2,94 ile 9 ve 10 no'lu örneklerde tespit edilmiştir (Tablo 5.1). Avrupa Farmakopesi (Türk Farmakopesi-2)'ne göre tıbbi nane yaprağı monografında maksimum toplam kül miktarı %15, maksimum asitte erimeyen kül miktarı % 1,5'tur. Bu limit değerine göre toplam kül miktarına tüm örnekler uygundur. Asitte erimeyen kül miktarına 9 no'lu örnek hariç diğer örnekler uygundur. TSE verilerine göre kül miktar ve asitte erimeyen kül miktarı maksimum %10 ve %2,5'tur. Toplam kül miktarına tüm örnekler uygundur. Asitte erimeyen kül miktarına 9 no'lu örnek haricindekiler uygundur. Gıdalardaki mineral maddelere, yakma sonucu arta kalan inorganik maddelere veya madensel maddelere asitte erimeyen kül denilir. Kısaca organik bileşiklerin haricindeki gıda bileşenleridir. 9 no'lu örnekte inorganik maddeler daha fazla bulunduğundan bu oran yüksek çıkmıştır.

Yapılan İTK analizlerinde UV lamba altında 254 nm’de *R*-(-)-karvon, limonen, 1,8-sineolde belirgin lekeler gözlenmiştir. 366 nm’de lekeler rastlanmamıştır. Belirteç olarak anisaldehit-sülfürik asit reaktifi ile en iyi sonuç alınmıştır. Reaktif püskürtülüp ısıtılan plakta şahit çözeltide yer alan *R*-(-)-karvon, limonen, 1,8-sineol farklı renklerde net olarak gözlenmiştir. İTK’da şahit çözelti ile elde edilen kromatogramda yukarıdan aşağı doğru sırasıyla pembe leke (limonen), mavi-mor leke (1,8-sineol) ve turuncu leke (*R*-(-)-karvon) görülmüştür. Toz drogdan diklorometan ile hazırlanan test çözeltisiyle elde edilen kromatogramda ve uçucu yağ ile hazırlanan test çözeltisinden elde edilen kromatogramda üst kısımda limonen, orta kısımda *R*-(-)-karvon ve 1,8-sineole ait lekeler görülmüştür (Görsel 4.2. ve Görsel 4.3). Plakta denenen tüm mobil ve sabit fazlar sonunda en iyi ayırım HPTLC plakta ve *n*-hekzan: etil asetat (9:1) ile sağlanmıştır.

M. spicata subsp. *spicata* numunelerinden elde edilen uçucu yağların bileşimleri GK-AİD ve GK/KS sistemleri ile belirlenmiş, %1’den büyük ana bileşenler verilmiştir (Tablo 4.2). Her bir numunenin ana bileşenlerinin miktarları örnekten örneğe değişmekle birlikte *R*-(-)-karvon (%26,7-83,17), limonen (0,33-9,8) ve 1,8-sineol (%0,33-3,9) her numunede ortaktır. Bu üç bileşik dışında değişen oranlarda sabinen, 3-oktanol, dihidrokarvon, α -terpineol, dihidrokarveol, β -burbonen, β -karyofilen, germakren-D, bisiklogermakren, spatulenol ve karyofilen oksit gibi mono ve seskiterpenler de saptanmıştır (Tablo 4.2). Tüm droglarda en yüksek yüzde içerik *R*-(-)-karvona aittir. 1,8-sineol oranı 1, 2, 7, 8, 9 ve 10 numaralı numunelerde limonen oranından yüksekken, 3, 4, 5, 6 numaralı numunelerde daha düşük olarak belirlenmiştir. 5 numaralı örnekteki karvon içeriğinin diğer örneklerden düşük olması, öncelikle genotipik farklılık, yetiştirilme koşulları, toplanma zamanı, kurutma şekli ve koşulları ile depolanma süresi gibi faktörlerle ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Farklı ülkelerde *Mentha spicata* subsp. *spicata* bitkisi için yapılan uçucu yağ çalışmalarında GK/KS ve GK/AİD analizi sonuçlarına bakıldığında, genel olarak *R*-(-)-karvon oranı %26,5-76,65, 1,8-sineol oranı %1-17 ve limonen oranı %2-23 arasında bulunmuştur (Başer vd., 2012; Chauhan vd., 2009; Snoussi vd., 2015; Masi vd., 2017; Bayan ve Küsek, 2018; Dhifi vd., 2013). Bazı çalışmalarda farklı sonuçlar gözlemlenmiştir. Bir çalışmada farklı olarak Türkiye kökenli *Mentha spicata* subsp. *spicata* bitkisinde menton (%62), izomenton (%17), terpinen 4-ol (%5) ve 1,8-sineol (%2) ana bileşen olarak belirlenmiştir (Başer ve Kürkçüoğlu, 1999). Elde ettiğimiz uçucu yağ analiz sonuçları genel olarak yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar

göstermiştir. Aynı bitki türü ile yapılan çalışmalarda farklı kimyasal kompozisyon sonuçlar elde edilmesinin pek çok nedeni vardır. Uçucu yağ bileşimindeki farklılıkların en büyük etmeni olan, kimyasal ırklar haricinde, biyotik çevre koşulları, toprak koşulları, hasat şartları ve mevsimi, coğrafi konum, yükseklik, iklim ve büyüme koşulları gibi çok nedeni dikkate almak gerekir. Bitkinin kurutma yöntemi, ekstraksiyon tekniği ve ekstraksiyon için kullanılan bitkinin anatomik kısmı da uçucu yağ verimini ve bileşimini etkilemektedir (Başer ve Buchbauer, 2010).

Uçucu yağlar karmaşık yapılara sahip bileşiklerdir. Bu tez çalışmasıyla *M. spicata* subsp. *spicata* uçucu yağındaki üç majör bileşenin bağıl ve gerçek miktar tayinleri ortaya konmuştur. GK-AİD kullanılarak 10-3000 ppm aralığında derişimde hazırlanan standart maddeler ile çizilen kalibrasyon eğrisine göre uçucu yağlarda *R*(-)-karvon, limonen ve 1,8-sineolün gerçek miktarları belirlenmiştir. Bağıl yüzde değerlerle elde edilen gerçek miktar arasında farklılıkların mevcut olduğu anlaşılmaktadır. Tablo 4.2 incelendiğinde N1 no'lu örnek diğer örnekler gibi 3 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve enjekte edilmiş, *R*(-)-karvon relatif yüzdesi %71,4 olarak bulunmuştur. Bulunan bağıl yüzde ile yapılan orantı ile örnekteki *R*(-)-karvon miktarının 2142 µg olması beklenirken gerçek miktar 2108 µg olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde N10 no'lu örnekte karvon miktarı yapılan integrasyon sonunda %80 olarak saptanırken, kantitatif olarak 2200 µg/ml (%73) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde tüm analizlerde bağıl yüzde ile gerçek miktar arasında farklılıklar saptanmıştır. Bu küçük farklılıkların kullanılan sıcaklık programında yağda bulunan bazı maddelerin dedektöre ulaşmamış olması veya AİD dedektörü ile tespit edilemediği öngörülmektedir. Uçucu yağlarda majör bileşenlerin standart numuneler ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre, en azından ana bileşenler bazında kantitatif olarak çalışılmasının önemi burada ortaya çıkmaktadır.

M. spicata subsp. *spicata* bitkisi ülkemizde ve dünyada yaygın olarak baharat ve tıbbi çay olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle taze olarak toplanan örnekler dışındaki 1, 2, 7, 8, 9 ve 10 numaralı örneklerin gıdalarda kalite parametrelerinden olan mikrobiyolojik bulaş durumu incelenmiştir. Örneklerde, Maya-Küf, *B. cereus*, Total Koliform, Koliform, *Enterobakter*, *S. aureus* ve *E. coli* üremesi kontrol edilmiştir.

Sonuçlar 2009-2011 Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmelikleri uyarınca değerlendirilmiştir. Yönetmelikte total koliform ve *E.coli* üremesi ile ilgili bir bilgi mevcut değildir. Ancak total koliform saptanan örneklerde fekal bir bulaşmanın

ortaya konması bakımından *E. coli*'nin de bakılması gereklidir. *Enterobakter* kontrol edildiğinde 1 numaralı örnek dışındaki haricinde diğerlerinde sınırın üzerindedir. *Enterobakter* doğada, toprak, su, insan ve hayvan dışkısında doğal olarak bulunur. Bu durum bize örneklerin yeterince temizlenmediği ve/veya sulama suyunun kalitesinin yeterli olmadığını bizlere göstermektedir. 10 numaralı örnekte koliform miktarı gramda 1200 adet koloni oluşturan birim olarak belirlenmiştir. İnsan ve hayvan dışkısı kaynaklı olan fekal koliformlar bu ürününde uygun şartlarda yetiştirilmediği veya kaliteli sulanmadığını göstermektedir. Yine aynı örneğin diğer parametreler bakımından da limitler altında kalsa da yüksek mikrobiyal yüke sahip olduğu görülmektedir. *E. coli* ile ilgili kodekste limit değer yer almamakla birlikte, örneklerde aranmış ve 100 KOB/g olarak tespit edilmiştir. Diğer sonuçlar 2009-2011 Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne uygun olarak belirlenmiştir. Çeşitli baharatlar için benzer çalışmalar yapılmıştır.

Van bölgesinden toplanan kırmızıbiber, karabiber ve kimyondan oluşan toplam 44 adet baharat örneğini mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir. İncelenen 15 adet kırmızıbiber, 14 adet karabiber ve 15 adet kimyon örneğinde sırasıyla ortalama toplam aerob mikroorganizma $1,7 \times 10^7$ KOB/g, $1,3 \times 10^7$ KOB/g, $1,7 \times 10^6$ KOB/g; koliform bakteri $1,5 \times 10^4$ KOB/g, $1,3 \times 10^3$ KOB/g, $8,4 \times 10^3$ KOB/g; *E. coli* $1,0 \times 10^4$ KOB/g, $1,0 \times 10^3$ KOB/g, $8,2 \times 10^3$ KOB/g; *Staphylococcus sp.* $3,0 \times 10^5$ KOB/g, $1,5 \times 10^4$ KOB/g, $1,6 \times 10^4$ KOB/g; küf-maya $1,4 \times 10^4$ KOB/g, $1,1 \times 10^3$ KOB/g, $9,2 \times 10^3$ KOB/g; aerob sporlu mezofil bakteri $1,5 \times 10^7$ KOB/g, $1,6 \times 10^7$ KOB/g, $3,3 \times 10^6$ KOB/g olarak tespit edilmiş, anaerob sporlu mezofil bakteriler sırasıyla 8, 11, 14 örnekte bulunmuştur (Sağun vd., 1997).

Bursa'da market ve semt pazarlarında satışa sunulan 105 adet karabiber, kimyon, acı toz kırmızıbiber, tatlı toz kırmızıbiber, acı kırmızı pul biber, tarçın, kekik, nane, sumak, kişniş, zencefil, reyhan gibi baharat ve çeşni verici otlarda *Bacillus cereus* varlığı araştırılmıştır. Analize tabi tutulan ambalaj içerisindeki baharatlardan karabiberde *Bacillus cereus* sayısı acı pul kırmızıbiberde $7,7 \times 10^4$ KOB/g, $8,5 \times 10^3$ KOB/g, kimyonda $4,8 \times 10^2$ KOB/g, acı toz kırmızıbiberde $2,9 \times 10^5$ KOB/g, tarçında $8,8 \times 10^2$ KOB/g olarak, açık olarak satılan karabiberde $1,6 \times 10^4$ KOB/g, kimyonda $9,8 \times 10^2$ KOB/g, acı toz kırmızıbiberde $3,1 \times 10^5$ KOB/g, acı pul kırmızıbiberde $2,2 \times 10^5$ KOB/g, tatlı toz kırmızıbiberde $3,3 \times 10^5$ KOB/g, sumakta $3,2 \times 10^2$ KOB/g, zencefilde

$3,1 \times 10^4$ KOB/g, kişnişte $1,1 \times 10^3$ KOB/g olarak tespit edilmiştir (Temelli ve Anar, 2002).

İstanbul'daki farklı satış noktalarından alınan karabiber örneklerinden toplam mezofil aerob mikroorganizma sayısını ortalama, $2,9 \times 10^6$ KOB/g, *Enterobacter* sayısını ortalama, $4,3 \times 10^4$ KOB/g, aerob sporlu bakteri sayısını ortalama, 8×10^5 KOB/g, küf ve maya sayısı ortalama $1,2 \times 10^4$ KOB/g olarak saptanmıştır (Aydın, 2001).

Yapılan çalışmalar bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında; çalışmalarda maya-küf üremesi $1,1 \times 10^3 - 1,4 \times 10^4$ KOB/g arasındayken, bizim örneklerimizde $0-4,1 \times 10^4$ KOB/g arasındadır. *B. cereus* üremesi çalışmalarda $3,2 \times 10^2 - 3,3 \times 10^5$ KOB/g arasındayken, bizim çalışmamızda 100 KOB/g'dan az ölçülmüştür. Koliform sayısı çalışmalarda $1,3 \times 10^3 - 1,5 \times 10^4$ KOB/g iken, bizim çalışmamızda $0-1,2 \times 10^3$ KOB/g arasındadır. *Enterobacter* sayısı çalışmalarda $4,3 \times 10^4$ KOB/g iken, bizim çalışmamızda $0-4,9 \times 10^5$ KOB/g arasında ölçülmüştür. *S. aureus* sayısı çalışmalarda $1,5 \times 10^4 - 3,0 \times 10^5$ KOB/g iken, bizim çalışmamızda $0-1,1 \times 10^4$ KOB/g arasındadır. *E.coli* sayısı çalışmalarda $1,0 \times 10^3 - 1,0 \times 10^4$ KOB/g arasında iken, bizim çalışmamızda 100 KOB/g'ın altında ölçülmüştür.

Çalışmamızda Avrupa Farmaopesi 8.0'da yer alan "Tıbbi nane kuru yaprak ekstresi" monografı içinde uygulanan sıvı kromatografisi denenmiştir. Örneklerdeki rozmarinik asit miktarları % olarak konmuştur. Monografa göre rozmarinik asit yüzdesi minimum %0,5 olmalıdır. Numunelerden 5 ve 6 no'lu örnek dışındakiler bu değerin altında kalmıştır. *M. spicata* ile yapılan çalışmalar incelendiğinde bu oran %0,58 ile %1 arasında değişmektedir (Shekarchi vd., 2012; Fletcher vd., 2005; Fletcher vd., 2010, Göğer, 2013)

Ülkemizde yaygın olarak kullanılan *M. spicata* subsp. *spicata* bitkisine ait bir kalite standardı mevcut değildir. Bu standartları oluşturmak amacıyla Avrupa Farmakopesinde yer alan bitkisel droglar için uygun testler gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlarla bitkinin monografının oluşturulmasında bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Parametreler en yakın tür olan tıbbi nane monografı ve TSE kuru nane standardı ile karşılaştırılarak verilmiştir.

KAYNAKÇA

Abu-Asab, S.M., Cantino, D.P. (1992). ‘‘Pollen morphology in subfamily Lamiioidea (Labiatae) and its phylogenetic implications’’, advances in Labiatae science, *In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors) Royal Botanic Gardens Press, Edinburg, Kew p:85-97.*

Acıbuca, V., Budak, D. B. (2018). Dünya’da ve Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yeri ve Önemi. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(1), 37-44.

Aggarwal, K. K., Khanuja, S. P. S., Ahmad, A., Kumar, T. R. S., Gupta, V. K. Ve Kumar, S. (2002). 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.

Akdoğan, M., Tamer, M. N., Cüre, E., Cüre, M. C., Köroğlu, B. K., Delibaş, N. (2007). Effect of spearmint (*Mentha spicata* Labiatae) teas on androgen levels in women with hirsutism. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(5), 444-447.

Almeida P. P., Mezzomo N., Ferreira S. R. S. (2012). Extraction of *Mentha spicata* L. Volatile Compounds: Evaluation of Process Parameters and Extract Composition. *Food and Bioprocess Technology*. 5(2):548-559.

Arumugam, P. ve Ramesh, A. (2009). 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.

Aydın, A. (2001). *Toz Karabiberde Mikrodalga Yöntemi ile Mikrobiyal Dekontaminasyon Üzerine Bir Çalışma*. (Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi).

Aydın F. (2012). *Mentha spicata* L. subsp. *spicata* (Lamiaceae) Bitkisinin Morfolojik,

Anatomik, Palinojik ve Bazı Kimyasal Özelliklerinin Araştırılması. (Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi).

Aytaç, Z., Yıldız, G. (1996). A New Record for the flora of Turkey. *Doğa tr. J.of Botany*, 20, 385-386.

Bajpai V.K., Baek K.H. (2016). Biological Efficacy and Application of Essential Oils in Foods-A Review, *J Essent Oil Bear Pl.* 19, 1-19.

Başer, K. H. C. (1997). *Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin İlaç ve Alkollü İçki sanayilerinde Kullanımı.* İstanbul Ticaret Odası, Yayın No: 39.24-25.

Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M. (1999). *Essential Oils of Mentha Species from Northern Turkey.* J.Essent. Oil Res., 11, 579-588.

Başer K.H.C. (2006). *Nane.* Bağbahçe Dergisi. Sayı:4.22-24.

Başer K.H.C., Buchbauer G. (2010). Handbook of Essential Oils. *CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.* 1.5-6.

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

Başer, K. H. C. (2014). *Türkiye'nin Önemli Tıbbi ve Aromatik Odun Dışı Orman Ürünleri.* Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Eczacılık ve Ormancılıktaki Önemi Çalıştayı (20-21 Mart 2014), İnönü Üniversitesi, Malatya, 8-26.

Bayan, Y., Küsek, M. (2018). Chemical Composition and Antifungal and Antibacterial Activity of *Mentha spicata* L. *Volatile Oil.* *Cien. Inv. Agr.* 45(1): 64-69.

Baydar, H. (2005). *Tıbbi, Aromatik ve Keyf bitkileri Bilimi ve Teknolojisi.* (51). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları.22-25.

Baydar, H. (2009). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi. *SDÜ Ziraat Fakültesi Yayın No: 51.122-123.*

Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ. (2010). *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları*. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I, 437–456.

Bayramoğlu M.M., Toksoy D., Şen G. (2009). *Türkiye’de Tıbbi Bitki Ticareti*. 2. Ormancılıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi.89-98.

Baytop, T. (1984). Türkiye’de bitkiler ile tedavi. *İstanbul Üniv. Yayınları*, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 240-376 (1984).

Baytop, T. (1999) . Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün. *Nobel Tıp Kitabevleri*, II. Baskı ISBN: 975-420-021.

BGA, (2018). *List of German Commission E Monographs (Phytotherapy)*.

Borisova, A. G., Volkova, E. V., Gorslikova, S. G., Klovov, M. V., Knorring, O. E., Kupriyionova, L. A., Pobedımovı, E. G., Poyarkova, A. I., Yuzepchuk, S. V. (1977). *Flora Of The U.S.S.R. Volume XXI Labiatae* (ed: Shishkin B. K.). Israil Program Of Scientific Translation, Jerusalem.

Bourgard, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001). *Production Of Plant Secondary Metabolites; a Historical Perspective*, Plant Sci., 161: 839-851

BP (2009). *British Pharmacopoeia: Medicines and Healthcare products agency*.

Büyükbayraktar, A. (2014). *Konya Ekolojik Şartlarında Farklı Azot Dozlarında Yetiştirilen Mentha piperita L. ve Mentha spicata L. Türlerinin Kurutma Yöntemlerine göre Drog Verimi ve Bazı Kalite Özelliklerinin Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi).

Byng, J. W., Christenhusz, M. M. (2018). *Introducing The Global Flora, a global series of botany*. The Global Flora. 1-2.

Chauhan, R.S. , Kaul, M.K., Shahi , A.K., Kumar, A., Ram, G.,, Tawa, A. (2009). Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial crops and products* 29. 654–656.

Choudhury, R.P., Kumar, A., Garg, A.N. (2006). *Analysis of Indian mint (Mentha spicata) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour*. Volume 41, Issue 3. 683-1082.

Celenk, S., Tarimcilar, G., Bicakci, A., Kaynak, G., Malyer, H. (2008). A palynological study of the genus *Mentha* L.(Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 157(1), 141-154.

Çolak, E. (2012). Bitkisel İlaçlar ve Gıda Takviyeleri ile Genel Yaklaşım ve Sorunlar, *MİSED*, Türk Eczacılar Birliği Yayını, 27-28, 3.

DAB, (2015). *Deutsches Arzneibuch*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Germany.

Darlington, D. C., Wylie, A. P. (1955). *Chromosome Atlas Of Flowering Plants*. George Allen and unwin Ltd..

Davis, P. H. (1982). The Flora of Turkey and The East Aegean Islands. *Edinburgh at the University Press*, 7, 384-394.

Deans, S. G. (2007). Antimicrobial Activity of Essential Oils and Constituents of *Mentha* Species. In B. M. Lawrence (Ed.), *Mint: the genus Mentha*. New York: CRC Press.77.

Deveci H.A., Nur G., Kırpık M.A., Harmankaya A., Yıldız Y. (2016). Fenolik Bileşik İçeren Bitkisel Antioksidanlar. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 9(1),26-32.

Dhifi, W., Jelal, N., Mnif, W., Litaïem, M., Hamdi, N. (2013). Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha spicata* L. from Tunisia and Its Biological Activities. *Journal of Food Biochemistry* 37. 362–368.

Dualı G. (2010). *Bazı Türk Nane (Mentha L.) Uçucu Yağlarının Biyolojik Aktiviteleri*. (Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi).

Edris A.E. (2007). *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review*, *Phytother Res.* 21, 308-323.

Elliältiođlu Ő., Sevengör Ő., Sezik E. (2007). *Őanlıurfa' da Nane tarımının geliştirilmesi üzerinde çalışmalar*, Őanlıurfa GAP GİDEM Bilgilendirme Toplantısı. 1-16.

Ersöz T. (2012). Bitkisel İlaçlar ve Gıda Takviyeleri İle İlgili Genel Yaklaşım ve Sorunlar. *MİSED.* 27-28 (11-21).

Eryiğit F.,2006. *Mentha pulegium L.ve Salvia tomentosa Miller Bitkilerinin Metanol Özütlelerinin In Vitro Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi).

Ertürk R., Çelik C., Kaygusuz R., Aydın H. (2010). Ticari olarak satılan kekik ve nane uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. *Cumhuriyet Tıp Dergisi*; 32: 281-286.

Faydaoğlu E., Sürücüođlu M.S. (2011). Geçmişten Günümüze Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanılması ve Ekonomik Önemi. Kastamonu Üni., *Orman Fakültesi Dergisi*, 2011, 11 (1): 52 – 67.

Fletcher, R. S., Slimmon, T., McAuley, C. Y., ve Kott, L. S. (2005). 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.

Fletcher, R.S, Slimmon, T., Kott, L.S. (2010). Environmental Factors Affecting the Accumulation of Rosmarinic Acid in Spearmint (*Mentha spicata* L.) and Peppermint

(*Mentha piperita* L.). *The Open Agriculture Journal*,4. 10-16.

Foda M.I., El-Sayed M.A., Hassan A.A., Rasmy N.M., El-Moghazy M.M.(2010). Effect of Spearmint Essential Oil on Chemical Composition and Sensory Properties of White Cheese. *Journal of American Science*, 6.5.

Gezgin, D. 2006. Bitki Mitosları. *Sel Yayıncılık*. 132.

Göğer F. (2013). *Mentha Spicata* L. *Alt türlerinin Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Aktivitelerinin YBSK-KS/KS Yöntemi ile Belirlenmesi*. (Doktora tezi, Anadolu Üniversitesi).

Gök Metin, Z., Özdemir, L. (2016). Romatoid Artritte Ağrı ve Yorgunluğun Yönetiminde Aromaterapi ve Refleksolojinin Kullanımı. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*; 13 (1): 276-281.

Grant P. (2010). Spearmint Herbal Tea has Significant Anti-androgen Effects in Polycystic Ovarian Syndrome. A Randomized Controlled Trial. *Phytotherapy Research*. 24: 186–188.

Guedon, D. J. ve Pasquier, B. P. (1994). 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.

Güllüce, M., Şahin, F., Somken, M., Özer, H., Daferera D., Somken, A., Polissiou, M., Adıgüzel, A., Özkan, H. (2007). Antimicrobial and Antioxidant Properties Of The Essential Oils and Methanol Extract From *Mentha longifolia* L. Ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*. 103: 1449–1456.

Güner, A. (2012). Türkiye Bitkileri Listesi. *Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları*, 561-562.

Hedge, I.C. (1986). Labiatae of South-West Asia diversity, distribution and endemism, proceedings of the Royal Society of Edinburgh, *Electronic Journal of Biotechnology*. 23-35.

Heinrich, M., Barnes, J., Prieto-Garcia, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (2017). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy E-Book*. Elsevier Health Sciences. 4-9.

Hussain, A.I., Anwar, F., Shahid, M., Ashraf, M., Przybylski, R. (2010) Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (*Mentha spicata* L.) From Pakistan, *Journal of Essential Oil Research*, 22:1, 78-84.

Jaradat, N.A., Zabadi, H.A., Rahhal, B., Hussein, A.M.A., Mahmoud, J.S., Mansour, B., Khasati, A.I., Issa, A. (2016). The effect of inhalation of *Citrus sinensis* flowers and *Mentha spicata* leave essential oils on lung function and exercise performance: a quasi-experimental uncontrolled before-and-after study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 13-36.

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

Karakaplan N. (2017). *Nane (Mentha spicata) Bitkisinden Uçucu Yağ Eldesi için Optimum Koşulların Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi).

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

Kokkini, S. (1992). Essential oils taxonomic markers in *Mentha*, *Advances in Labiatae Science*. *Royal Botanic Gardens Press*, Edinburgh, R. 325-331.

Kokkini, S., Karousou, R., Lanaras, T. (1995). Essential oils of spearmint (Carvone

Rich) plants from the island of Crete, *Biochemical Systematics and Ecology*, 23. 425-430.

Koyuncu O., Yaylacı Ö. K., Öztürk D., Erkara İ. P., Savaroğlu F., Akçoşkun Ö., Ardıç M. (2010). Osmaneli (Bilecik-Türkiye) ve çevresinde doğal yayılış gösteren Lamiaceae taksonlarının risk kategorileri ve etnobotanik özellikleri. 3(3), 31-45.

Köse Ö. (2010). *Bazı Mentha L. Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Araştırmalar*. (Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi).

Kumar, V., Kural, M. R., Pereira, B. M. J. ve Roy, P. (2008). 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.

Lawrance, B.M.(2007). Mint “The Genus *Mentha*”, *CRC Press*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 16-33.

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

Manesh, M.E., Ghaedi, Z., Asemi, M., Khanavi, M., Manayi, A., Jamalifar, H., Atyabi, F., Dinarvand, R. (2013). Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles. *Journal Pharmacy Research*. 7, 290-295.

Masi E., Caparrotta, S., Taiti, C., Ieri, F., Fiume, F., Moselhy, N., Mancuso, S., Roman, A. (2017). Characterization of volatile compounds in *Mentha spicata* L. dried leaves. *Adv. Hort. Sci.*, 31(2): 89-95.

Melikoğlu G., Kurtoğlu S., Kültür S. (2015). Türkiye’de Astım Tedavisinde Geleneksel Olarak Kullanılan Bitkiler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 19: 1-11.

Moro, I.J., Gondo, G.D.G.A., Pierri, E.G., Pietro, R.C.L.R., Soares, C.P., Souza, D.P.,

Santos, A.G. (2017). Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. *Braz. J. Pharm. Sci.*; 53(4).

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

Özaydın, S., Dirmenci, T., Tümen, G., Başer, K.H.C. (2006). Plants used as analgesic in the folk medicine of Turkey. *Proceedings of the IVth International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005)*, 167-171.

Özbek, H., (2005). Cinsel ve Jinekolojik Sorunların Tedavisinde Bitkilerin Kullanımı. *Van Tıp Dergisi*: 12 (2):170-174.

Özdemir A. (2010). *Ratlara Farklı Çözücülerde Hazırlanarak Verilen Mentha spicata Lamiaceae Nane Ekstreleri ile Kuru Tozunun Kanda, β -Karoten, A,C Vitaminleri, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz, Malondialdehid, Superoksit Dismutaz Enzimleri ve Total Antioksidan Kapasite Üzerine Etkilerinin Araştırılması*. (Doktora tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi).

Özdemir, A., Sözbilir, N. B., (2016). *Mentha Spicata L.* Kuru Tozunun ve Farklı Tıp Ekstrelerinin Bazı Biyokimyasal Parametreler ve Total Antioksidan Kapasite Üzerine Etkileri. *Kocatepe Veterinary Journal*. 9(1):12-18.

Özdemir B. (2014). *Kitosan Uygulamasının in vivo ve in vitro Olarak Yetiştirilen Mentha spicata L. ve Mentha arvensis L. Türlerinde Antioksidant Enzimler Üzerine Etkilerinin Spektrofotometrik ve Elektroforotik Olarak Saptanması*. (Yüksek lisans tezi, Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi).

Özel, A., Özgüven, M. (1999). Harran Ovası Koşullarında Farklı Dikim Zamanlarının Bazı Nane (*Mentha spp.*) Tiplerinin Verim ve Bazı Tarımsal Karakterlerine Etkisi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 23, Ek Sayı 4, 921-928.

Özkan Y. (2016). Türk Farmakopesinin Tarihsel Gelişimi. *Türk Farmakope Dergisi*,

1(1):21-33.

Öztürk, B., Konyalıoğlu, S., Ertaş, H., Gökgünneç, L.(2002). Türkiye’de doğal yayılış gösteren bazı *Mentha L.* taxonlarının karşılaştırmalı uçucu yağ bileşenleri ve antioksidan etkileri, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Eskişehir, 29-31.

Padmini E., Valarmathi A., Usha Rani M. (2010). Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha spicata* and *Camellia sinensis*. *Asian Journal of Experimental Biology*.1 (4). 772-781.

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

Ph. Eur. (2013a). Council of Europe. European Pharmacopeia. 8 th. Ed. Strasbourg: Council of Europe. Peppermint leaf, 1350-1354.

Ph. Eur. (2016). Council of Europe. European Pharmacopoeia. 9 th. ed. Strasbourg: Council of Europe. Index, 4006.

PDR Network, L. L. C. (Ed.). (2013). *Physicians' desk reference*. PDR Network.

Rao, Y., Xiang, B. (2009). Determination of total ash and acid-insoluble ash of Chinese herbal medicine *Prunellae spica* by near infrared spectroscopy. *Yakugaku zasshi*, The Pharmaceutical Society of Japan, 129(7), 881-886.

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

Sağun, E., Sancak, Y.C., Durmaz, H., Ekici, K. (1997). Van’da Tüketime Sunulan Bazı Baharatların Mikrobiyolojik Kalitesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 8 (1-2), 1-5.

Salehi B., Stojanovi'c-Radi'c Z., Mateji'c J., Sharopov F., Antolak H., Kr'egiel D., Sen S., Sharifi-Rad M., Acharya K., Sharifi-Rad R., Martorell M., Sureda A., Martins N., Sharifi-Rad J. (2018). Plants of Genus *Mentha*: From Farm to Food Factory. *Plants*, 7-70.

Saltan İşcan, G. (2016). Türk Farmakopesi'nde Bitkisel Drog ve Ürünler. *Türk Farmakope Dergisi*, 1(1), 67-73.

Scherer R., Lemos M. F., Lemos M. F., Martinelli G. C., Martins J. D. L., Gomes A. (2013). *Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilianspearmint (Mentha spicata L.)*. 408-413.

Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A.R., Hamedani, M.P. (2012). Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29). 37-41.

Sertkaya, E., Kaya, K. ve Soylu, S. (2010). 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.

Simon, J.E., Chadwick, A.F., Craker, L.E. (1980). *Herbs: An Indexed Bibliography 1971-1980*. Elsevier.

Singh C. S. ve Ruchi A. (2013) *Evaluation of Antibacterial Activity of Volatile from Mentha spicata L.* *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 3(4), 120-121.

Shahgholian, N. ve Dehghan, M. (2010). Effect of Aromatherapy On Pruritus Relief In Hemodialysis Patients. *Iran J Nurs Midwifery Res*; 15(4): 240-244.

Shinwari Z.K., Sultan S., Mahmood T. (2011). Molecular and Morphological Characterizations of Selected *Mentha* species. *Pak. J. Bot.*, 43(3): 1433-1436.

Snoussi M., Noumi E., Trabelsi N., Flamini G., Papetti A., De Feo V. (2015). *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. *Molecules*, 20, 14402-14424.

Tanker N., Koyuncu M., Coşkun M. (1998). Farmasötik Botanik. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, No:78. 340-342.

Tanker, N., Koyuncu, M., ve Coşkun, M. (2007). Farmasötik Botanik. *Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, Ders Kitapları*, 301-302.

Tisserand, R., Young, R. (2013). *Essential Oil Safety-E-Book: A Guide for Health Care Professionals*. Elsevier Health Sciences. 427-428.

Toprak, Y. (2005). *Mentha spicata L. subsp. spicata* bitkisinin uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal etkisi üzerine araştırmalar (Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi).

Töre, N. (2016). *Çörek otu ve nane uçucu yağının inhalasyon yolu ile sinüs mukozasına ulaşım miktarının araştırılması*. (Tıpta Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi).

TSE, (2001). *Kuru Nane (Mentha spicata Linnaeus Syn. Mentha viridis Linnaeus)-Özellikler*. TS-3498. ICS-67-220-10. 1-4.

USP, (2018). The United States Pharmacopeia: The National Formulary. USP 41 and NF 36.

Temelli, S., Anar, Ş. (2002). Bursa’da Tüketime Sunulan Baharat ve Çeşni Verici Otlarda *Bacillus cereus*’un Varlığı. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 28(2), 459-465.

Tuzlacı E. (2006). ‘Şifa Niyetine’ Türkiye’nin Bitkisel Halk İlaçları. *Alfa Yayınları*. 201-204.

Uskutoğlu, T., Cesur, C., Coşge Őenkal, B., Açar, D. (2017). Economic, Social and Ecological Characteristics of Some Wild Plants With Medical and Aromatic Potential. International Congress On Medicinal and Aromatic Plants: “Natural and Healthy Life” Proceedings Book. *Necmettin Erbakan Üniversitesi Yayınları*. 60-68.

USP (2018). American Pharmacopeia. Combined Index to USP 42 and NF 37. 5865-5866.

WHO, (2004). *WHO monographs on selected medicinal plants*: World Health Organization.

Yaltırık F. ve Efe A., (1996). Otsu Bitkiler Sistematığı. İstanbul Üniversitesi Yayınları. 21-23.

Yeşil M. (2012). *Mentha spicata L. ve Mentha villosa-nervata L. Genotiplerinin Tarımsal ve Kalite Özellikleri Üzerine Azot ve Fosfor Dozlarının Etkisi*. (Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi).

Yeşilada E. (2012). Ottan Fitofarmasötiđe; Güncel Fitoterapi. *Mised*. Mayıs; 27-28: 6-10.

Yetişen, B. (2011). *Türkiye'nin Farklı Lokasyonlarına ait Mentha spicata L. Türünde Morfolojik, Anatomik Çalışmalar*. (Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi).

http 1: www.gardenersworld.com/plants/mentha-spicata/

(Erişim tarihi: 19.10.2018)

http 2: plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:451162-1

(Erişim tarihi: 05.11.2018)

http 3: www.titck.gov.tr/PortalAdmin/Uploads/UnitPageAttachment/2Yflx5eX.pdf

(Erişim tarihi: 10.11.2018)

http 4: www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-9th-edition

(Erişim tarihi: 27.11.2018)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Döne Neşe ÇETİN
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı: Çatalzeytin/06.08.1992
E-Posta : nesecetin92@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi-2015.
- Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi- Eczacı – 2015-.

Yayımları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- Akılcı Antibiyotik Kullanımı-2017-Isparta yerel gazeteler

Mesleki Birlik/Dernek/Kuruluş Üyelikleri:

- Tüm Kamu Eczacıları Derneği -2016