

**TÜRKİYE'NİN FARKLI LOKALİTELERİNDEN TOPLANAN *ACHILLEA SETACEA* WALDST. & KIT. UÇUCU YAĞININ BİLEŞİMİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ**

**COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS OF *ACHILLEA SETACEA* WALDST.&KIT. COLLECTED FROM DIFFERENT LOCALITIES OF TURKEY**

**Canan KARAMENDERES<sup>1</sup>, N.Ülkü KARABAY<sup>2</sup>, Umi ZEYBEK<sup>1</sup>**

**'Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı,  
35100 Bornova-İzmir, TURKEY**

**<sup>2</sup>Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 35100 Bornova-İzmir, TURKEY**

**ÖZET**

*Bu çalışmada Türkiye'nin 7 farklı lokalitesinden toplanan Achillea setacea çiçeklerinden hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağların GC ve GC/MS analizleri sonucu ana bileşenleri saptanmış, bu uçucu yağların invitro antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Edirne, Tekirdağ, Niğde, Kırşehir, Kırklareli ve Burdur'dan toplanmış olan A.setacea uçucu yağlarının ana bileşeni 1,8-sineol (sırasıyla, %35.4-48.5-34.3-36.7-38.2-42.3) olarak saptanırken, Sivas'tan toplanmış olan A.setacea uçucu yağının kamazulen içerdiği ve ana bileşenin kamfor (%30.2) olduğu belirlenmiştir. Uçucu yağların invitro antimikrobiyal aktivite incelemesi 3 gram-pozitif, 5 gram-negatif bakteri ve Candida albicans için mikrodilüsyon metodu ile yapılmıştır. Uçucu yağların %5'lik konsantrasyonda Proteus vulgaris, Salmonella thphimurium ve Candida albicans'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır.*

**Anahtar Kelimeler:** *Achillea setacea, Asteraceae, uçucu yağ, 1,8-sineol, kamazulen, antimikrobiyal aktivite*

**ABSTRACT**

*Main components of the essential oils obtained by hydrodistillation from Achillea setacea collected from seven different localities of Turkey were determined by GC and GC/MS analyses and invitro antimicrobial activities of these essential oils were investigated in this study. Major component of A. setacea collected from Edirne, Tekirdağ, Niğde, Kırşehir, Kırklareli and Burdur was determined as 1,8-cineole (35.4-48.5-34.3-36.7-38.2-42.3%, respectively). A.setacea collected from Sivas consists chamazulene and the major component was found to be camphor (30.2%). All of the essential oils were tested for invitro antimicrobial activity for 3 gram-positive, 5 gram-negative bacteria and Candida albicans fungus with microdilution method. The essential oils showed antimicrobial activity against Proteus vulgaris, Salmonella thphimurium and Candida albicans with concentration of 5%.*

**Keywords:** *Achillea setacea, Asteraceae essential oil, 1,8-cineole, chamazulene, antimicrobial activity*

## GİRİŞ

*Achillea* L. (Asteraceae), Türkiye Florası'nda, 22'si endemik olmak üzere 42 taksonla temsil edilir (1,2). Bu cinse ait taksonlar uçucu yağ taşımalarının yanısıra alkaloid, flavonoid ve seskiterpenlaktonlar da içermektedir (3). Yapılan çeşitli araştırmalarla bu türlerin spazmolitik, analjezik, antienflamatuvar, antipiretik, kolagog ve hemostatik etkilere sahip olduğu saptanmıştır (4). Bu nedenle özellikle Avrupa'da bazı farmasötik preparatların ve tıbbi çay karışımlarının bileşimine girmektedirler (5). *Achillea setacea* Waldst.&Kit., genellikle tarla ve yol kenarlarında yayılış göstermekte, ipeksi sık tüylere sahip oluşu ve setalı yaprak şekliyle ayırdedilmektedir. Halk arasında "ayvadana", "ayvadani", "mayasılotu" olarak tanınan *A.setacea*'nın kurutulmuş çiçekleri dahilen infuzyon şeklinde hazırlanarak mayasılda, ishal kesici ve yara iyi edici olarak ayrıca karın ağrısına karşı kullanılmaktadır (6-8). *Achillea* gibi yüksek biyoçeşitliliğe sahip olan cinslerin tayininde morfolojik özelliklerin yanısıra uçucu yağ bileşenleri de ilave kriterler olarak kullanılmaktadırlar. Bu taksonun halk arasındaki kullanımının doğrulanabilmesi için biyoaktivite çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, 7 farklı yerden toplanan *A. setacea*'nın kurutulmuş çiçeklerinden elde edilen uçucu yağların GC ve GC/MS analizleri sonucu ana bileşenlerinin saptanması, bu uçucu yağların invitro antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Araştırma materyali olan *A.setacea*, aşağıdaki lokal itelerden toplanarak İZEF (İzmir Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) Herbaryumu'na kaydedilmiştir:

1. Al Edirne, Babaeski- Pehlivan köy yol k., 60m., 21.6.2001 (İZEF5487)
2. Al Tekirdağ, Karacakılavuz -Muratlı yol k., 150m., 19.6.2001 (İZEF5475)
3. B5 Niğde, Altunhisar, Çiftlik yolu, Melediz Dağı, 1700m., 11.7.2001 (İZEF5496)
4. B5 Kırşehir-Mucur, Seyfe Gölü yol k., 1000m, 8.7.2001 (İZEF5499)
5. B6 Sivas-Tokat il sınırı, Çamlıbel geçidi, 1650 m., 15.7.2001 (İZEF5504)
6. Al Kırklareli, Saray-Kıyıköy arası, dere yatağı, 210m., 19.6.2001 (İZEF5476)
7. C2 Burdur, Elmalıyurt, Küçükuyu mevkii, 1675m, 7.7.2000 (İZEF5507)

### *Uçucu yağ eldesi ve GC-MS analizi*

Gölge ve havadar bir yerde kurutulmuş bitkilerin çiçekleri, Clevenger-tip apareyde, 3 saat su distilasyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen uçucu yağların GC analizlerinde FID dedektör donanımlı Hewlett Packard 6890 gaz kromatografi cihazı, GC/MS analizlerinde ise, Hewlett Packard 6890 gaz kromatografi cihazı ile kombine HP 5973 MS dedektörü kullanılmıştır. Analizlerde HP-1 kapiller kolon (25m x 200  $\mu$ m i.d., film kalınlığı 0.33  $\mu$ m) kullanılmış (HP 1909İZ-102), sıcaklık 50°C'den 300°C'ye dakikada 10°C artacak şekilde programlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak 2ml/dak akış hızında helyum kullanılmıştır. Otoenjektör (Agilent 6890) ısısı 150°C, dedektör ısısı ise 250°C'dir. Dilüsyon solvanı hekzan (1:30), enjeksiyon hacmi ise 1  $\mu$ l'dir. Uçucu yağ örnekleri 3'er kez analiz edilmiş, bileşiklerin relatif miktarlarının ortalamaları alınmıştır.

GC/MS analizleri yapılan uçucu yağların bileşenlerinin kütle spektrumları, Wiley 275 L. kütüphanesindeki ve standart uçucu yağ bileşikleriyle oluşturulmuş ARGEFAR uçucu yağ kütüphanesindeki verilerle bilgisayar taraması yapılarak karşılaştırılmıştır. Alifatik hidrokarbon karışımlarının (C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>) heksandaki çözeltisinin (Sigma R8769) ve uçucu yağların GC analizleri yapılmış, saptanan bileşiklerin tutulma zamanları (RT) ve uçucu yağ bileşiklerinin RT değeri ile karşılaştırılarak, indeksleri hesaplanmıştır (9).

Elde edilen uçucu yağların invitro antibakteriyal ve antifungal aktivite incelemesi, 3 gram-pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538/P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), 5 gram-negatif bakteri (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Escherichia coli* ATCC 29998 *Proteus vulgaris* ATCC 6897, *Salmonella thymurium* CMM 5445) ve bir mantar (*Candida albicans* ATCC 10239) kullanılarak Broth dilüsyon yöntemlerinden mikrodilüsyon metodu ile yapılmıştır (10).

Bu yöntemde 150  $\mu$ l lik U tabanlı mikroplateler kullanılmıştır. 24 saatlik bakteri kültürlerinden (bakteri inokulumu her çukurda  $5 \times 10^5$  cfu/ml olacak şekilde) işaretlenmiş çukurlara 50  $\mu$ l ilave edilmiştir. Her çukura, ortamdaki konsantrasyonları %5 olacak şekilde uçucu yağ eklenmiştir. Mikroplate'in üzeri kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (yalnızca *E. cloacea* için 27°C'de). Besiyeri olarak bakteriler için Triptik Soy Broth ve Triptik Soy Ağar, *C.albicans* için Saboroud Dekstroz Broth kullanılmıştır. 24 saat sonra testin kontrolü için her kuyucuktan Triptik Soy Ağar ve *C.albicans* için de Saboroud Dekstroz Agar'a spot ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (yalnızca *E. cloacea* için 27°C'de).

24 saat sonra üreme olması veya olmamasına göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Karşılaştırma amacıyla bakteriler için sulbactam/ampisilin ve amoksisilin, *Candida albicans* için ketokanazol, standart antibiyotikler olarak kullanılmış, her deneme 3 tekrar olarak yapılmıştır.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Türkiye'de yetişen ve 7 farklı yerden toplanan *A.setacea'nın*, kurutulmuş çiçeklerinden hidrodistilasyonla elde edilen mavi renkli uçucu yağ miktarlarının %0.15-0.50 arasında değiştiği saptanmıştır.

Bu uçucu yağların GC ve GC/MS analizleri sonucunda ana bileşen 1,8-sineol olmakla beraber, Sivas'tan toplanan *A.setacea* uçucu yağının ana bileşeninin kafur (%30.2) olduğu saptanmıştır (**Tablo 1**).

**Tablo 1.** Farklı yerlerden toplanmış olan *A.setacea* uçucu yağının ana bileşenleri ve relatif miktarları (%)

Bileşik	RI	1	2	3	4	5	6	7
$\alpha$ -tuyen	927	+	+	0.4	+	+	0.1	0.5
$\alpha$ -pinen	937	0.4	+	0.4	0.8	+	0.9	2.3
kamfen	951	0.5	0.7	0.8	0.8	1.4	1.6	2.3
sabinen	973	-	0.6	1.8	1.3	-	0.5	-
$\beta$ -pinen	978	-	0.5	0.5	0.6	-	0.6	1.0
mirsen	991	-	-	-	-	2.96	-	-
yomogi alkol*	996	11.0	-	-	-	-	-	5.1
$\alpha$ -terpinen	1016	-	-	0.6	0.5	-	0.4	0.6
orto-simen*	1019	1.2	1.5	1.9	0.8	-	2.3	1.2
<b>1,8-sineol</b>	1035	<b>35.4</b>	<b>48.5</b>	<b>34.3</b>	<b>36.7</b>	12.7	<b>38.2</b>	<b>42.3</b>
$\gamma$ -terpinen	1058	-	0.6	1.1	1.0	-	0.5	1.0
artemisya alkol	1082	7.4	-	-	-	-	-	1.7
terpinolen	1094	-	-	-	-	-	-	1.0
$\alpha$ -tuyon	1103	3.1	-	-	-	-	7.2	-
$\beta$ -tuyon	1113	1.6	-	-	-	-	0.8	-
krizantenon	1123	1.2	0.7	-	-	-	2.8	-
terpinen-1-ol*	1133	-	-	-	-	-	0.3	-
<b>kafur</b>	1142	5.2	8.3	7.4	16.2	<b>30.2</b>	11.5	15.6
kamfen hidrat*	1148	-	-	0.4	4.6	-	-	-
sis-krizantenol	1159	-	-	-	0.7	-	-	-
trans- $\beta$ -terpineol*	1163	-	-	-	3.9	-	-	-

borneol	1169	11.7	4.6	1.8	2.5	-	9.2	1.5
terpinen-4-ol	1179	1.4	2.3	3.9	4.0	1.7	1.6	3.0
a-terpineol	1190	1.8	3.5	4.5	9.7	2.1	1.8	2.7
fraganol	1216	-	17.2	0.4	1.2	-	2.4	-
piperiton	1251	4.5	-	-	-	-	3.1	11.4
linalol asetat	1278	-	-	-	-	2.2	-	-
bornil asetat*	1287	5.0	2.8	-	-	6.7	1.5	0.4
(E)-yasmon	1390	-	-	-	-	-	0.3	-
(E)- $\beta$ -famesen	1455	-	-	-	-	1.2	-	-
a-selinen	1496	-	0.9	-	-	1.2	-	-
spatulenol	1599	-	1.0	-	-	1.8	-	-
karyofillen oksit <sup>1</sup>	1608	1.6	3.5	1.7	2.5	11.6	1.4	0.7
$\beta$ -odesmol	1677	-	-	2.8	1.9	-	-	-
$\alpha$ -bisabolonoksit-A	1682	-	-	10.3	2.3	-	-	-
epi- $\alpha$ -bisabolol	1699	-	-	-	-	7.6	-	-
karyofillen asetat*	1704	-	-	23.4	7.2	-	-	-
kamazulen	1761	-	-	-	-	+	-	-

*LA.setacea* (Edirne, İZEF5487), *LA.setacea* (Tekirdağ, İZEF5475), *3A.setacea* (Niğde, İZEF5496), *LA.setacea* (Kırşehir, İZEF5499), *5A.setacea* (Sivas, İZEF5504), *LA.setacea* (Kırklareli, İZEF5476), *LA.setacea* (Burdur, İZEF5507), RI:HP-1 kolondaki tutulma indisleri, + eser miktarda, 'GC/MS verilerine göre, \*RI değerine göre tanımlama yapılmıştır.

Taze ve kuru *A.setacea* bitkisi örneklerinde hasat zamanına göre değişen miktarlarda uçucu yağ elde edilebildiği ve kamazulen içeriğinin çiçeklenme döneminde maksimuma ulaştığı belirlenmiştir (11). Proazulenlerin sıcaklık etkisiyle azulenlere dönüştüğü ve açık mavi renkli uçucu yağlarda kamazulen miktarının çok düşük olduğu bilinmektedir (4,12). Bu taksonlara ait uçucu yağların GC ve GC/MS metodları ile analiz edilmeleri sonucu kamazulen bileşiğinin, sadece koyu mavi renkli *A.setacea* (İZEF5504) uçucu yağında eser miktarda bulunduğu saptanmıştır. 7 farklı yerden toplanmış olan örneklerden elde edilen bu uçucu yağlar, yüksek miktarda 1,8-sineol ve kamfor içerikleri ile dikkat çekmektedir. Ankara-Çerkes arası yol kenarından toplanmış olan *A.setacea* uçucu yağında çok daha düşük oranda (%7.8) 1,8-sineol bulunduğu rapor edilmiştir. (13). Bir başka çalışmada ise Sivas yakınlarından toplandığı belirtilen *A.setacea* uçucu yağının analizinde ana bileşenin ökaliptol (1,8-sineol) olduğu belirtilmekte (%18.5) fakat mavi renkli uçucu yağın kamazulen içeriğinden söz edilmemektedir (14).

Bitkilerin içermiş olduğu uçucu yağ miktarları, iklim, toprak cinsi, bitkinin gelişim dönemi, toplama zamanı ve distilasyon metodlarına göre farklılıklar göstermektedir (15). Aynı şekilde bileşimleri ve içerdiği bileşiklerin oranları da, genetik ve çevresel faktörlere, ayrıca analizlerde kullanılan metoda göre değişmektedir (16). Birçok bileşikten oluşan ve karmaşık bir yapıya sahip olan uçucu yağların, çeşitli analiz yöntemleri ile saptanan bileşimlerinin değişkenliği, özellikle *Achillea* gibi yüksek biyoçeşitliliğe sahip olan taksonlarda daha da ön plana çıkmaktadır. Türkiye'deki farklı yerlerde yetişen *A.setacea* uçucu yağının analizleri ile elde ettiğimiz sonuçlarda göze çarpan çeşitlilik, bu durumu bir kez daha ortaya koymaktadır.

Farklı lokalitelerden toplanmış olan *A.setacea*'ya ait uçucu yağların %5'lik konsantrasyonda *Proteus vulgaris*, *Salmonella thyphimurium* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları saptanmış, gram-pozitif mikroorganizmalara karşı ise bir etki saptanamamıştır. (Tablo 2).

**Tablo 2.** *A. setacea* uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi

Uçucu yağ n o	1	2	3	4	5	6	7
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538/P	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 29998	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC6897	+	+	+	-	-	+	
<i>Salmonella thyphimurium</i> CMM 5445	+	+	+	+	-	+	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10239	+	+	+	+	+	+	+

*1A.setacea* (Edirne, İZEF5487), *1A.setacea* (Tekirdağ, İZEF5475), *1A.setacea* (Niğde, İZEF5496), *1A.setacea* (Kırşehir, İZEF5499), *5A.setacea* (Sivas, İZEF5504), *6.A.setacea* (Kırklareli, İZEF5476), *7.A.setacea* (Burdur, İZEF5507), - : etki yok, üreme var, + : etki var, üreme yok

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kültür ortamı, test tekniği, kullanılan bitkinin kurutulmuş veya taze oluşu, testte kullanılan uçucu yağ miktarı, bu uçucu yağın elde edilme yöntemi ile süresi, aktivite üzerinde değişikliklere neden olan faktörlerdir. *A.seraceae* ve *A.teretifolia* ile yapılan bir çalışmada da farklı mikroorganizmalar ile uçucu yağların disk difüzyon ve MIC değerlendirmesi sonucunda çalışmamızı destekler sonuçlara rastlanmıştır (14). Uçucu yağların antibakteriyel aktivitesinin, uçucu yağ bileşimindeki yüksek 1,8-sineol varlığı ile, uçucu yağ bileşiminde yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olan borneol ve linalol gibi minör bileşiklerin bulunması ile ya da tüm bileşiklerin sinerjik bir etkisi ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (14,15). *A.setacea* uçucu yağının yüksek miktarda 1,8-sineol ve kafur içerdiği saptanmıştır. Sonuç olarak saptanan antibakteriyel ve antifungal aktiviteler, bu bitkilerin bazı enfeksiyonlara karşı geleneksel kullanımını destekler niteliktedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma E.Ü. ilaç Geliştirme ve Farmakokinetik Uygulama-Araştırma Merkezi'nde (ARGEFAR) gerçekleştirilmiş ve E.Ü. Araştırma Fonu (proje no:2000/ECZ/016) tarafından desteklenmiştir. İç Anadolu Bölgesi'nden temin ettiği *A.setacea* örnekleri için Uzm. Ecz. Bintuğ ÖZTÜRK'e, GC ve GC/MS analizlerindeki yardımları için Sağ. Tekn. Bülent ÖLMEZ'e, ayrıca çalışmanın her aşamasındaki destek ve yardımları için Prof.Dr. Işık TUĞLULAR'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. **Huber-Morath A.** "*Achillea* L". in Davis P.H., (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol.5, University Press, Edinburgh, 224-252 (1975)
2. **Duman H.**, "*Achillea* L" . in Güner A., Özhatay N., Ekim T., Başer K.H.C. (Editors), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (supp. 2), vol.11, University Press, Edinburgh, 158-159 (2000)
3. **Kastner U., Glasl S. and Jurenitsch J.**, "*Achillea millefolium*-ein Gallentherapeuticum?", *Zeitschrift für Phytoterapie* 16, 34-39 (1995)
4. **Newall C.A., Anderson L.A. and Phillipson J.D.**, *Herbal Medicines*, The Pharmaceutical Press, London, p.271 (1996)
5. **Gruenwald J., Brendler T. and Jaenicke C.**(Editors), *PDR for Herbal Medicines*, Medical Economics Company Inc., Montvale, p.833-835 (2000)

6. **Fujita T., Sezik E., Tabata M., Yeşilada E., Honda G., Takeda Y., Tanaka T., and Takaishi Y.** "Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west Black Sea region", *Econ. Bot.* 49 (4), 406-422 (1995)
7. **Akalm E.**, "Tekirdağ İli'nde ilaç ve gıda olarak kullanılan bitkiler", İ.Ü. Sağ. Bil. Ens. yüksek lisans tezi (1993)
8. **Baytop T.**, Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi, 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti., İstanbul, s.176(1999)
9. **Adams R.P.**, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Illinois, (1995)
10. **Cruickshank R., Duguid I.P., Marmion B.P. and Swain R.H.A.**, Medical Microbiology vol.II, 12<sup>nd</sup> Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York (1975)
11. **Turysheva N.A. and Fedorovich N.N.**, "Essential oil and chamazulene content depending on the development phase during harvest and storage duration of milfoil", *Izvestiya-vyssshikh-Uchebnykh-Zavedeniü,- Pishchevaya-Tekhnologiya*, 5/6, 20-21 (1996)
12. **Hofmann L., Fritz D., Nitz S. Kollmannsberger H. and Drawert F.** "Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* Complex", *Phytochem.*, **31(2)**, 537-542(1992)
13. **Küsmenoğlu Ş., Başer K.H.C. and Özek T.**, "Analysis of *Achillea setacea* Waldst. &Kitt. essential oil" in Franz C, Mathe A., Buchbauer G. (Eds), *Proceedings of the 47<sup>th</sup> Int. Sym. on Essential Oils*, Vienna, 201 (1997)
14. **Ünlü M., Daferera D., Dönmez E., Polissiou M., Tepe B. and Sökmen A.**, "Composition and in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *A.teretifolia* (Compositae)", *J. Ethnopharm.*, 83, 117-121 (2002)
15. **Cimanga K. Kambu K. and Tona L.** ", Correlations between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo" *J. Ethnopharm.*, 79, 213-220 (2002)
16. **Maffei M., Chialva F. and Codignola A.**, "Essential oils and chromosome numbers from Italian *Achillea* species", *J. Ess. Oil Res.*, 2, 57-64 (1989)

Received: 24.02.2003

Accepted: 26.03.2003