

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *LONGIFOLIA* (L.)
HUDSON VE *MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *TYPHOIDES*
(BRIQ.) HARLEY VAR. *TYPHOIDES* (L.) HUDSON'IN BOTANİK
ÖZELLİKLERİ, YAPRAK EKSTRELERİNİN KİMYASAL İÇERİĞİ VE
ANALJEZİK AKTİVİTESİ**

**Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Programı
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Doç.Dr. Gözde ELGİN CEBE**

Biy. Fethi GEÇİMLİ

**İZMİR
2017**



**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *LONGIFOLIA* (L.)
HUDSON VE *MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *TYPHOIDES*
(BRIQ.) HARLEY VAR. *TYPHOIDES* (L.) HUDSON'IN BOTANİK
ÖZELLİKLERİ, YAPRAK EKSTRELERİNİN KİMYASAL İÇERİĞİ VE
ANALJEZİK AKTİVİTESİ**

**Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Programı
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Doç.Dr. Gözde ELGİN CEBE**

Biy. Fethi GEÇİMLİ

**İZMİR
2017**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan: Doç. Dr. Gözde ELGİN CEBE

.....

Üye: Prof. Dr. Şükran KÜLTÜR

.....

Üye: Prof. Dr. Canan KARAALP

.....

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

.....

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek veren ve büyük sabırla problemleri çözerek tez çalışmamı sonuçlandırmama yardım eden, deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Doç. Dr. Gözde ELGİN CEBE' ye teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma eğitimim boyunca öğrettikleri bilgilerden dolayı ve deneyimlerini paylaştıkları için teşekkür ederim.

Biyoaktivite çalışmalarımnda laboratuvar ortamı sağlayan, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Prof. Dr. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU'na teşekkür ederim. Taksonların teşhisine katkılarından dolayı Doç. Dr. Serdar Gökhan ŞENOL'a ve Uzm. Biy. Volkan EROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim. Analitik çalışmalarımndaki desteklerinden ötürü Yük. Kim. Müh. Çiğdem YENGİN'e ve tüm FABAL ekibine şükranlarımı sunarım. Laboratuvar çalışmalarımnda ve sarf malzemelerin zamanında temin edilmesinde vermiş oldukları destekten dolayı Arş. Gör. Dr. Serdar DEMİR'e ve Uzm. Biy. Selin AKTAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca uzak kaldığım halde her zaman yanımda olan aileme minnettarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu Bilimsel Araştırma Projesi olarak kabul edilmiş ve desteklenmiştir (Proje No: 15-ECZ-001). Katkılarından dolayı Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederim.

İzmir-2017

Fethi GEÇİMLİ

ÖZET

***MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *LONGIFOLIA* (L.) HUDSON VE *MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *TYPHOIDES* (BRIQ.) HARLEY VAR. *TYPHOIDES* (L.) HUDSON'IN BOTANİK ÖZELLİKLERİ, YAPRAK EKSTRELERİNİN KİMYASAL İÇERİĞİ VE ANALJEZİK AKTİVİTESİ**

İlaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde yararlanılan *Mentha longifolia* L.'nın yaprak, çiçek, gövde ve tohumları halk arasında sindirim problemlerinin giderilmesinde ve mide spazmlarında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, Giresun'un Dereli İlçesi Kümbet Köyü'ndeki Uzundere kenarından toplanan *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson ve *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson taksonlarının botanik özellikleri ortaya konmuş olup, her iki taksona ait uçucu yağ içerikleri GC-MS ile belirlenmiştir. Ana bileşenler, ilk takson için; menton, izomenton, pulegon olarak, ikinci takson için ise; menton, izomenton, pulegon, cis-piperiton oksit olarak saptanmıştır.

Ayrıca bu iki alt türün su ve metanol ekstraktları mikrodalga, Soxhlet ve ultrasonik banyo yöntemleriyle elde edilmiştir. Ekstrelerin toplam fenol ve flavonoid miktarları UV Vis spektrofotometre cihazıyla tespit edilmiş olup, fenolik bileşikler ve flavonoidler UHPLC yardımıyla ortaya konmuştur. Ekstraksiyonda kullanılan yöntemler karşılaştırıldığında; en yüksek fenol içeriğinin ultrasonik ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktlarda olduğu saptanmıştır. Sulu ve metanolik ekstraktlar arasında ise metanolik ekstraktların toplam fenol miktarlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (177.6 ± 0.04 mg/g). Söz konusu taksonlar kıyaslandığında; *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides*'in, *Mentha longifolia* subsp. *longifolia*'dan daha yüksek oranda fenolik madde içerdiği saptanmıştır. Toplam fenol ve flavonoid bakımından en zengin ekstraktlar olan metanol ekstraktlarının analjezik etkileri ilk aşamada formalin testi ile belirlenmiş olup, en etkili ekstre saptanmıştır. En yüksek etkiyi gösteren TYP metanolik ekstresinin antinosiseptik etkisi hot plate testiyle belirlenmiştir. Akut toksisite testi için Lorke metodu kullanılmıştır. 48 saat sonunda hem TYP hem de LONG ekstraktlarında herhangi bir ölüm gözlenmemiştir. Bunun sonucu olarak $LD_{50} > 3200$ mg/kg olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Mentha longifolia*, Fenol, Analjezik aktivite

ABSTRACT

BOTANICAL PROPERTIES OF *MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *LONGIFOLIA* (L.) HUDSON AND *MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. *TYPHOIDES* (BRIQ.) HARLEY VAR. *TYPHOIDES* (L.) HUDSON, CHEMICAL CONTENTS AND ANALGESIC ACTIVITIES OF THEIR LEAVES EXTRACTS

The leaves, flowers, stems and seeds of *Mentha longifolia* L., which are used in the pharmaceutical, food and cosmetic industries, are used in the digestion problems and gastric spasms among the public.

In our study; The botanical characteristics of the *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson and *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson, where collected from Uzundere in Kümbet Village of Dereli District of Giresun, have been established and the volatile oil contents of both taxa have been determined by GC-MS. Main components of the first taxon are menton, isomentone, pulegon and for the second taxon are menton, isomenthone, pulegone, cis-piperitoneoxide were determined.

In addition, water and methanol extracts of these two subspecies were obtained by microwave, soxhlet and ultrasonic bath methods. Total phenol and flavonoid amounts of the extracts were carried out by UV-Vis spectrophotometer device and phenolic compounds, flavonoids of extracts were carried out by UHPLC device. When the methods used in extraction are compared; it was determined that the highest phenol content of extract from ultrasonic extraction. Phenolic contents of methanolic extracts were found higher than aqueous extracts (177.6 ± 0.04 mg/g). Rate of phenolic contents of *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides* (TYP) was found that higher than *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* (LONG). The analgesic effects of methanol extracts, were determined by formalin test in the first stage. After the most effective extract was found. The antinociceptive effect of the highest efficacious extract (TYP methanol extracts) was determined by using hot plate test. Lorke method was used for acute toxicity test. No deaths were observed in both TYP and LONG extracts after 48 hours. As a result, LD₅₀ was determined to be >3200 mg/kg.

Key words: *Mentha longifolia*, Phenol, Analgesic activity

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
RESİMLER DİZİNİ	XII
SEMBOLER VE KISALTMALAR	XIII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri	4
2.2. <i>Mentha</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	5
2.3. <i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson'ın Dünyada ve Türkiye'de Yayılışı.....	10
2.4. <i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson Alt Türlerine Ait Tayin Anahtarı	10
2.5. <i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson'ın Morfolojik ve Anatomik Özellikleri	13
2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri	13
2.7. <i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson'nın Halk Arasındaki İsimleri ve Kullanımı.....	24
2.8. Taksonlar İle İlgili Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları	27
2.9. Kromatografik Yöntemler	28
2.10. Ağrının Tanımı, Sınıflandırılması ve Mekanizması	34
2.11. Ağrı Kesici Etkiye Sahip Bitkiler	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1. Kullanılan Gereçler	38
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.3. Bitkisel Materyal	40
3.4. Taksonların Botanik Yönden İncelenmesi	40
3.5. Taksonların Kimyasal Yönden İncelenmesi	40
3.6. Antinosiseptif Aktivite Çalışmaları.....	43
4. BULGULAR	44
4.1. Morfolojik ve Anatomik Bulgular	44
4.2. Kimyasal Bulgular	54
4.3. Antinosiseptif Aktivite Bulguları	63

5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
7-KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	86



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-1: *Mentha* Türlerinde Saptanan Fenolik Bileşikler

Tablo-2: *Mentha* türlerinin uçucu yağlarının majör bileşenleri

Tablo-3: *Mentha* türlerinin farmakolojik etkileri

Tablo-4: Farklı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan deney koşulları

Tablo-5: Mikrodalga ekstraksiyon parametreleri

Tablo-6: UHPLC gradient tablosu

Tablo-7: Mikrodalga ekstraksiyon sonucu

Tablo-8: Ultrasonik ekstraksiyon sonucu

Tablo-9: Soxhlet ekstraksiyon sonucu

Tablo-10: Ekstrelerin kateşin ve rozmarinik asit miktarları

Tablo-11: LONG uçucu yağ majör bileşenleri

Tablo-12: TYP uçucu yağ majör bileşenleri

Tablo-13: LONG uçucu yağ bileşenleri

Tablo-14: TYP uçucu yağ bileşenleri

Tablo-15: Formalin test sonucu

Tablo-16: Hot Plate test sonucu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Kafeik asit	25
Şekil-2: Gallik asit	25
Şekil-3: Rozmarinik asit	25
Şekil-4: Apigenin.....	25
Şekil-5: Kateşin	26
Şekil-6: Rutin.....	26
Şekil-7: Kersetin	26
Şekil-8: Luteolin	27
Şekil-9: Menton	27
Şekil-10: Pulegon.....	27
Şekil-11: Piperiton	27
Şekil-12: Piperiton oksit	27
Şekil-13: Toplam fenolik kalibrasyon eğrisi	61
Şekil-14: Toplam flavonoit kalibrasyon eğrisi	61
Şekil-15: Standartlara ait kromatogram.....	62
Şekil-16: Kateşin kalibrasyon grafiği	62
Şekil-17: Rozmarinik asit kalibrasyon grafiği	62
Şekil-18: Ekstrelelere ait kromatogramlar.....	63
Şekil-19: Alkan karışımı GC-MS kromatogramı	64
Şekil-20: LONG GC-MS kromatogramı	65
Şekil-21: TYP GC-MS kromatogramı.....	65
Şekil-22: Mentol GC-MS kromatogramı.....	65
Şekil-23: Pulegon GC-MS kromatogramı	66
Şekil-24: Piperiton GC-MS kromatogramı.....	66

RESİMLER DİZİNİ

Resim-1: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>longifolia</i> (L.) HUDSON	11
Resim-2: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>typhoides</i> (BRIQ.) HARLEY var. <i>typhoides</i> (L.) HUDSON	13
Resim-3: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>longifolia</i> (L.) HUDSON	13
Resim-4: Mikrodalga ekstraksiyon cihazı.....	16
Resim-5: Mikrodalga çalışma prensibi	16
Resim-6: Ultrasonik banyo	17
Resim-7: Ultrasonik prob.....	17
Resim-8: Ultrasonik prob donanımı.....	17
Resim-9: Ultrasonik banyo donanımı	18
Resim-10: Soxhlet aparatı	18
Resim-11: Clevenger aparatı.....	19
Resim-12: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>typhoides</i> (BRIQ.) HARLEY var. <i>typhoides</i> (L.) HUDSON	44
Resim-13: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>typhoides</i> (BRIQ.) HARLEY var. <i>typhoides</i> (L.) HUDSON	45
Resim-14: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>typhoides</i> (BRIQ.) HARLEY var. <i>typhoides</i> (L.) HUDSON	45
Resim-15: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>longifolia</i> (L.) HUDSON	46
Resim-16: <i>Mentha longifolia</i> (L.) HUDSON subsp. <i>longifolia</i> (L.) HUDSON	46
Resim-17: Kıvrımlı-dalgalı duvarlı epidermis hücreleri (yaprak yüzeysel kesit, 1000X büyütme).....	47
Resim-18: Yaprak kenarının yakınındaki epidermis hücreleri (yaprak yüzeysel kesit, 400X büyütme)	47
Resim-19: Diasitik stomalar (yaprak yüzeysel kesit, 1000X büyütme).....	48
Resim-20: Diasitik stomalar (yaprak yüzeysel kesit, 1000X büyütme).....	48
Resim-21: Labiatae tipi salgı tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 1000X büyütme)	49
Resim-22: Labiatae tipi salgı tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400X büyütme)	49
Resim-23: Labiatae tipi salgı tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 1000X büyütme)	50
Resim-24: Labiatae tipi salgı tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 1000X büyütme)	50
Resim-25: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400X büyütme).....	51
Resim-26: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400X büyütme).....	51
Resim-27: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400X büyütme).....	52
Resim-28: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400X büyütme).....	52
Resim-29: İnce tabaka kromatografisi (Uçucu yağ sonucu)	53
Resim-30: İnce tabaka kromatografisi (Metanol ekstresi sonucu).....	54

SEMBOLER VE KISALTMALAR

A7R: Apigenin 7-*O*-rutinosidin

AC: Akridin

ACh: Asetilkolin

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

E. coli: *Escherichia coli*

EMS: Etil metan sülfonat

FSH: Folikül uyarıcı hormon

GC: Gaz kromatografisi

GC-MS: Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HPTLC: Yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi

HSCCC: Yüksek hızlı karşı akım kromatografisi

IBS: İrritabl barsak sendromu

LNCaP: Prostat kanseri hücre hattı

LONG: *Mentha longifolia* (L.) HUDSON subsp. *longifolia* (L.) HUDSON

MAE: Mikrodalga destekli ekstraksiyon

MAHD: Mikrodalga yardımıyla hidrodistilasyon

MCF-7: Meme kanseri hücre hattı

MDA: Malondialdehit

MECC: Misellar elektrokinetik kılcal kromatografi

MS: Milattan sonra

MSS: Merkezi sinir sistemi

OAHD: Ohmik yardımıyla hidrodistilasyon

PMAE: Basınçlı mikrodalga ekstraksiyon

RPIPC-HPLC: Ters faz iyon değişim HPLC

SAX-HPLC: Güçlü anyon değişim HPLC

SEC: Düşük basınç boyut ayırma kromatografisi

SFMAE: Çözücü içermeyen mikrodalga destekli ekstraksiyon

TA: Ames *Salmonella* testi

TLC: Kromatografik parmakizi, İnce tabaka kromatografisi

TYP: *Mentha longifolia* (L.) HUDSON subsp. *typhoides* (BRIQ.) HARLEY var. *typhoides* (L.) HUDSON

UHPLC: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi

UV-Vis: Görünür Bölge & Morötesi Spektroskopisi

1.GİRİŞ

Bitkilerin tedavi amacıyla kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. İlkçağlardan günümüze değin insanoğlu, çevresinde bulunan bitkilerden farklı amaçlarla ve çeşitli şekillerde yararlanmış ve bu bilgilerini nesilden nesile aktarmıştır. Bu arada kendileri için önem taşıyan ve çok tüketilen bitkilerin kültürünü yaparak daha verimli ve kaliteli ürün elde etmeye yönelmişlerdir (1,2,3).

Yontma taş devri, Sümer, Akad ve Asurlar (M.Ö. 50.000-3000) dönemlerine ait arkeolojik materyaller bu bilgileri kanıtlamaktadır. M.Ö. 1550’de yazılmış bir papirüste 450 kadar hastalık kaydı ile bu hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkisel ve hayvansal droglar bulunmaktadır. M.Ö. 1500 yıllarına ait Hitit tabletlerinde bulunan reçetelerde adamotu, alıç, arpa, buğday, safran, sarımsak gibi pek çok bitkiye rastlanmaktadır (4,5-7,8).

Hipokrat (M.Ö. 460-377) eserlerinde tedavide kullanılan 400 bitki türünden söz etmiştir. Dioskorides’in (MS 90) birinci yüzyıla ait, “Materia Medica” adlı eserinde 500 kadar tıbbi bitkinin tarifi verilmekte ve tedavi özellikleri anlatılmaktadır. Bu kitap Anadolu tıbbi bitkileri hakkında bilinen en eski kaynaktır. Galen (MS 130-210) ise eserlerinde kendi geliştirdiği bitkisel kökenli yeni preparat ve formüllere yer vermiştir (4,9,10-12).

İslam uygarlığı döneminde ise Ebu Biruni, İbn-i Sina ve İbn-i Baytar gibi büyük hekimler yetişmiştir. İbn-i Sina (980-1037) 100’den fazla bilimsel eser bırakmıştır. En büyük eserleri “Şifa” ve “Kanun fit-Tıb”dır. Bu eserlerde 900’den fazla tıbbi bitki, hayvansal ve inorganik kökenli ilaç yer almaktadır (4).

19. yüzyılda tıbbi bitkiler üzerinde önemli çalışmalar yapılmıştır. Zamanla alkaloitler, glikozitler, saponinler ve reçineler gibi metabolitlerin izolasyonu gerçekleşmiş, ilaç sanayindeki gelişmeler sonucunda vitaminler ve antibiyotiklerin keşfi bilimde yeni sayfalar açmıştır (13).

Kısaca “tıbbi bitkilerle tedavi” anlamına gelmekte olan “Fitoterapi” terimi ilk defa Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) tarafından kullanılmıştır. Hastalıkların, tedavi edici değere sahip taze veya kurutulmuş bitki kısımları (drog) ya da bunlardan elde edilen ekstraksiyon ürünleri kullanılarak üretilen çay, damla, draje kapsül, şurup ve tablet ile tedavi edilmesi “Fitoterapi” olarak tanımlanmaktadır (14).

Bitkilerin tedavi etkileri hakkındaki araştırmalar halen sürmektedir. Analiz ve kalite kontrol yöntemleri ile klinik araştırmalardaki ilerlemeler bitkilerle tedavi ve

hastalıkların önlenmesi konusuna gün geçtikçe yeni değerler ve ilerlemeler kazandırmaktadır.

Dünyada sayısı 750.000–1.000.000 arasında olduğu tahmin edilen bitki türünün 500.000 kadarı tanımlanıp isimlendirilmiştir. Her yıl 2000 civarında yeni tohumlu bitki türü tanımlanmaktadır.

3 farklı floristik bölgeye sahip olan ülkemiz, coğrafi konumu, jeolojik yapısı, toprak özellikleri ve farklı iklim bölgeleri nedeniyle 11.707 bitki türünün doğal olarak yetiştiği, zengin bir floraya sahip ender ülkelerdendir. Yurdumuz %31,3'lük endemizm oranıyla da endemik türlerce en zengin ülkelerden biridir. Türkiye Florası türce zengin cinsler ve cinsce zengin familyalardan oluşmuştur. Ayrıca yurdumuz cins, sekiyon ve diğer taksonomik grupların oluşumunda ilk ve ikinci özelleşme merkezidir. Ülkemiz ağaç türlerince de oldukça zengin olup, pek çok meyve ağacının gen kaynağını oluşturmaktadır (15).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün raporuna göre, dünyada tıbbi amaçlarla kullanılan yaklaşık 70.000 bitkinin 21.000 kadarı ilaç sanayinde kullanım bulmaktadır. Ülkemizde çoğu doğal yayılış gösteren türlerin yalnızca 1000 kadarı tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Farmakopeye kayıtlı bitki sayısı ise 200'den fazladır. En fazla drog dışsatımı yapan 12 ülke: Çin, Hindistan, ABD, Almanya, Meksika, Mısır, Şili, Bulgaristan, Singapur, Fas, Pakistan ve Türkiye'dir (1,16,17).

Mentha longifolia, Lamiaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Akdeniz, Avrupa, Avustralya ve Kuzey Afrika'da yaygın olarak bulunmaktadır. Ülkemizde de geniş yayılış gösteren *Mentha longifolia* Türkçe'de "it nanesi" uluslararası platformda ise "horsemint" olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda yurdumuzda daha geniş alanlarda tarımının yapılması için çalışmalar sürdürülmektedir (18-20).

Bitkinin taze ya da kurutulmuş sürgün ve yaprakları çay şeklinde tüketilmekte, ayrıca baharat olarak da oldukça fazla kullanılmaktadır. Uçucu yağının bileşiminde bulunan mentol ve benzeri bileşiklerden dolayı, ilaç, gıda, parfüm, diş macunu, cıklet ve içki yapımında da kullanıldığı bilinmektedir (21).

Bitkinin yaprakları ve çiçekli sürgünleri, infüzyon, sıvı ekstre, şurup, esans şeklinde ve suyu sıkılarak kullanılmaktadır. Kuvvet verici, hazmı kolaylaştırıcı, öksürük giderici, yatıştırıcı, gaz giderici, bulantıyı önleyici, ishale ve kasılmalara karşı etkili olduğu belirtilmiştir. Tarihte özellikle baş ağrısı olmak üzere çeşitli ağrılar için kullanıldığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, antimikrobiyal etkili olduğu ve gastrointestinal sistem ile sinir sistemi üzerinde etki gösterdiği

saptanmıştır. Terapötik dozda herhangi bir yan etkisine rastlanmamıştır. Ancak bu çalışmalar, klinik çalışmalarla desteklenmelidir (22, 23).

Ülkemizde *Mentha longifolia*'nın farmakolojik etkileri üzerine çok sayıda çalışma bulunmamakla birlikte, son yıllarda bu çalışmaların arttığı gözlemlenmiştir. Araştırmalarda, üretimine, kimyasal yapısının aydınlatılmasına, pre-klinik ve klinik çalışmalara yer verilmektedir.

Bu tez çalışmasında *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson ve *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson'ın botanik özellikleri, yaprak ekstrelerinin kimyasal içeriği ve analjezik aktivitesi araştırılmıştır.

Doğal yayılış ortamlarından bitki örneklerinin toplanması ile gerçekleştirilen çalışmalarımızın; iyi tarım uygulamaları çerçevesinde üretilecek kültür bitkilerinin, kimyasal içerik ve farmakolojik etki yönünden araştırılması ile devam etmesi hedeflenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri

Lamiaceae (Labiatae), Lamiales ordosunun en zengin familyalarından biridir. 236 cins ve 7.000'den fazla tür içermektedir. En geniş cinsler; *Salvia* (900), *Scutellaria* (360), *Stachys* (300), *Plectranthus* (300), *Hyptis* (280), *Teucrium* (250), *Vitex* (250), *Thymus* (220) ve *Nepeta* (200)' dır. Familyanın taşıdığı isim, alt dudak ile üst dudak arasında yapışık olarak bulunan petallerinden dolayı verilmiştir. Lamiaceae, sıcak ve ılıman bölgelerde geniş alanlarda yayılış gösteren ve etnobotanik açıdan önemli olan familyalardan biridir. Familya üyeleri otsu, yarı çalimsı veya çalimsı, aromatik bitkilerdir (24-26).

Uçucu yağlar baharat, pestisit, ilaç, parfümeri ve kozmetik sanayinde önemli bir yere sahiptir. DSÖ tarafından yapılan araştırmada tıbbi ve aromatik bitkilerin küresel nüfusun %70 ile %80'i tarafından kullanıldığı belirtilmektedir. Bu bitkilerin, analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar, antifungal, antispazmodik, antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antiasmatik, antidiyareyik, antiseptik, karminatif, analjezik, hemostatik, antihelmintik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (27-32).

Lamiaceae familyasında bulunan ve tedavi amaçlı kullanılma potansiyeline sahip olan bitkilere, uçucu yağında ana bileşen olarak sineol içeren *Ocimum sanctum*, mentol ve limonen içeren *Mentha piperita*, karvon, limonen ve sineol içeren *Mentha spicata* ile timol ve karvakrol içeren *Thymus* türleri verilebilir. Fenolik asit, tanen, flavonoidler bu familyadaki diğer biyoaktif fitokimyasallardır (25).

Familyanın morfolojik özelliklerine göz atılacak olursa, yapraklar dekussat dizilişli, stipulasız, basit, bazen pinnat, çiçekler, bilateral simetride dizilmiş 5 petal ve 5 sepalden oluşur. Çiçekler erselik veya ginodioik bitkilerde erkek organlar verimsizdir. Çiçek durumu braktelerin veya üstteki yaprakların koltuğundan çıkan kimoizler halinde ve genelde yalancı çevrel çiçek durumu olan vertisillastrumlarda, spika, kapitulum, rasemus veya kimoiz şeklinde yoğunlaşmıştır (25, 33, 34).

Brakteler floral yapraklardan tamamen farklı ya da benzerdir. Brakteol var veya yoktur. Kaliks genellikle 5 loplu, üstte 3, altta 2 dişli, nadiren loplar 1+1 veya 1+4 veya kaliks aktinomorf, dişleri yumuşak veya dikensi çıkıntılıdır. Kaliks 5-20 damarlı olup, türlerin ayırımında bu damarların sayısı ve bağlantıları kullanılmaktadır. Korolla gamopetal, zigomorf, bilabiata, belirsiz olarak üst dudak (miğfer) 2 loplu, düz veya $\pm$ konkav, alt dudak (labellum) 3 loplu; nadiren üst dudak indirgenmiş veya alt

dudak 5 loplu ya da üst indirgenmiş belirsiz 2 dişli, alt dudak 3 dişlidir. Bazı üyelerde ise, korolla iki dudaklı olmayıp 5 eşit dişe ayrılmıştır (34).

Bazı nadir egzotik türler dışında, andrekeumda arkadaki stamen iz bırakmadan kaybolmuştur. Stamenler korollaya yapışık, 4 adet ve didinam veya 2 adet olup, bu durumda staminodyumlar bulunur. Didinam tip andrekeumda, 2 büyük stamen önde veya arkada olur. Stamenler korolla tüpünün içinde veya dışında olabilir. Anter tekası 2 veya bazen 1 odacıklı, paralel veya ayırık, nadiren uzamış bir konnektif ile ayrılır (34).

Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli, 4 loplu ve 4 ovüllüdür. Stilus ginobazik (nadiren değil), bazen hafifçe üstten ikiye ayrılmıştır. Meyve 4 (nadiren daha az) kuru veya nadiren etli nutletli, ıslatıldığında müsilağlı veya değildir (34).

2.2. *Mentha* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Mentha türleri; Lamiaceae familyasına ait çok yıllık (nadiren tek yıllık), otsu ve aromatik bitkilerden oluşmaktadır. Çoğunlukla ılıman ve subtropikal bölgelerde yayılmıştır. Avrupa, Afrika, Asya, Avustralya ve Kuzey Amerika'da yayılış göstermektedir. *Mentha* cinsi, toprak üstü organlarında bulunan salgı tüylerinden salgılanan uçucu yağlarının karakteristik kokusuyla bilinmektedir.

İlk melez tür olan *Mentha piperita* Raius (1696) tarafından tanımlanmıştır. Linnaeus (1751) ise 10 hibrit tür ve 3 hibrit varyete tanımlamıştır. Zaman içinde bu cinse ait taksonlar için çoğu eş anlamlı 3000'den fazla isim kullanılmıştır. *Mentha* cinsinin taksonomisi, fenotipik plastisitesi, genetik çeşitliliği ve türlerin çapraz hibritler oluşturabilmesi nedeniyle zordur. Yapılan son çalışmalara göre *Mentha* cinsi 18 tür ve 11 melezi içermekte olup poliploidi seviyesi farklı birçok tür bulunmaktadır (35, 36).

Mentha türlerini ekonomik açıdan önemli kılan, kuru veya taze yaprakları ve monoterpenler bakımından zengin uçucu yağdır. *Mentha* cinsine ait bitkiler genel olarak gastrointestinal sistem rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, antioksidan, antienflamatuvar, antimikrobiyal, analjezik ve antikanser etkilere sahip oldukları gösterilmiştir.

Mentha türlerinin çoğu dünya çapında yetiştirilmekte ve çeşitli farmakopelerde tanımlanmaktadır. 2004 yılında yalnızca Kuzey Amerika'da, 3318 ton *M. piperita* L., 478 ton *M. gracilis* Sole ve 346 ton *M. spicata* L. üretilmiştir.

Avrupa Farmakopesi, *Mentha piperita* L. ve *M. canadensis* L.'e ait botanik özellikleri ve uçucu yağ limitlerini belirlemiştir (37).

Mentha türlerinin uçucu yağ bileşenleri farklı olsa da ağırlıklı olarak, monoterpenler ve seskiterpenlerden meydana gelmektedir. Kafeik asit türevleri toplam fenolik bileşiklerin %60-80'ini oluşturur. Ana bileşenlere göz atıldığında; *Mentha pulegium* L.'da glukuronoit izomerleri, *Mentha piperita* L., *Mentha spicata* L. ve *Mentha longifolia* L. türlerinde klorojenik asit, *Mentha spicata* L.'de ise gallik asit bulunduğu görülmektedir.

Mentha türlerinde sık bulunan rozmarinik asit, *Mentha piperita*'da toplam fenolik bileşiklerin %30'unu oluşturmaktadır. Salvianolik asit türevleri de *Mentha* türlerinde saptanan diğer fenolik bileşiklerindendir. Kafeik asit ve türevlerinin yanında diğer organik asitler de saptanmıştır. Bunlar; kaftarik asit, sinnamik asit, *p*kumarik asit, ferulik asit, oleanolik asit ve vanillik asittir (38).

Mentha türleri flavon ve flavonon bakımından da zengindir. Bunlar toplam fenolik bileşiklerin %10-70'i kadardır. *Mentha* türlerindeki ana flavon bileşiği luteolin ve türevleridir. Bunun yanında luteolin-*O*-glikozit ve luteolin-*O*-rutinozit gibi en çok tanımlanan glikozidik türevleri majör fenolik bileşiklerdendir. Apigenin ve onun glikozit türevleri ve rutinozitler de bu türlerde bulunmaktadır. Diğer flavonlar ise akasetin ve glikozit türevleri, diosmin, salvigenin ve timonindir (38).

Mentha türleri flavanonlar bakımından da zengindir ve bu sınıfa ait bileşikler eriodiktiyol, naringenin ve hesperidin türevlerini içerir. Sıklıkla bu bileşikler glikozit türevleri olarak bulunur. Örneğin, hesperidin (hesperidin-7-*O*-rutinozit), eriodiktiyol-*O*-glikozit ve naringenin-7-*O*-glikozit *M. piperita* L.'da bulunmaktadır. Öte yandan, eriositrin (eriodiktiyol-7-*O*-rutinozite), *Mentha* türlerinde en çok bulunan flavanondur (38).

Mentha türlerinde flavonoller ve dihidroflavonoller daha az saptanmıştır. Bununla birlikte, birçok *Mentha* türünde kemferol, ramnozit, rutinozit, soforozit, misetin ve kersetin bulunmaktadır (38).

Mentha türlerinde saptanan diğer fenolik bileşikler Tablo-1'de gösterilmiştir(38).

Tablo-1: <i>Mentha</i> Türlerinde Saptanan Fenolik Bileşikler	
Kateşin	<i>M. canadensis</i> L., <i>M. pulegium</i> L. <i>M. spicata</i> L.
Epikateşin	<i>M. spicata</i> L.

Siyanidin, delfinidin, luteolinidin, pelargonidin, petunidin	<i>M. rotundifolia</i> (L.) Hudson
Stilbenoit, resveratrol, feniletanoit tirozol	<i>M. spicata</i> L.

Mentha türlerinin uçucu yağlarının majör bileşenleri Tablo-2’de görülmektedir (38).

Tablo-2: <i>Mentha</i> Türlerinin Uçucu Yağlarının Majör Bileşenleri	
Majör Bileşenler	<i>Mentha</i> türleri
Geraniol, geranil asetat	<i>Mentha arvensis</i> L.
Linalool, linalool asetat	<i>Mentha aquatica</i> L., <i>Mentha longifolia</i> (L.) L., <i>Mentha spicata</i> L.
Karvon, dihidrokarvon	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L., <i>Mentha spicata</i> L., <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh., <i>Mentha villosa</i> Huds.
Piperiton, piperiton oksit	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.
Piperitenon oksit, piperiton oksit	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L., <i>Mentha spicata</i> L., <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh., <i>Mentha villosa</i> Huds.
Mentofuran	<i>Mentha aquatica</i> L.
Pulegon, izopulegon	<i>Mentha arvensis</i> L.
Pulegon, Menton, izomenton	<i>Mentha arvensis</i> L., <i>Mentha spicata</i> L., <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.
Menton, izomenton, mentol izomerleri	<i>Mentha arvensis</i> L., <i>Mentha longifolia</i> (L.) L., <i>Mentha piperita</i> L.

Mentha türlerinin farmakolojik etkileri aşağıdaki Tablo-3’de görülmektedir (38).

Tablo-3: <i>Mentha</i> Türlerinin Farmakolojik Etkileri		
Farmakolojik Etki	Tür adı	Kullanılan Ekstre
<u><i>In vitro</i> Çalışmalar</u>		
Analjezik	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	Etanollü ekstre
Antialerjik	<i>Mentha piperita</i> L.	Etanollü ekstre
	<i>Mentha spicata</i> L	Etanollü ekstre

Antibakteriyel	<i>Mentha arvensis</i> L.	Etanollü ekstre
Antifungal	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha piperita</i> L.	Sulu ekstre
	<i>Mentha pulegium</i> L.	Sulu ekstre
	<i>Mentha rotundifolia</i> (L.) Huds.	Sulu ekstre
	<i>Mentha spicata</i> L.	Sulu ekstre
Antienflamatuar	<i>Mentha piperita</i> L.	Etanollü ekstre
Antioksidan	<i>Mentha arvensis</i> L.	Etanollü ekstre
	<i>Mentha aquatica</i> L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha dalmatica</i> L.	Sulu ekstre
	<i>Mentha haplocalyx</i> Briq.	Sulu ekstre
	<i>Mentha pulegium</i> L.	Sulu ekstre
	<i>Mentha spicata</i> L.	Sulu ekstre
	<i>Mentha verticillata</i> L.	Sulu ekstre
Antiviral	<i>Mentha piperita</i> L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha spicata</i> L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	Uçucu yağ
Antitümör	<i>Mentha arvensis</i> L.	Sulu ekstre
Sitotoksik	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.	Etanollü ekstre
Radyoprotektif	<i>Mentha piperita</i> L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha spicata</i> L.	Petrol Eteri ekstresi
	<i>Mentha villosa</i> Huds.	Sulu ekstre
Spazmolitik	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.	Etanollü ekstre
<u>In vivo Çalışmalar</u>		
Analjezik	<i>Mentha arvensis</i> L.	Etanollü ekstre
	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha piperita</i> L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha spicata</i> L.	Uçucu yağ
	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	Uçucu yağ
	<i>Mentha villosa</i> Huds.	Uçucu yağ
Antialerjik	<i>Mentha piperita</i> L.	Etanollü ekstre

Antiemetik	<i>Mentha piperita</i> L. <i>Mentha spicata</i> L.	Uçucu yağ Uçucu yağ
Antienflamatuar	<i>Mentha aquatica</i> L. <i>Mentha arvensis</i> L. <i>Mentha piperita</i> L. <i>Mentha spicata</i> L.	Etanollü ekstre Kloroform ekstresi Uçucu yağ Hekzan ekstresi Sulu ekstre
Antitümör Sitotoksik Radyoprotektif	<i>Mentha arvensis</i> L. <i>Mentha piperita</i> L. <i>Mentha villosa</i> Huds.	Etanollü ekstre Uçucu yağ Uçucu yağ
Hepatoprotektif	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L. <i>Mentha arvensis</i> L.	Etanollü ekstre Kloroform ekstresi Sulu ekstre
Sedatif	<i>Mentha arvensis</i> L.	Etanollü ekstre
Spazmolitik	<i>Mentha longifolia</i> (L.) L. <i>Mentha piperita</i> L. <i>Mentha pulegium</i> L.	Hekzan ekstresi Diklorometan ekstresi Uçucu yağ

***Mentha* türlerine ait tayin anahtarı (34):**

1.Kaliks boğazı tüylü, dişleri çok belirgin şekilde eşit değil

1. *pulegium*

1.Kaliks boğazı tüysüz, dişleri eşit

2.Gövde yaprakları ortada veya üst kısımda daha geniş, alt tarafında yeşil- veya gri veya bazen beyaz-tomentoz, kurduğunda keçe gibi görünümlü basit kıvrık tüylü (Nadiren yapraklar tüysüz ve böyle olduğunda uzun saplı), spika sıkı, genellikle çok dallanmış

2.*longifolia*

2.Gövde yaprakları ortanın altında daha geniş, alt tarafında yeşil ve tüysüzden kaba gri-yeşilden gri-villoza kadar, basit kıvrık tüylü, dallanmış tüyler de çoğu kez vardır; tüyler sert kurduğunda keçe gibi görünmez, kaba tüylü; spika alt kısımda kesintili, az dallanmış

3.*spicata*

2.3. *Mentha longifolia* (L.) Hudson'ın Dünyada ve Türkiye'de Yayılışı

Akdeniz, Avrupa, Avustralya ve Afrika'da yaygın olarak bulunmaktadır. Hindistan, Pakistan, Bulgaristan, Etiyopya, Afganistan, Arnavutluk, Cezayir, Ermenistan, Avusturya, Azerbaycan, Belçika, Bosna-Hersek, Bulgaristan, Çin, Mısır, Fransa, İran, Almanya, Macaristan, Kazakistan, İsrail, Özbekistan, Tacikistan, Tanzanya, Türkiye gibi birçok ülkede yayılış göstermektedir (22, 18-20, 40).

Ülkemizde ise; Osmaniye, Kars, Karabük, Ağrı, Amasya, Artvin, Rize, Sinop, Tokat, Giresun, Hakkâri, Van, Elazığ, Tunceli, İzmit, Manisa, Sivas, Yozgat, Bingöl, Niğde, Balıkesir, Bilecik ve Hatay'da yayılış göstermektedir (34, 41-50, 54-57).



Resim-1: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson

2.4. *Mentha longifolia* (L.) Hudson Alt Türlerine Ait Tayin Anahtarı (34):

1. Yapraklar belirgin bir şekilde petiolat

subsp. *noeana*

1. Yapraklar sesil veya sesile yakın

2. Yapraklar soluk renkli, 50 mm x 18 mm'den fazla ve altında ince çeperli tüyler, kurduğunda buruşur, spika güçlü, 12 mm çapında genellikle sesil veya subsesil dallar

subsp. *longifolia*

2.Yapraklar tek renkli, genellikle 50 mm x 20 mm'den az, uzundan çok kısaya kadar, kıvrık, altında kalın çeperli tüyler, kurduğunda çok az buruşur; spika daha ince, yaklaşık 10 mm çapında, dallar pedunkulat

subsp. *typhoides*

3.Yaprak yeşil, her iki yüzeyi yoğun kısa puberuloz tüylü, bazen neredeyse tüysüz, mercekle alt yüzeyde sesil salgı bezleri görünür, kırmızımsı-mora çalan çiçek spika

var. *calliantha*

3.Yapraklar gri tomentoz; alt yüzeyde tüylerle örtülü salgı bezleri, çiçekler bariz olmayan kırmızımsı-mor

var. *typhoides*

2.5. *Mentha longifolia* (L.) Hudson'ın Morfolojik ve Anatomik Özellikleri

Değişken, tüylü, küf veya keskin kokulu, çok yıllık bitkilerdir. Toprak altında pulsu yapraklı rizomları bulunur. Çiçekli gövdeler 40-120 cm. Yapraklar genellikle (25-)30-90 x 10-32(-40) mm sesil veya nadiren saplı, oblong-eliptikten oblonglanseolata kadar, ortanın üst kısmında daha geniş, ucu ± akut, tabanı kordattan subkordata kadar, kenarı çok sayıda düzensiz ve sıklıkla yayılmış dişli keskin serrattır. Lamina pürüzsüz veya hafifçe pürüzlü, üst tarafı yeşilden gri-tomentoza kadar, alt tarafı yeşilden beyaz-tomentoza kadar (subsp. *longifolia* renksiz), her iki yüzeyinde de bazen ince çok kısa yumuşak tüylüdür. Yaprak tüyleri dallanmamış, alt tarafında kurduğunda keçe şeklinde, taban hücreleri 18-36 (-41) µm çapındadır. Vertisillasterler çok sayıda, (30-) 40-100 x (7-) 9-15 mm çapında çok fazla dallanmış uçta bulunan spika şeklindedir. Kaliks 1-3 mm. Korolla leylak rengi veya beyaz. Nutletler kestane rengi, retikulattır (34).

Taksona ait genel bilgiler (39),

Ömür: Çok yıllık

Yapı: Otsu

İlk çiçeklenme zamanı: 7

Son çiçeklenme zamanı: 10

Habitat: Bataklık, tarlalar, dere ve nehir yanında

Minimum yükseklik: 900 m

Maksimum yükseklik: 2135 m

Endemik: Endemik değil

Türkiye dağılımı: Türkiye



Resim-2: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson



Resim-3: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson

2.6. Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkisel örneklerin içerisinde bulunan bileşenlerin kromatografik analizlerinin ve diğer çalışmaların yapılabilmesi için uygun bir çözücü ile ekstraksiyona tabi tutulması gerekmektedir. Bu işlem öğütücü yardımıyla öğütülmüş bitki materyalleri ve uygun çözücü kullanılarak çeşitli yöntemlerle yapılabilir (58).

Hidrofilik komponentlerin ekstraksiyonu için metanol, etanol ve etil asetat gibi polar çözücüler kullanılırken, lipofilik komponentler için diklorometan veya diklorometan-metanol (1:1) karışımı kullanılabilir. Gerektiğinde klorofili uzaklaştırmak için hekzan kullanılmaktadır. Hedef komponentlerin apolar ya da polar oluşları ve sıcaklıkla yapılarının değişebileceği göz önüne alınarak ekstraksiyon yöntemi belirlenmelidir (58).

Bu amaçla; ultrason yardımıyla ekstraksiyon, geri soğutucu altında ısıtma ve Soxhlet ekstraksiyonu gibi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki örneklerinin ekstraksiyonu; taze veya kuru bitki materyallerinin organik çözücüler kullanılarak ve daha sonra süzülerek bitki ekstraktlarının elde edilmesi şeklinde de (maserasyon) mümkündür (58).

Modern ekstraksiyon teknikleri arasında katı fazlı mikro-ekstraksiyon, süperkritik-sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyonu ve sürfaktan aracılı teknikler bulunmaktadır. Bu yöntemler belli avantajlara sahiptir: Organik solvan tüketiminin azaltılması, numunenin bozunmasının engellenmesi, dilüsyon adımlarının elimine edilmesi, ekstraksiyon etkinliğinde iyileşme, seçicilik ve ekstraksiyon hızı gibi. Bu teknikler için otomasyon kolaylığı da kullanımını desteklemektedir. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan deney koşulları Tablo-4'te belirtilmiştir (58).

Tablo-4: Farklı Ekstraksiyon Yöntemlerinde Kullanılan Deney Koşulları			
Yöntem	Soxhlet ekstraksiyonu	Ultrason yardımıyla ekstraksiyon	Maserasyon
Yaygın kullanılan çözücüler	Metanol, etanol, alkol- su karışımı	Metanol, etanol, alkol- su karışımı	Metanol, etanol, alkol- su karışımı
Sıcaklık (°C)	Kullanılan çözücüye bağlıdır	Kullanılan çözücüye bağlı olarak ısıtılabilir	Oda sıcaklığı

Basınç	Uygulanmaz	Uygulanmaz	Uygulanmaz
Süre	3-18 saat	1 saat	1-4 gün
Gerekli solvan miktarı (ml)	150-200	50-100	Örnek miktarına bağlıdır

Çalışmamızda kullanılan yöntemler mikrodalga ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon, Soxhlet ekstraksiyonu ve hidrodistilasyondur.

2.6.1. Mikrodalga Ekstraksiyonu

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) veya basitçe mikrodalga ekstraksiyonu; mikrodalgayı ve geleneksel çözücü ekstraksiyonunu birleştiren bir tekniktir. Ekstraksiyon kinetiğinin artırılması için çözücü ve bitki dokularındaki sıcaklığı mikrodalga uygulayarak artıran bir ekstraksiyon prosesidir (59).

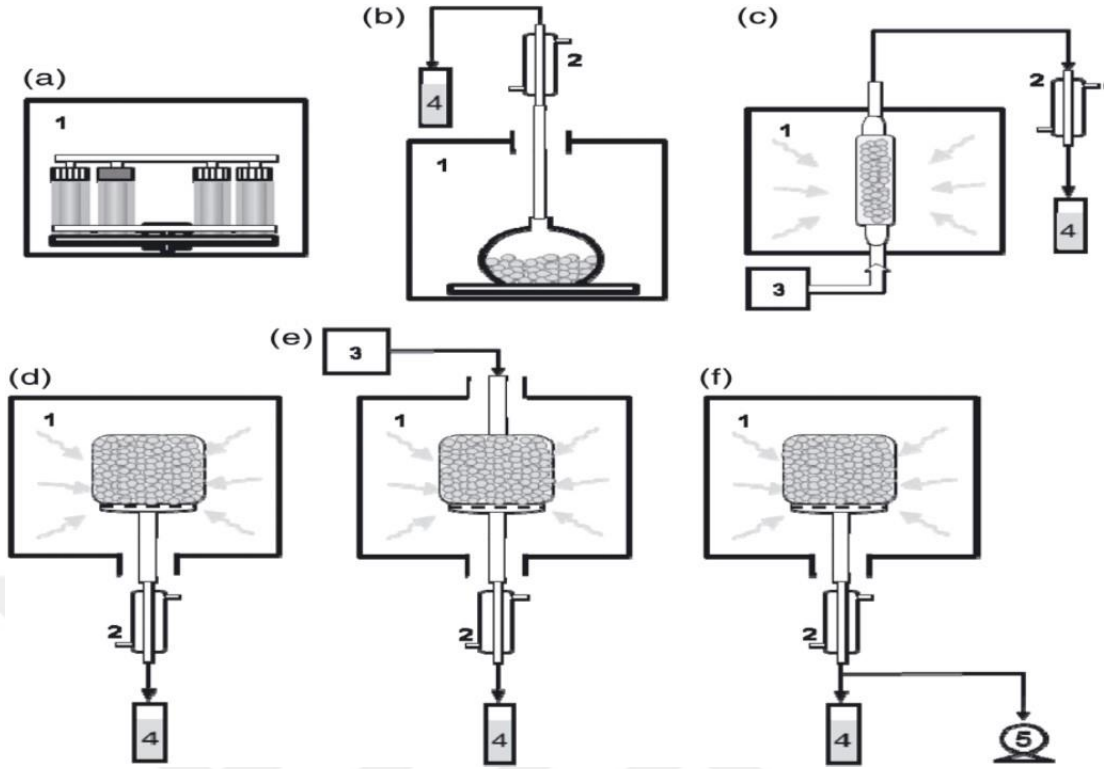
Bu yöntemin, özellikle doğal ürünler üzerinde ekstraksiyon süresinin kısılması, daha az çözücü kullanımı, düşük maliyet gibi birçok avantajları vardır. Doğal ürünlerin ekstraksiyonunda MAE kullanımı 1980'lerin sonlarında başlamış ve teknolojik gelişmeler sayesinde günümüzde popüler ve etkili bir yöntem haline gelmiştir (59).

Basınçlı mikrodalga destekli ekstraksiyon (PMAE) ve çözücü içermeyen mikrodalga destekli ekstraksiyon (SFMAE) gibi birçok ileri MAE enstrümantasyonu, metodolojisi ve doğal ürünler için birçok spesifik protokol mevcuttur (59).

Bitkilerde çözünen maddelerin çıkarılması; kütle transferi, çözücünün katıya nüfuz etmesi, çözgenin katı matriksten çözülmesi-emilmesi ve hidrolizi, yüzeye difüze olması ile ilgilidir (60).



Resim-4: Mikrodalga ekstraksiyon cihazı



Resim-5: Mikrodalga çalışma prensibi; (a) kapalı kap, (b) çözgen eklemeli açık sistem ve multimodlu (çözgen eklemeli ve eklemesiz), (c) buhar distilasyon (d) mikrodalga hidrograviti, mikrodalga kuru difüzyon ve graviti, (e) mikrodalga buhar difüzyon, (f) FE, 1. Mikrodalga fırını, 2. Soğutucu, 3. Buhar jeneratörü 4. Toplayıcı kap 5. Vakum pompası (60).

2.6.2. Ultrasonik Ekstraksiyon

Ultrasonik enerjinin neden olduğu kaviteasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve sıvı arasında etkin bir temas sağlar. Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır (61-63).

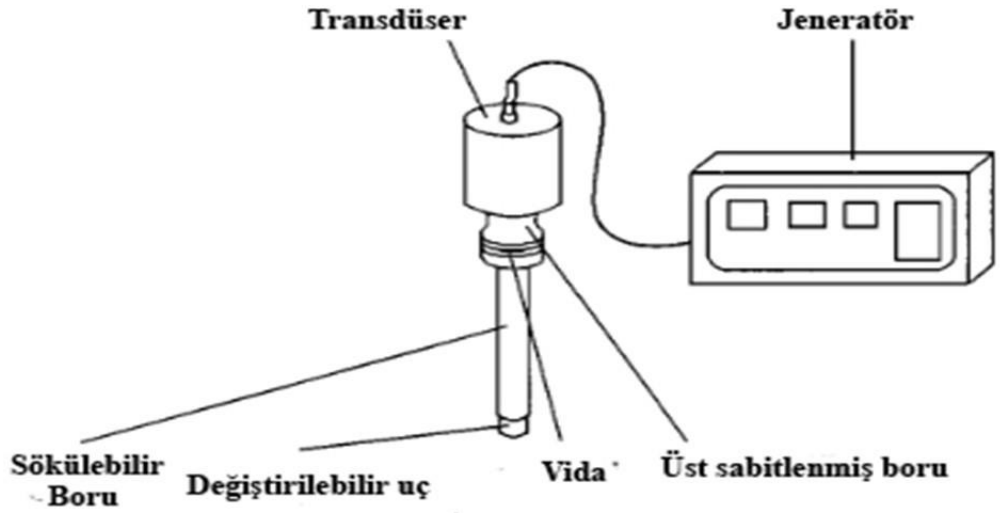
Ekstraksiyon verimini etkileyen parametreler; solvan türü, sıcaklık, zaman, örnek partikül boyutu, örnek miktarı ve kullanılan cihazdır (58). Örneğin hazırlandığı kabın yerleştirileceği ultrasonik banyo modeli ve örneğin bulunduğu kaba ultrasonik probun daldırıldığı modeller bulunmaktadır.



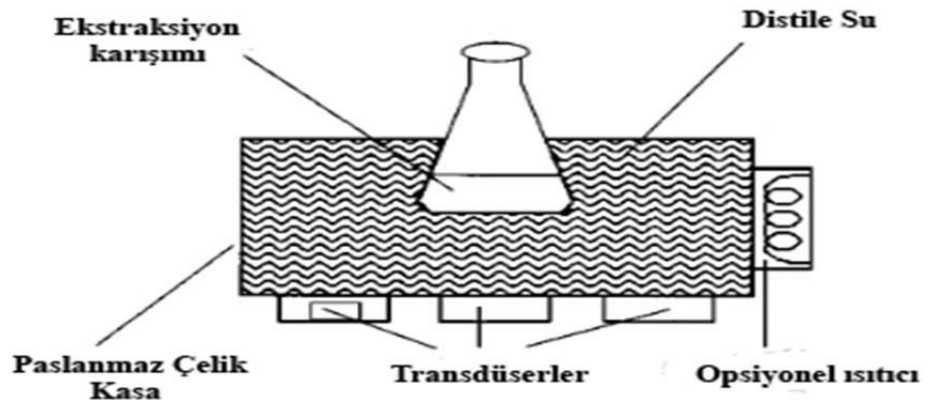
Resim-6: Ultrasonik banyo



Resim-7: Ultrasonik prob



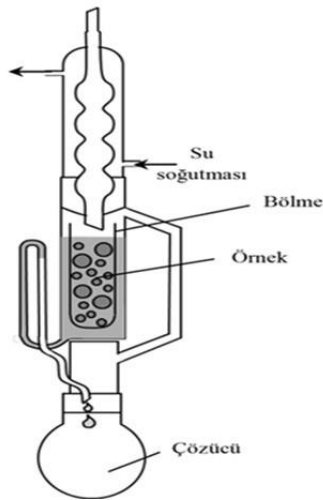
Resim-8: Ultrasonik prob donanımı (64)



Resim-9: Ultrasonik banyo donanımı (64)

2.6.3. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraktörü, en eski ekstraksiyon sistemlerinden biridir ve hala geniş ölçüde kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü, bir solvan şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), bir kondansör (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden meydana gelmiştir. Katı veya yarı-katı numuneler için uygundur. Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesinin içine yerleştirilir. Çözücü bunun altındaki şişeye konulur. Çözücü kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır ve kaynayan çözücünden gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu kondansöre hareket eder; yoğunlaşır, örneğe doğru damlar. Çözücü örneği ıslatır ve daha sonra çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, çözücü tüm örnek bölmesini boşaltarak, çözücü şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak çözücü birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur. Bu yöntemde ekstraksiyon süresi 6-24 saat kadardır ve büyük miktarda çözücü (100-500 ml) gereklidir (61).



Resim-10: Soxhlet aparatı (61)

2.6.4. Hidrodistilasyon

Hidrodistilasyon, tıbbi bitkilerden uçucu yağ elde edilmesi için uygulanan ve referans olarak kullanılan onaylanmış bir metottur. Ancak uçucu bileşenlerin kaybı, uzun ekstraksiyon süresi ve buna bağlı aşırı enerji harcanması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Mikrodalga yardımıyla hidrodistilasyon (ısıtıcı kaynağı mikrodalga enerjisi) (MAHD) ve ohmik yardımıyla hidrodistilasyon (ısıtıcı kaynağı ohmik enerji) (OAHD) gibi yeni yöntemlere göre daha basittir (65).

Hidrodistilasyon; Clevenger aparatı ile gerçekleştirilir. Bu düzenekte yer alan cam balon içerisinde, örnek tamamı suyun içinde kalacak şekilde yerleştirilir. Isıtıcı

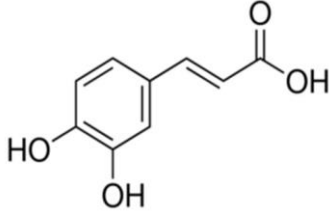
B-)

2.6.5. *Mentha longifolia*' L. Hudson'ın Kimyasal İçeriği

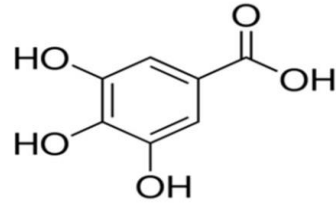
M. longifolia; sekonder metabolitlerindeki iki sınıfın varlığından dolayı geleneksel ve konvansiyonel tıpta kullanılmaktadır. Bu sınıflar farklı yapıdaki fenolik bileşikler ve uçucu yağlardır. Fenolik bileşiklerinden dolayı antioksidan, antiülser, hepatoprotektif, antienflamatuvar, antidiyabetik ve kolagog gibi birçok etkiye

sahiptir. Uçucu yağından dolayı da antimikrobiyal, antispazmodik, karminatif ve antiviral etkisi olduğu bilinmektedir (27-32).

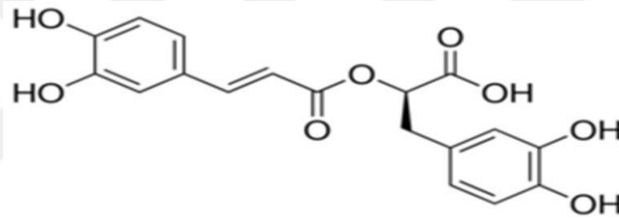
Yapılan çalışmalarda rutin, rosmarinik asit, apigenin, luteolin, izorhoifin, naringenin, kafeik asit, gallik asit ve kateşin gibi fenolik bileşikler tespit edilmiştir (69-71).



Şekil-1: Kafeik asit

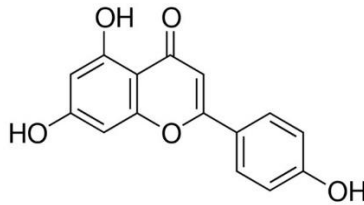


Şekil-2: Gallik asit

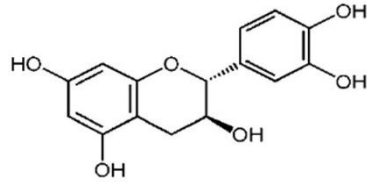


Şekil-3: Rozmarinik asit

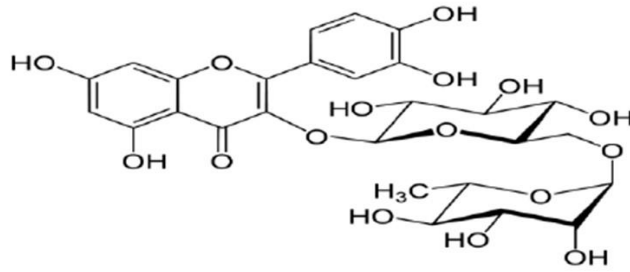
En önemli fenolik bileşikleri flavonoidler (rutin, apigenin, kateşin, luteolin) ve bunların glikozitleridir (luteolin 7-O-glukozit, luteolin 7-O-rutinozit, luteolin 7-O-glukuronit ve apigenin 7-O-rutinozit). Bu glikozitleri antitumör etkiye sahiptirler (72,73).



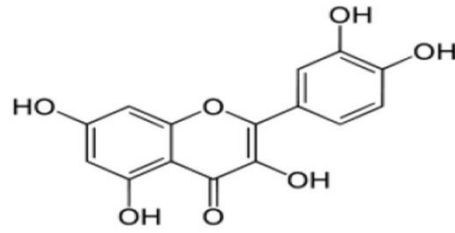
Şekil-4: Apigenin



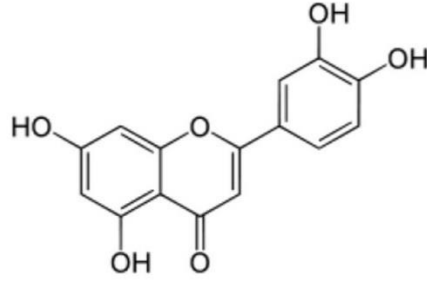
Şekil-5: Kateşin



Şekil-6: Rutin



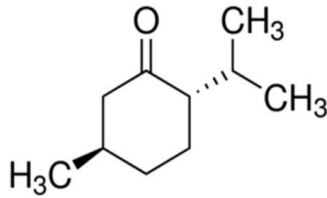
Şekil-7: Kersetin



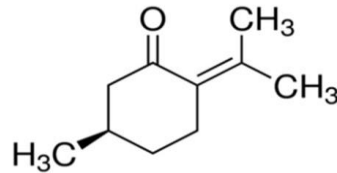
Şekil-8: Luteolin

M. longifolia'nın taşıdığı diğer madde grupları da yağ asitleri (palmitik asit, stearik asit, linoleik asit, behenik asit) ve fitosterollerdir (kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol). *M. longifolia*'nın antioksidan ve antitümör etkilerinin tek başına fenolik bileşiklerden kaynaklanmadığı, bu bileşiklerin yağ asitleri, fitosteroller ve uçucu yağlarla birlikte sinerjik etki yaptığı düşünülmektedir (72, 74).

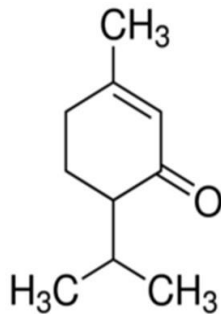
M. longifolia uçucu yağındaki majör bileşenler; piperiton, β -karyofillen, germakren, piperitenon, piperiton oksit, d-limonen, 1,8-sineol, pulegon, piperiton oksit ve karyofillen oksit, menton olmakla birlikte, bunlar floraya göre değişkenlik gösterebilmektedir (22, 23, 75, 76).



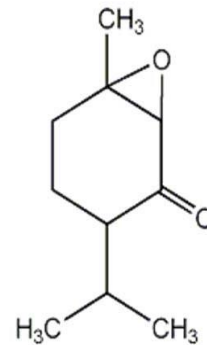
Şekil-9: Menton



Şekil-10: Pulegon



Şekil-11: Piperiton



Şekil-12: Piperiton Oksit

Yapılan çalışmalarda; Türkiye’de Karadeniz florasında; piperiton oksit ve piperitenon oksit, Pakistan florasında; piperitenon oksit, piperitenon, germakren-D, borneol ve β -karyofillen, Polonya florasında; karvon, limonen, 1,8-sineol ve piperiton, İran florasında; piperiton, limonen ve trans-piperitol, Bosna-Hersek florasında; piperiton oksit, 1,8-sineol, β -karyofillen ve karyofillen oksit, Tacikistan florasında; cis-piperiton epoksit, piperitenon oksit, karvon, pulegon, menton, timol, β -tuyon, karvakrol, ve (E)-karyofillen majör bileşen olarak tespit edilmiştir (72, 77-81).

2.7. *Mentha longifolia* (L.) Hudson’nın Halk Arasındaki İsimleri ve Kullanımı

Ülkemizdeki geleneksel adları; “Eşek nanesi” (Bilecik), “Mentol nane” (Aladağlar- Niğde), “İt nanesi”, “Dere nanesi” (Osmaneli), “Yabani nane”dir (Balıkesir) (45, 48, 54,51).

Uluslararası olarak genellikle “Horse mint” veya “Wild Mint” olarak adlandırılmaktadır. Mısır’da geleneksel adları “Habag, Habek”, Hindistan’da “Jangali Pootna” ve “Silver Mint”, Afrika’da “Ballerja, Ballerja, Balderjan, Baldrian ve T’kamma”, İtalya’da “Mentuccia”, Pakistan’da “Podina”, “Phhileel” “Fileel”, “Chitta, Breena”, “Poochink” ve “Valanai”, İran’da ise “Fudanaj” ve “Pooneh” olarak adlandırılmaktadır (76,94,95,97-99,100-104,111).

Mentha longifolia (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson’a özel olarak; Anadolu’da verilen adlar “Yaban nane, Dere nanesi” (Kırklareli), “Pune, Puni” (Bingöl), “Narpız” (Sivas-Yozgat), “Su nanesi, Deli nane” (Manisa), “Yarpuz, Plung” (Elazığ) , “Yaban nanesi” (Nevşehir), “Punk” (Tunceli)’dir. Mısır’da “Na’na ve “Habaq” olarak adlandırılmaktadır. Diğer Arapça isimleri “Habaq El-Maiyya, “Habaq El-Barr” ve “Felaiyya”dır (41-44,47,52,53,105-107).

Mentha longifolia (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson’a özel olarak; Anadolu’da verilen adlar “Püng” (Hakkari), “Pung” (Van) ve “Yarpuz” dur (49,50,108-110).

Yaprak, çiçek, gövde ve tohumlarının geleneksel kullanımı yaygındır. Yaprakları ve çiçekli sürgünleri; infüzyon, sıvı ekstre, şurup, toz, esans halinde ve suyu sıkılarak kullanılmaktadır. Kuvvet verici, hazmı kolaylaştırıcı, öksürük giderici etkileri vardır. Kasılmalara karşı etkilidir. Eskiden beri kullanılan kuvvetli aromatik bir baharattır. Tarihte özellikle baş ağrısı olmak üzere çeşitli ağrılar için kullanılmıştır. Halk arasında baş ağrısı ve sindirim problemleri gibi çeşitli

rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yatıştırıcı, midevi, gaz giderici, bulantıyı önleyici ve ishale karşı etkili olduğu bilinmektedir (22, 23,52,53).

Geleneksel ve modern tıpta literatürde kayıtlı kullanımları arasında, analjezik, antienflamatuvar, ağız ve boğaz antiseptiği, spazmolitik ve terletici etkileri olduğu kayıtlıdır (97,99,111).

Ülkemizde ve pek çok yakın kültürde; çiçekli dalları ve yapraklarının infüzyon şeklinde dahilen gastrointestinal rahatsızlıklarda, hemoroidde, böbrek taşlarında, sindirime yardımcı ve sakinleştirici olarak, toz edilip suyla karıştırılmak suretiyle serinleme amacıyla, haricen baş ve romatizma ağrılarında; dekoksasyon şeklinde ise ağız ve boğaz antiseptiği olarak ve kaşıntıları dindirmede kullanıldığı kayıtlıdır. Yaprakları infüzyon şeklinde veya sütte kaynatılıp süzildükten sonra dahilen solunum yolları ve idrar yolları enfeksiyonlarında, haricen yara iyi edici olarak kullanılmaktadır Ayrıca yaprakların astım, diyabet, obezite, yüksek tansiyon ve menstrüal ve doğum sonrası gelişen problemlerde de kullanıldığına dair kayıtlar bulunmaktadır (54, 76, 94, 97,98, 100,103,109, 111-119,121).

2.8. Taksonlar İle İlgili Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları

Antimikrobiyal Etki

Yapılan çalışmalarda *M. longifolia* uçucu yağındaki monoterpenlerin kayda değer antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır (122-126).

Uçucu yağın *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton longifusus*, *Microsporm canis* ve *Mucor ramannianus* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (127-130).

Bu bitki ekstrelerine karşı en duyarlı türler olan *Cladosporium fulvum*, *Penicillium ochrochloron* ve *Cladosporium cladosporioides* için letal dozun 2.5 µL/mL olduğu belirlenmiştir. Bir klinik çalışmada uçucu yağ ile metanolik ekstrelerin antimikrobiyal etkileri karşılaştırıldığında; uçucu yağın metanolik ekstreya göre daha güçlü ve geniş spektrumlu antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (122,131).

Başka bir *in vitro* çalışmada; *Mentha longifolia*'nın etanolik ekstresinin *Entamoeba histolytica* ve *Giardia duodenalis* tropozoitlerine karşı antiprotozoal etkisi belirlenmiştir (132).

Bitkinin uçucu yağı, bifonazol'e oranla yüksek derecede fungistatik ve fungisidal etkinlik göstermiştir. (122).

Mentolün saçkıran ve farklı mantar infestasyonlarına karşı antimikrobiyal ve antifungal bir madde olduğu gösterilmiştir (124-126).

Ayrıca *Mentha longifolia*' dan izole edilen alkaloidlerin, *E. coli* gibi Gram negatif bakterilerin büyümesine karşı etkili olduğu belirtilmiştir (124-126,133-135).

Mentha longifolia ekstresinden saflaştırılan beş flavonoid üzerinde yapılan bir çalışmada, test edilen flavonoidler arasında kuarsetin-3-O-glikozitin maksimum antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu görülmüştür. Apigenin de, *Mentha* türlerinde yaygın bulunan ve antimikrobiyal aktivite de dahil olmak üzere birçok biyolojik etkiye sahip flavonoidtir (136-139).

Bir diğer çalışmada *M. longifolia*'nın *C. albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı etkili olduğu belirtilmektedir. Başka bir çalışmada da, *M. longifolia*'nın bazı mantarlara karşı spor çimlenme testlerinde son derece etkili (> % 88) olduğu bulunmuştur (26, 141-143).

M. longifolia'dan elde edilen uçucu yağ ile yapılan *in vitro* çalışmada; uçucu yağın *Vibrio spp.* karşı etkili olduğu görülmüştür. Bu etki, *Mentha longifolia* 'nın yeterince pişmemiş deniz ürünü veya *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* ve *Vibrio fluvialis* suşlarıyla kontamine olmuş deniz suyuyla temas etmiş deniz ürünlerinin tüketimi sonucu ortaya çıkan gastrointestinal sorunlara karşı kullanılması sonucu ortaya konulmuştur (144).

M. longifolia uçucu yağında bulunan piperitonun, idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan nitrofurantoinin antimikrobiyal aktivitesini arttırdığı saptanmıştır (145).

Majör bileşenlerden pulegonun küflere ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı etkili olduğu düşünülmektedir (146,147).

Nisin ve *M. longifolia* uçucu yağı kombinasyonu, 25°C'de *Bacillus subtilis*'in vejetatif formlarının büyümesi üzerinde önemli derecede inhibisyon etkisi göstermiştir (148).

M. longifolia'dan elde edilen etanolik ve sulu ekstraktların farelerde *Syphacia obvelata* ve *Aspiculuris tetraptera*'ya karşı belirgin şekilde antihelmintik aktivite gösterdiği saptanmıştır (149).

Sinir Sistemi Üzerindeki Etkileri

M. longifolia metanolik ekstraktlarının nörokimyasal özellikleri, (MAO-A) inhibisyonu, asetilkolinesteraz inhibisyonu ve gamma-aminobütirik asit reseptörlerine afinitesi çalışılmıştır. Bu çalışma antioksidan ve MAO-A inhibitör aktiviteyi ortaya koymuştur (150).

M. longifolia uçucu yağının, santral sinir sistemi (SSS) için güçlü bir depresan olduğu gösterilmiştir. *M. longifolia* 'nın apigenin glikozitleri, luteolin glikozitleri ve fenolik asitlerce zengin fraksiyonlarını içeren etanol ekstraktlarının SSS fonksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Fenolik asitlerin kayda değer spazmodik ve koleratif etkilere sahip olduğu bulunmuştur (151,152).

Gastrointestinal Sistem Üzerindeki Etkileri

M. longifolia 'nın yaprak ekstresinin, barsak düz kasları üzerinde gevşetici etki yaptığı, diyare ve kolik gibi gastrointestinal rahatsızlıkları tedavi ettiği ortaya konmuştur. Bitkinin değişen kalsiyum mobilizasyonu ve kalsiyum kanal bloke edici unsurların varlığına bağlı potasyum kanal aktivasyonu yoluyla spazmolitik aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (153-158).

Hint yağı ile indüklenen bir diyare modelinde ve 100-1000 mg/kg dozlarında *M. longifolia* ekstresiyle yapılan bir çalışmada, loperamid'e eşdeğer oranda (%3180) koruma sağladığı görülmüştür. Kalsiyum kanal bloke etme aktivitesi için yapılan çalışmalarda, *M. longifolia* ekstresi ile dokuya ön işlem uygulandığında verapamil'e benzer şekilde Ca^{++} konsantrasyon-yanıt eğrilerinde sağa kaymaya neden olduğu ortaya konmuştur. Aktiviteye yönelik fraksiyonasyonda; petrol eteri fraksiyonunun bu çalışma için sulu fraksiyona göre daha güçlü olduğu ortaya konmuştur (157).

Yapılan bir *in vitro* çalışmada; *M. longifolia* uçucu yağının 0.1-100 g/ml dozlarında zayıf spazmojenik bir etki sergilediği ve en yüksek dozda (1000 g/ml) spontan kontraksiyonu tamamen ortadan kaldırdığı belirtilmiştir ($P<0.05$). Asetilkolin ile indüklenen kasılmayı ekstrenin azalttığı saptanmıştır (159).

Bir başka çalışmada; birçok *Mentha* türünün uçucu yağının önemli bir kimyasal bileşeni olan piperitenon oksitin etkileri domuz ileumu üzerinde incelenmiştir. Piperitenon oksitin (30-740 μ g/ml) dinlenme membranı potansiyelinde önemli bir değişiklik yapmaksızın bazal tonusu rahatlatmış görülmüştür (160).

Antioksidan Aktivite

Yapılan bir çalışmada, *Mentha longifolia* metanolik ekstraktlarının, PC12 hücrelerinde hidrojen peroksit kaynaklı toksisiteye karşı olası koruyucu etkileri ve antioksidan aktivitesi; ABTS ve ksantin / ksantin oksidaz yöntemleri ile ortaya konmuştur (150). Güllüce ve arkadaşlarının; *M. longifolia* uçucu yağı ve metanol ekstresinin antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için yaptıkları bir çalışmada, DPPH inhibisyonu ve β - karoten/linoleik asit yöntemleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, ekstrenin uçucu yağdan daha etkili olduğu ortaya koymuştur. Yapılan benzer

çalışmalarda da metanol ekstrelerinin içerdikleri fenolik bileşiklerden dolayı uçucu yağa göre daha etkili olduğu saptanmıştır (128,161).

Başka bir çalışmada, 9 *Mentha* türünün serbest radikal süpürücü etkisi DPPH yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak; *M. longifolia*'nın metanolik ekstrelerinin anlamlı derecede (%79) antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır (142,146,162).

Berselli ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, *M. longifolia* metanolik (%70) ekstresinin insan keratinositlerini en yüksek nontoksik dozda (80 µg/ml) kimyasal oksidatif strese koruduğu ortaya konmuştur (163).

Avrupa ve Arap ülkelerinde kullanılan dört bitki ekstresi karışımı (*Alchemilla vulgaris*, *Olea europaea*, *Mentha longifolia* ve *Cuminum cyminum*), lipid peroksidasyon tekniği ile ölçüldüğünde çok düşük absorpsiyonlarda (10 µg/ml) kayda değer antioksidan etki göstermiştir (164).

Başka bir çalışmada ise, monoterpen ketonların (menton ve izomenton), *M. longifolia*'nın içerdigi en güçlü radikal süpürücü bileşenler olduğu görölmüştür (122,164).

Sitotoksik Aktivite

M. longifolia'dan izole edilen apigenin-7-O-glukozit, apigenin-7-O-rutinozit ve apigenin-7-O-glukuronitin mutajenik ve antimutajenik özellikleri *E. coli* WP2 testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Apigenin-7-O-glukozit, apigenin-7-O-rutinozit ve apigenin-7-O-glukuronidin, indüklenen 2-AF ve N-metil-N-nitro-N'nitrozoguanidine karşı önemli antimutajenik aktiviteye sahip olduğu görölmüştür (120).

Mevsimsel değişiklik gösteren uçucu yağların sitotoksitesisi, MTT testi kullanarak meme kanseri (MCF-7) ve prostat kanseri (LNCaP) hücre hatları üzerinde test edilmiştir. Uçucu yağların yaz ve kış örnekleri için LC₅₀ değerlerinin sırasıyla 45.2 ve 50.6 µg/ml ve LNCaP'ye karşı IC₅₀ değerlerinin 43.5 ve 52.0 µg/ml olduğu saptanmıştır (10). İzole edilen luteolin türevlerinin (luteolin 7-O-glukozit, luteolin 7-O-rutinozit ve luteolin 7-O-glukuronit) mutajenik ve antimutajenik aktiviteleri Ames Salmonella testi (TA1535 TA1537 suşları) kullanılarak yapılan bir çalışmada değerlendirilmiştir. TA1537 suşu için en yüksek inhibisyon oranları sırasıyla %84.03, %87,63 ve %67,77; TA1535 için de sırasıyla %23.86 ve %23.76 olarak saptanmıştır (22,119).

Apigenin 7-O-rutinositin (A7R)'in antimutajenik potansiyeli ökaryotik bir hücre sisteminde (*S. cerevisiae* RS112), mutajen etil metan sülfonat (EMS) ve akridine (AC) karşı incelenmiştir. EMS ve AC ile uyarılmış mutajeniteye karşı A7R'nin farklı

inhibisyon oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma sonucu ile A7R'nin önemli farmakolojik özellik taşıdığı ve reaktif oksijenlerin sebep olduğu hastalıkların riskini azalttığı saptanmıştır (22,73).

Antinosiseptif ve Antipiretik Etkileri

Farelerle yapılan bir çalışmada, *M. Longifolia* subspecies *capensis* sulu yaprak ekstrelerinin antinosiseptif ve antipiretik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ekstrelerin farelerde nontoksik olduğu ortaya konmuştur (68).

İrritabl barsak sendromu (IBS)'ye Etkisi

5-10 yıl süreyle IBS hastası olan 40 kişi (her iki cinsiyetten bireyler 25-65 yaş aralığında) üzerinde Mebeverin ile karşılaştırmalı olarak üç bitki kombinasyonu (*Mentha longifolia*, *Cyperus rotundus* ve *Zingiber officinale*) ile yapılan randomize klinik çalışmada, bitki kombinasyonunun IBS hastalığının etkisini ve şiddetini azalttığı saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan bitki kombinasyonları Mebeverin'e göre anlamlı sonuçlar göstermiştir ($P \leq 0.05$) (181).

Amenore İle İlgili Çalışmalar

30-40 yaşlarındaki amenoresi bulunan ve folikül uyarıcı hormon (FSH) seviyeleri yüksek olan 27 kadın üzerinde yapılan çalışmada *M. longifolia* çayının FSH hormonu üzerinde ve amenore üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Hastalardan *M. longifolia* çayını 3 menstrüal döngüde, günde 3 defa ve 2 hafta boyunca kullanmaları istenmiştir. Yaş ortalaması 36.44 ± 1.5 olan hastalarda tedavi öncesi FSH seviyesi 79.13 ± 19.17 mIU/ml iken tedaviden sonra 27.83 ± 16.14 mIU/ml'ye düşmüştür. Bu sonuçlara göre FSH seviyesinde anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.001$). 4 hasta hariç bütün hastalarda düzenli menstrüasyon gerçekleştiği görülmüştür (166).

Çift kör, randomize, plasebo kontrollü çok merkezli yapılan bir diğer çalışmada ise; sekonder amenore ve oligomenore hastası 120 kadın üzerinde *M. longifolia* şurubunun amenore ve oligomenore üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hastalara günde 3 defa 15 ml şurup verilmiştir. Şurup ve plasebo üç menstrüasyon döngüsünde kullanılmıştır. İlk döngüde şurup alan grupta menstrüasyon görülen hasta sayısının plaseboya göre fazla olduğu görülmüştür (68.3%, 13.6% $p < 0.001$). Çalışma boyunca da şurup kullanan grubun menstrüasyon düzenliliğinin plaseboya göre belirgin bir şekilde daha iyi olduğu görülmüştür (33.3%, 3.3% $p < 0.001$). *M. longifolia* şurubu ile ilgili olarak dikkate değer bir komplikasyon veya yan etki görülmemiştir (76).

Toksikolojik Çalışmalar

Yapılan bir çalışmada; *M. longifolia* yapraklarından elde edilen uçucu yağın Wistar sıçanlarının bazı biyokimyasal parametreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağın 125, 250, 375 ve 500 µl/kg konsantrasyonlarının, kırmızı kan hücrelerini ve lenfositleri, beyaz kan hücreleri ve ortalama hücre hacmi üzerinde herhangi bir iz bırakmaksızın azalttığı saptanmıştır. En düşük dozda uçucu yağın karaciğer aktivitesini artırdığı görülmüştür (167).

Bir diğer çalışmada; *in vitro* sitotoksikite testi Brine Shrimp yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Tüm karideslerin hayatta kaldığı ve uçucu yağın toksik olmadığı görülmüştür. Maksimum ölüm oranı 200 µg/ml'de gerçekleşirken, en az ölüm oranı ise 40 µg/ml'de gözlenmiştir (168).

Başka bir çalışmada ise; *M. longifolia*'dan elde edilen flavonoidlerin akut toksisitesi ölçülmüştür. Kamferol-3-O-glukozit, 3 mg/kg letal doz (LD) ile test edilen flavonoidler arasında en toksik bileşik olarak kabul edilmiştir (136).

2.9. Kromatografik Yöntemler

“Kromatografi” Yunanca kökenli bir sözcük olup, “Chromatus (Renk)” ve “Graphein (Yazmak)” sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Modern anlamda kromatografi “renk yazmak” anlamında olmayıp, ayırma bilimini kapsamaktadır. Kromatografi, ilk defa Rus botanikçi M.S. Tsweett (1892-1919) tarafından renkli bitki pigmentlerinin ayırımı için önerilmiştir (83).

Kromatografi bugün için kimya, biyokimya, biyoloji, kalite kontrol, araştırma, analiz, preparatif-amaçlı ayırmalar ve fizikokimyasal ölçümlerde kullanılmaktadır. Kromatografi tekniklerinin ortak yönü her birinde hareketli ve sabit faz olmak üzere iki fazın bulunmasıdır. Bu fazlardan biri geniş bir yüzey alanına yayılmış sabit bir yatak oluştururken, diğer faz hareketli olup, sabit fazın üzerinden akarak ilerler. Bu iki faz birbiriyle temas halinde olup karışmazlar. Örnek karışımı hareketli faz tarafından sistemden taşındıkça, sabit ve hareketli faz arasında birçok etkileşime uğrar. Bu etkileşimler, komponentlerin sistemdeki göç hızını idare eder. Sistemde en az alıkonan bileşen önce taşınır, daha kuvvetle tutulan bileşen ise daha geç çıkar (83).

Bitkisel ilaç üretiminde standardizasyon; hammaddenin kalitesinin ve saflığının morfolojik, anatomik, fiziksel, kimyasal ve biyolojik gözlem gibi çeşitli parametrelerle değerlendirildiği bir süreçtir. Bitkisel hammaddenin standardizasyonunda birçok kromatografi teknikleri kullanılarak kimyasal bileşenlerin teşhisi yapılabilmektedir. Bitkisel ilaçların kalite kontrolünde

kromatografik parmak izi ve DNA parmak izleri kullanılabilmektedir. Parmak izi analizi, hassasiyeti ve güvenilirliği nedeniyle bitkisel ilaçların kalite kontrolünde en etkili araçtır (88).

Standardizasyon amaçlı fitokimyasal değerlendirme aşağıdakileri içerir:

- Farklı kimyasal grupların varlığı için ön test (örneğin; toplam alkaloid, toplam fenolik bileşik, toplam tanen)
- İlgili kimyasal grupların miktarının belirlenmesi
- Tekli veya çoklu işaretleyicilere dayanan parmak izi profillerinin oluşturulması

Kromatografik Parmak İzi:

Bitkisel ilaçların kalite kontrolü için en güçlü yaklaşım kromatografik parmak izi yöntemidir. Bu yöntem, farmakolojik aktif komponentlerin ayrıştırıldığı kromatografik bir modeldir. Bu model örnekler arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları başarıyla gösterebilmektedir. Farklı konsantrasyon ve sayıda bileşen içeren bitkisel ilacın farklı örneklerinde bu bileşenleri tanımlamak için kullanılabildiği gibi, yabancı maddelerin veya kontaminantların tanımlanması için de kullanılabilmektedir. Kromatografik parmak izi, İnce tabaka kromatografisi (İTK), Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK), Gaz kromatografisi (GK) gibi teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir (88).

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC):

Komponentlerin ayrılması için kullanılan en popüler ve basit kromatografik tekniklerden biridir. İTK, diğer kromatografik tekniklerle birlikte yarı kantitatif bir değerlendirme için başlangıç taramalarında kullanılan basit bir yöntemdir. Dolgu maddeleri (sabit faz) cam veya plastik plaka üzerine 1 mm'den daha az kalınlıkta yayılarak kaplanır. Bu kromatografi türünde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğru olur. Çözücü, içerisine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür (83-86).

Bitkisel ilaçların fitokimyasal açıdan değerlendirilmesinde, İTK aşağıdaki sebeplerden dolayı yoğun şekilde kullanılmaktadır (91):

- Hızlı bir şekilde ve çok az bir ekstre örneği ile analizin yapılabilmesi
- Komponentler hakkında kalitatif ve yarı kantitatif (Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi=YPİTK) bilgi alınması

YPİTK ile veriler; kromatogram, alıkonma faktörü (Rf) değeri, ayrılan bantlardaki renkler veya UV altındaki florent bölgeler ve absorpsiyon spektrumları gibi bilgilerle kaydedilir. İTK günümüzde farmakope ve monografların çoğunda yer almaktadır (83-85,87).

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC):

Sıvı kromatografisinde sabit faz bir kolonda bulunur ve hareketli faz onun üzerinden akar veya pompalanarak akıtılır. Preparatif ve analitik YBSK, yüksek ayırma kapasitesinden dolayı bitkisel ilaçların analizi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hareketli fazın ve sabit fazın diğer kromatografik parametrelerle birlikte optimizasyonunu sağladığı için bitkisel ürünlerin neredeyse tüm bileşenlerini analiz etmek için kullanılabilir (83).

Yüksek oranda hassaslık, çözünürlük, seçicilik ve tam otomasyon sistemi sayesinde kullanımı kolaydır. En büyük avantajlarından biri UV ve DAD gibi farklı detektörlerle komponentleri ayırabilmesidir. Daha ileri ayırma teknikleri olarak, Misellar elektrokinetik kılcal kromatografi (MECC), Yüksek hızlı karşı akım kromatografisi (HSCCC), Düşük basınç boyut ayırma kromatografisi (SEC), Ters faz iyon değişim HPLC (RIPC-HPLC) ve Güçlü anyon değişim HPLC (SAX-HPLC) gibi bazı yeni teknikler geliştirilmiştir (83, 84, 86).

Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (UHPLC):

Son yıllarda UHPLC bitkisel ürünlerin kalite kontrolü için uygulanabilir bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır. UHPLC sıvı kromatografik analizini HPLC makine donanımlarının modifikasyonlarıyla farklı bir seviyeye getirmektedir. UHPLC, çapı 2 µm'den küçük sabit faz parçacıkları ile HPLC analizinden daha yüksek çözünürlüklü ayrımlar gerçekleştirmeyi mümkün kılmaktadır. Daha küçük partikül boyutu daha yüksek ayırma verimliliği ve daha kısa sürede analiz sağlamaktadır (86,88).

Gaz Kromatografisi (GC):

Gaz-Katı Kromatografisi:

Bu yöntemde; sabit faz olarak yarıçapı küçük, uzun bir kolon içine yerleştirilmiş geniş yüzeyli dolgu maddeleri (adsorban= silikajel, alümina, vb.), hareketli faz olarak da dolgu maddelerinin arasından kolaylıkla geçebilen gaz (genellikle azot veya helyum) kullanılmaktadır (89).

Gaz-Sıvı Kromatografisi:

Burada sabit faz, Gaz–Katı Kromatografisindeki geniş yüzeyli dolgu maddelerine emdirilmiş bir sıvı (yüksek mol kütleli polimerler), hareketli faz ise gazdır. Uçucu yağların analizi ve kalite kontrolü GK ile yapılabilir. Bu yöntem, yüksek seçiciliğe sahip kapiler kolonlar sayesinde aynı anda ve kısa sürede birçok uçucu bileşeni ayırabilmektedir. Bu yöntem, termolabil ve uçucu olmayan numunelerin analizi için uygun değildir.

Gaz kromatografisi ekipmanı, kütle spektrometresi ile doğrudan birleştirilebilir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), duyarlılığı, kararlılığı ve yüksek verimliliği nedeniyle bitkisel ilaçların uçucu bileşenlerini analiz etmek için kabul gören bir yöntemdir (83, 84,89, 90).

UV/UV–Vis Spektroskopisi:

UV-Vis spektroskopisi, basit, ucuz ve ana bileşenleri tanımlamak ve ölçmek için kullanımı kolay bir tekniktir. Flavonoitlerin ve polifenolik bileşiklerin analizlerinde UV/UV-Vis spektroskopisinin uygulanması, uzun süreden beri söz konusudur. Fenolik bileşikler 240-285 nm ve 300-550 nm arasında değişen karakteristik UV absorpsiyon bandına sahiptirler. UV-Vis spektroskopisi nitel analizler için uygundur. Spektrumlar, standart maddeler yardımıyla ekstrenin parmakizi için kullanılabilir. Ayrıca kontaminasyona neden olan kirlilikler de UV/UV–Vis Spektroskopi yöntemiyle tespit edilebilmektedir (88,91-93).

2.10. Ağrının Tanımı, Sınıflandırılması ve Mekanizması

Uluslararası Ağrı Araştırmaları Derneği (International Association for the Study of Pain=IASP) ağrıyı “Vücudun herhangi bir yerinden kaynaklanan, doku hasarı veya potansiyel doku hasarı ile birlikte olan ya da böyle bir hasar sürecinde tanımlanan duyuşsal ve emosyonel deneyim” olarak tanımlanmıştır. Ağrı aynı zamanda bir korunma mekanizması olarak da tanımlanabilmektedir. Ağrı kişiden kişiye büyük farklılıklar göstermekte olup, önceleri sadece bir bulgu olarak değerlendirilirken günümüzde bir sendrom olarak da değerlendirilmektedir. Ağrı sınıflandırılması aşağıdaki şekilde yapılabilir (169-172):

1. Fizyolojik-Klinik
2. Süresine göre
3. Kaynaklandığı bölgeye göre
4. Mekanizmalarına göre

1. Fizyolojik-Klinik Ağrı Sınıflaması:

Fizyolojik ağrı vücut için hem bir koruma hem de uyarı sistemidir. Fizyolojik ağrı, ateş veya hasara yol açabilecek yoğun ağrılı uyarana karşı koruyucu bir yanıttır. Klinik ağrı ise olaya birçok fizyopatolojik süreç girmektedir (171).

Süresine Göre Ağrı Sınıflaması:

Ağrı, süresine göre akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır.

Akut ağrı çabuk ortaya çıkıp kaybolan ağrıdır. Ani olarak doku hasarı ile başlayan, neden olduğu lezyon ile arasında yer, zaman ve şiddet açısından yakın ilişkinin olduğu, hasarın iyileşmesi süresince giderek azalan ve kaybolan bir ağrı tablosudur. Vücuda zarar veren bir olayın varlığını göstermektedir. Akut ağrı analjeziklere iyi yanıt vermekte, tedavi edilmezse kronik ağrıya dönebilmektedir. Kronik ağrı akut ağrılı hastalığın olağan seyrinden veya bir yaralanmanın iyileşmesi süresinden çok daha uzun, aylar boyu aralıklarla devam eden ağrıdır. Kişinin hayat kalitesini değiştiren, psikolojik etkenlerin rol oynadığı kompleks bir tablodur (170,171,173,174).

2. Kaynaklandığı Bölgeye Göre Ağrı Sınıflaması:

Somatik ağrı somatik sinirlerden kaynaklanan, ani başlayan, keskin, iyi lokalize edilen ağrıdır. Viseral ağrı kimyasal iritanlar, organların ani gerilmesi, aşırı kasılmalar ve kan akımının azalması gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Yaygın, lokalizasyonu güç, yansıyan tipte olabilmektedir. Sempatik ağrı sempatik sinir sisteminin aktivasyonu ile ortaya çıkan damarsal kökenli ağrılar, CRPS (kompleks rejyonel ağrı sendromu) ve kozaljiler örnektir. Periferik ağrı kaslar, tendonlar veya bizzat periferik sinirlerin kendinden köken alan ağrılardır.

Bir başka sınıflandırma da normal fonksiyon gösteren sinirler ile patoloji sonrası fonksiyonları değişen sinirler arasındaki farka göredir. Derin ağrıda eklem, tendon, kas ve fasyadan gelen uyarılar ince liflerle taşınır ve aynı yollarla iletilir. Genellikle künt ve zonklayıcı tiptedir. İyi lokalize edilemez ve yayılma eğilimindedir. Yüzeysel ağrı deri ve mukozadan köken alan ağrıdır. Yansıyan ağrı bazı organ ve derin dokulardan kaynaklanan ağrılar, uyarı yerinden farklı bir yerde (kardiyak ağrının sol kola, diyagrafmatik ağrının sol omuza yansması gibi) duyulabilir. (170,171).

3. Mekanizmalarına Göre Ağrı Sınıflaması:

Nosiseptif ağrı, nosiseptörlerin çeşitli yollarla uyarılmasıyla ortaya çıkar. Nosiseptörler, sinir sistemi dışındaki tüm doku ve organlarda bulunan reseptörlerdir.

Ağrı ileten lifler ile omuriliğe oradan da talamusa iletilen ve serebral korteks tarafından ağrı olarak algılanan uyarılar, nosiseptörlerce algılanır. Nöropatik ağrı, periferik sinirlerde, travma veya metabolik bir hastalık sonucunda nosiseptörlerin doğrudan etki altında kalmasıyla ortaya çıkan bir ağrıdır. Disk hernisinde olduğu gibi mekanik bir travma doğrudan nöropatik ağrıya yol açabilir. Ya da diyabetik nöropatilerde olduğu gibi salgılanan çeşitli metabolitler sinir dokusu üzerine oturarak nöropatik ağrıya yol açabilir. Nöropatik ağrının nosiseptif ağrıdan en belirgin farkı, nosiseptif uyarının sürekli olmasıdır. Deafferantasyon ağrısı periferik veya SSS'deki lezyonlara bağlı olarak somatosensoryal uyarıların SSS'deki iletiminin kesilmesine bağlı olarak ortaya çıkar. Deafferantasyon ağrılarına örnek olarak brakial pleksus avülsiyonu, postherpetik nevralji, travmatik paraplejiler ve fantom ağrısı verilebilir. İlk birkaç ay içerisinde tedavi edilemezse çok uzun süreli ve geçmeyen ağrılara yol açabilir. Reaktif ağrı vücudun çeşitli olaylara karşı bir reaksiyonu olarak, motor ve sempatik afferentlerin refleks aktivasyonu sonucu nosiseptörlerin uyarılmasıyla ortaya çıkar. Halk arasında kulunç olarak bilinen miyofasiyal ağrı sendromları ve refleks sempatik distrofiler, reaktif ağrılara örnek olarak verilebilir. Psikosomatik ağrı hastanın psişik veya psikososyal sorunlarını ağrı biçiminde ifade etmesidir. Anksiyete ve depresyon gibi psikolojik sorunlarda doku hasarı varmış gibi algılama olmaktadır. Hasta bir anlamda ağrıyı kullanmakta ve ilgi çekmeye çalışmaktadır (171,175).

Ağrı Mekanizması:

1.Periferik Mekanizmalar:

Vücut ağrı oluşturuıcı ile uyarılmadığında dokunun ağrıyı algılanmasında görev alan reseptörlere “nosiseptör” denir. Normal koşullarda mekanik, termal ve kimyasal uyarılar yüksek eşik değerdeki nosiseptörleri harekete geçirirler. Klinikte ise ağrılı uyarı, uzamış travma ve doku harabiyetine bağlıdır. Doku harabiyeti inflamasyona ve dolayısıyla nosiseptörlerin daha fazla uyarılmasına yol açar. Ağrılı uyarı dört aşamada üst merkezlere doğru bir yol izler. Bunlar: Transdüksiyon (duyusal bir reseptörün belirli bir uyarana cevap vermesini bir enerji biçiminde diğer bir enerji biçimine dönüştürmesi), transmisyon (nosiseptörler tarafından algılanan ağrı bilgisinin daha üst merkezlere iletimi), modülasyon (*Medulla spinalis*' te ağrılı uyarının değişme uğraması ve ağrının daha üst merkezlere iletilmesi) ve perpsiyon (*Medulla spinalis*' ten geçen uyarının çeşitli çıkan yollar aracılığıyla üst merkezlere doğru iletilip ağrının algılanması) dur (175,176).

2. Santral mekanizmalar

Santral ağrı *Medulla spinalis*’ ten serebral kortekse kadar uzanan santral sinir sisteminden kaynaklanan ağrıdır. Santral ağrının oluşmasına; santral sinir sisteminin duysal yollarının inhibisyonu, sempatik sistem disfonksiyonu, hipotalamik bozukluklar, sekonder ileti yollarının oluşması, paleospinotalamik sistemle ilgili polisaptik yolların aktivasyonu gibi pek çok olay neden olabilir. Ağrı, hastaların çoğunluğunda sabittir. Sıklıkla unilateral yanma, çakma, batma, saplanma şeklinde tanımlanır. Dokunma ve soğuk allodini, hiperaljezi, hiperpati ve hiperestezi bulunabilir. *Medulla spinalis* arka boynuz hücrelerinin harabiyetine bağlı olarak ortaya çıkan santral ağrı lezyon tarafında ve segmentaldir. *Medulla spinalis* anterolateral funikulusun harabiyetine bağlı ağrılar lezyonun altında ve kontralateral taraftadır. Mezensefalopontin lezyonlarda ağrı kontralateral taraftadır. Talamik lezyonlarda ortaya çıkan ve dizestezi ağırlıklı ağrılar kontralateral hemiplejik dağılıma sahiptir. Kortikal ve subkortikal lezyonlarda ağrı kontralateral tarafta ve yüz, el, ayak gibi distal alanlardadır (82).

2.11. Ağrı Kesici Etkiye Sahip Bitkiler

Nöropatik ağrıda son keşfedilen bitkisel kaynaklı analjezik maddeler arasında alkaloidler, terpenoidler ve flavonoidler bulunmaktadır.

Bu amaçla kullanılan tıbbi bitkilere göz atılacak olursa; *Papaver somniferum* türünde analjezik aktive gösteren maddeler opium türevleridir. Opium morfin, kodein, tebain ve papaverin gibi 25 alkaloid içermektedir. *Cannabis sativa*’nın majör komponentleri olan tetrahidrokanabinollerin izomerleri antinöroaktif etki göstermektedir. *Capsicum* türleri kapsaisin ve analoglarını içermektedir. Çift kör, plasebo kontrollü çapraz klinik çalışmada kapsaisinin ameliyat sonrası nöropatik ağrıları azalttığı görülmüştür. *Salix* türleri de içerdikleri salisilat türevleri nedeniyle analjezik etki göstermektedir. *Acorus calamus* rizomlarının hidroalkolik ekstraktları ile sıçanlarda yapılan bir çalışmada nöropatik ağrı üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Çin’de geleneksel kullanımı olan *Paeonia suffruticosa*’nın korteksinde içerdiği paeonol bileşeni analjezik etkiye sahiptir. *Boswellia serrata*’nın kabuğundan elde edilen reçine ile yapılan çift kör plasebo kontrollü çalışmada reçinenin ağrıyı azalttığı saptanmıştır. *Syzygium aromaticum* uçucu yağı içerdiği öjenol nedeniyle Na⁺ kanallarını bloke ederek ağrı uyarı eşikini arttırmaktadır. Uçucu yağı diş ve dişetinde lokal anestezi olarak kullanılmaktadır.

Arnica montana, *Cinnamomum camphora*, *Harpagophytum procumbens*, *Zingiber officinale*, *Manilkara zapota*, *Scoparia dulcis*, *Ficus racemosa*, *Allium stracheyi*, *Mitragyna parvifolia*, *Murraya paniculata*, *Bauhinia racemosa*, *Nyctanthes arbor-tristis*, *Clerodendrum phlomidis*, *Phyllanthus niruri*, *Sterculia foetida*, *Holarrhena antidysenterica*, *Tridax procumbens*, *Cissus rependa*, *Kaempferia galangal*, *Tanacetum artemisioides*, *Hedyotis puberula*, *Eucalyptus citriodora*, *Chococca brachiata*, *Cynara scolymus*, *Elephantopus scaber*, *Mikania glomerata*, *Trianosperma tayaya*, *Casearia sylvestris*, *Marsypianthes chanaedrys*, *Apuleia leiocarpa*, *Dorstonia brasiliensis*, *Brunfelsia uniflora*, *Bauhinia racemosa*, *Sida acuta*, *Stylosanthes fruticosa*, *Toona celiata*, *Baugainvillea spectabilis*, *Ficus glomerata*, *Polyalthia longifolia*, *Tribulus terrestris*, *Pimpinella anisum*, *Peganum harmala*, *Myrtus communis*, *Withania somnifera*, *Sinapis arvensis*, *Asphodeline lutea*, *Murraya paniculata*, *Tridax procumbens*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Pergularia daemia*, *Cissus quadrangularis*, *Bryonia laciniata*, *Plumbago zeylanica*, *Cissampelos pareira*, *Clerodendrum phlomidis*, *Ficus bengalensis*, *Manihot esculenta*, *Thesium chinense*, *Sphaeranthus indicus*, *Rubia cordifolia*, *Solanum trilobatum*, *Calotropis procera*, *Mitragyna parvifolia*, *Nothospondias staudtii*, *Xanthium indicum*, *Randia dumetorum*, *Amaranthus viridis*, *Marsilea trifolia*, *Asystasia dalzelliana*, *Nelumbo nucifera*, *Saraca indica*, *Baliospermum montanum*, *Kyllinga monocephala*, *Mangifera indica* ve *Carpolobia lutea* analjezik olarak kullanıldığı kayıtlı olan diğer bitki türleridir (177-178).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

- Hassas terazi (Bot Chyo MK – 500 C, HGB2WT)
- Mekanik öğütücü (Bosch Değirmen MKM6000)
- Rotavapor (Heidolph, Hei – VAP- Value)
- Buzdolabı (+4 °C White Westinghouse MRAD17V9 GS, -20 °C White Westinghouse MUFD17V9, -80°C Nuair NU- 94835, NU- 9668 E)
- Ultrasonik su banyosu (Elma, D 78224)
- Etüv (NÜVE, BM02)
- UHPLC (Ultra Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) sistemi
 - Pompa (Accela 925 182) ○ Otomatik örnekleyici (Accela 75 0653) ○ Detektör (Accela PDA 80 Hz 94018)
- UHPLC kolon (Hypersil Gold Dim., 50*2,1mm)
- Vorteks (IKA M53 Digital)
- GC-MS “Thermo Scientific Trace GC Ultra” gaz kromatografisine kombine bağlı “Thermo Scientific DSQ II” kütle dedektörü ve “Thermo TG-5MS” kapiller kolon (30 m x 0.25 mm i.d.; film kalınlığı 0.25 µm)
- UV-Vis Spektrofotometre (Thermo Scientific)
- Mikrodalga Ekstraksiyon Cihazı (SINEO JUPITER Series High Throughput Closed Microwave Digestion/Extraction Workstation)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Metanol (Analitik saflık, Merck)
- Metanol (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Asetonitril (HPLC saflık, Merck)
- Asetik asit (Analitik saflık, Merck)
- Etil asetat (Analitik saflık, Merck)
- Formik asit (Analitik saflık, Merck)
- Glasiyal asetik asit (Analitik saflık, Merck)
- Folin-Ciocalteu çözeltisi (Merck)
- Formaldehit %37 (Merck)
- NP-PEG çözeltisi

- Alüminyum klorit (Merck)
- Potasyum asetat (Merck)
- UP water
- Sodyum karbonat (Merck)
- Rozmarinik asit (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Gallik asit (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Kafeik asit (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Kersetin (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Kateşin (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Pulegon (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Piperiton oksit (HPLC saflık, Sigma Aldrich)
- Mentol (HPLC saflık, Sigma Aldrich)

3.3. Bitkisel Materyal

Bitki örnekleri Giresun'un Dereli ilçesinin Kümbet köyündeki Uzundere kenarından Ekim 2015 tarihinde toplanmıştır. Bitkiler tarafımdan tayin edildikten sonra Doç. Dr. Serdar Gökhan ŞENOL ve Uzm. Biy. Volkan EROĞLU tarafından kontrol edilerek onaylanmıştır. Herbaryum örnekleri Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu (İZEF)'nda saklanmaktadır (İZEF 6054 ve 6055).

Toplanan bitki örneklerine ait topraküstü kısımlar, yabancı maddelerden arındırıldıktan sonra Farmasötik Botanik Anabilim Dalı bitki kurutma alanında, gölge ve havadar bir ortamda, oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma sonrası bitkinin yabancı organları (dal, çiçek) ayıklanmış ve yapraklar mekanik öğütücü (Bosch Değirmen MKM6000) yardımıyla ince toz haline getirilmiştir. Kraft ambalajlara aktarılan toz droglar aktif komponentlerin yapılarının korunması için çalışma süresince -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Kraft kağıt ambalaj iğne yapraklı ağaçlardan elde edilen dayanıklı bir kağıt çeşididir. Bu tip kağıtlar, tamamen ıslandıklarında bile, kuru haldeki dayanıklılığının yaklaşık %30'unu koruyabilen kağıtlardır. Gıda maddelerinin saklanması uygun, neme dayanıklı olması ambalajdan ve dışardan gelecek kontaminasyonlara dayanıklı olması nedeniyle tercih edilmiştir.

3.4. Taksonların Botanik Yönden İncelenmesi

3.4.1. Taksonların Morfolojik Özellikleri

Makroskobik inceleme için 30x büyütme yapabilen mercek kullanılmıştır.

3.4.2. Taksonların Anatomik Özellikleri

Mikroskobik inceleme için toz drog, Sartur, Kloralhidrat reaktifi ve Zeiss-Primo Star mikroskop kullanılmıştır. 100x oküler altındaki görüntüler fotoğraf makinası ile kaydedilmiştir.

3.5. Taksonların Kimyasal Yönden İncelenmesi

Mikrodalga ekstraksiyonu (su-metanol), Soxhlet ekstraksiyonu (su-metanol) ve ultrasonik ekstraksiyon (su-metanol) yapılmıştır.

3.5.1. Ekstraksiyon

Mikrodalga Ekstraksiyonu: Mikrodalga ekstraksiyonu için çalışmayı etkileyecek 5 parametre belirlenmiştir. Bunlar sıcaklık, güç, devir (ekstraksiyon döngü sayısı), çözücü bitki oranı, zamandır. Buna bağlı olarak Tablo-5'te yer alan değerlere göre ekstraksiyon yapılmıştır.

Tablo-5: Mikrodalga Ekstraksiyon Parametreleri	
Sıcaklık	40°C
Güç	400W
Devir	3
Oran	1:20
Zaman	20 dk.

Ultrasonik Ekstraksiyon (Ultrasonik Su Banyosu): Çalışmamızda süreye bağlı optimizasyon çalışması yapılmıştır. Buna göre mikrodalga ekstraksiyonundaki çözücü-bitki oranı referans alınarak 3-6-9 saatlik ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Yukarıdaki sonuçlar dikkate alındığında, daha yüksek içerdiğinden ötürü TYP kullanılmıştır. Çözücü olarak metanol seçilmiştir. Ekstraksiyon başlangıcında sıcaklık 23°C iken ekstraksiyon sırasında ölçülen maksimum sıcaklık 51°C'dir.

Soxhlet Ekstraksiyonu: Bu ekstraksiyon yönteminde de 3-6-9 saatlik ekstraksiyonlar yapılmıştır. Ekstraksiyonda TYP ve çözücü olarak metanol kullanılmıştır.

3.5.2. İTK Analizi

Uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi için sabit faz olarak silika jel 60 F₂₅₄ alüminyum levha, mobil faz olarak toluen-etilasetat (93:7) kullanılmıştır. Vanilil sülfirik asit reaktifi ile bileşenler tespit edilmiştir.

Fenolik bileşikler ve flavonoidler için sabit faz olarak silika jel 60 F₂₅₄ alüminyum levha, mobil faz olarak etil asetat-formikasit-glasiyal asetik asit-su (100:11:11:27) kullanılmıştır. Metanol ekstraktlarında rozmarinik asit, gallik asit, kafeik asit, kersetin ve kateşin maddeleri 365 nm’de doğal ürünler-polietilen glikol ayracı (NP/PEG) ile tespit edilmiştir.

3.5.3. Spektrofotometrik Analizler

Toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu metoduna göre tespit edilmiştir. 0.5 ml distile su, 0.125 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi, 0.125 mg örnek karıştırılıp 6 dk. bekletildikten sonra 0.125 ml %7’lik sodyum karbonat çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra 3 ml’ye distile su ile tamamlanmıştır. 90 dk. karanlıkta bekletildikten sonra 760 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır (179).

Toplam flavonoid miktarı ise alüminyum klorit-kolorimetrik metodu kullanılarak saptanmıştır. 0.5 ml örnek, 1.5 ml metanol, 0.1 ml alüminyum klorit, 0.1 ml potasyum asetat, 2.8 ml distile su karıştırıldıktan sonra 30 dk. karanlıkta bekletildikten sonra 415 nm’de absorbansı ölçülmüştür. Standart olarak kersetin kullanılmıştır (180).

3.5.4. UHPLC Analizi

Kullanılan Cihaz: Thermo UHPLC

Enjeksiyon Hacmi: 10 µl

Kolon: Ace 5 C₁₈ 250*4.6

Mobil Faz A: %0.25 TFA’lı su

Mobil Faz B: %0.25 TFA’lı

asetonitril Program Süresi: 13 dk.

Taranan dalga boyu: 200-600 nm

Tablo-6: UHPLC gradient tablosu						
Numara	Zaman (dk.)	%A	%B	%C	%D	µl/dk.
0	0.00	90.0	10.0	0.0	0.0	1000.0
1	4.50	80.0	20.0	0.0	0.0	1000.0
2	12.00	30.0	70.0	0.0	0.0	1000.0
3	13.00	90.0	10.0	0.0	0.0	1000.0

3.5.5. GC-MS Analizi

GC-MS analiz çalışmaları; “Thermo Scientific Trace GC Ultra” gaz kromatografisine kombine bağlı “Thermo Scientific DSQ II” kütle detektörü ve “Thermo TG-5MS” kapiler kolon (30 m x 0.25 mm i.d.; film kalınlığı 0.25 µm) ile yapılmıştır.

Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dk. akış hızında helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı başlangıç değeri 60°C iken 3°C/dk. ile bitiş sıcaklığı 246°C olarak belirlenmiştir. Detektör sıcaklığı ise 240°C’ye ayarlanmıştır. Uçucu yağ örneği 1/100, h/h oranında n-hekzan ile seyreltilmiş ve 1.0 µl olarak “Thermo Scientific TriPlus” otomatik örnekleyici ile split modunda, enjektör sıcaklığı 200°C, split akışı 20 ml/dk. olacak şekilde belirlenmiştir.

Uçucu yağ bileşenlerine ait kütle spektrumları, “Xcalibur” yazılımındaki Mainlib, Wiley, Replib kütüphanelerindeki Similarity İndis değerleri karşılaştırılarak belirlenmiştir. Mentol, pulegon, piperiton standart madde olarak kullanılmıştır. Belirlenen uçucu yağ bileşenlerin Retention İndis değerleri aşağıda formüle göre GS-MS kromatogramlarından alınan sonuçlara göre hesaplanmıştır:

$$RI \text{ (Retention İndis)} = 100 * [(T_1 - T_2) / (T_3 - T_2) + z]$$

T₁: Bilinmeyen bileşiğin alıkonma zamanı

T₂: Bilinmeyen bileşikten önceki n-alkanın tutulma zamanı

T₃: Bilinmeyen bileşikten sonraki n-alkanın tutulma zamanı.

z: Bilinmeyen bileşikten önceki n-alkanın C sayısı

3.6. Antinoseptif Aktivite Çalışmaları

Metanol ekstrelerinin 20.01.2016 tarihinde Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 2015-102 No'lu onay ile analjezik aktivitesi ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için 48 adet dişi Balb-c fare kullanılmıştır (Ağırlıkları 30-35 g). Hayvanlar 22 ± 1 °C 'de değişmeli olarak 12 saat ışık-karanlık ortamında bekletilmiştir. Gıda, *ad libitum* ve su kullanılmıştır. Deney hayvanları deneyden 1 saat önce sakin bir odaya transfer edilmiştir. Tüm çalışma normal ışık (saat 9.00-17.00) ve sıcaklıkta (25°C) yapılmıştır. Çalışma boyunca deney hayvanlarına sadece intraperitoneal olarak uygulama yapılmıştır.

İlk olarak formalin testi uygulanmıştır. Bu deney sonuçlarına göre en etkili ekstre belirlenerek, hot plate testiyle ekstrenin analjezik etkisi araştırılmıştır.

3.6.1. Formalin Testi

Deney hayvanının arka ayağının ventral bölgesine 20-25 µl formalin (%37'lik) uygulanmıştır. İki aşamalı formalin yanıtı gözlemlenmiştir (Erken faz için 0-5 dk., geç faz için 15-30 dk.). Erken fazda naseptörlerin kimyasalla doğrudan uyarılması söz konusudur, geç faza inflamasyon da eşlik eder. İki faz arasında kalan süre ise spinal ve supraspinal düzeyde aktif inhibisyona bağlı olarak gerçekleştiği kabul edilen fazdır (181).

Test grubunda metanollü ekstreler 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarında uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda parasetamol 400 mg/kg kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak su kullanılmıştır. Bu ekstrelerden en etkili olanı ile diğer çalışmalara devam edilmiştir.

3.6.2. Hot Plate Testi

50-56 C°'ye ısıtılmış alüminyum yüzey üzerinde, hayvanın belli bölge sınırları içinde kalması için hareket kabiliyetini sınırlamayacak büyüklükte bir cam kap kullanılmıştır. Test süresi 30 saniye ile sınırlı bırakılmıştır. Yüzeye farenin bırakılmasından hayvanın arka ayağını çekmesine kadar geçen süre tespit edilmiştir. Bu testte önceki formalin testinde belirlenen ekstre ve kontrol grupları için 8 adet deney hayvanı kullanılmıştır. Ekstreler 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda uygulanmıştır. Pozitif kontrol grubunda parasetamol 400 mg/kg kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak su kullanılmıştır.

3.6.3 Akut Toksisite Testi

Lorke metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre her doz için 8'erli gruplara ayrılan deney hayvanları 16 saat aç bırakılmıştır. İntraperitoneal olarak 400 mg/kg,

800 mg/kg, 1600 mg/kg ve 3200 mg/kg ekstre uygulanmıştır. Negatif gruba 0.2 ml su intraperitonal olarak verilmiştir. Uygulama sonrası gıda almalarına izin verilmiştir. 48 saat gözlem yapılmıştır. Log doz / cevap (% ölüm) LD₅₀ değerini vermektedir.



4. BULGULAR

4.1. Morfolojik ve Anatomik Bulgular

Yapraklar genellikle 50 x 20 mm'den daha küçük, sapsız veya nadiren saplı, oblong-eliptikten oblong lanseolata kadar, ortanın üst kısmında daha geniş, ucu $\pm$ akut, tabanı kordattan subkordata kadar, kenarı çok sayıda düzensiz ve sıklıkla yayılmış dişli keskin serrattır. Lamina pürüzsüz veya hafifçe pürüzlü, üst tarafı yeşilden gri-tomentoza kadar, alt tarafı yeşilden beyaz-tomentoza kadar, her iki yüzeyinde de bazen ince çok kısa yumuşak tüylüdür.



Resim-12: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson



Resim-13: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson



Resim-14: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson

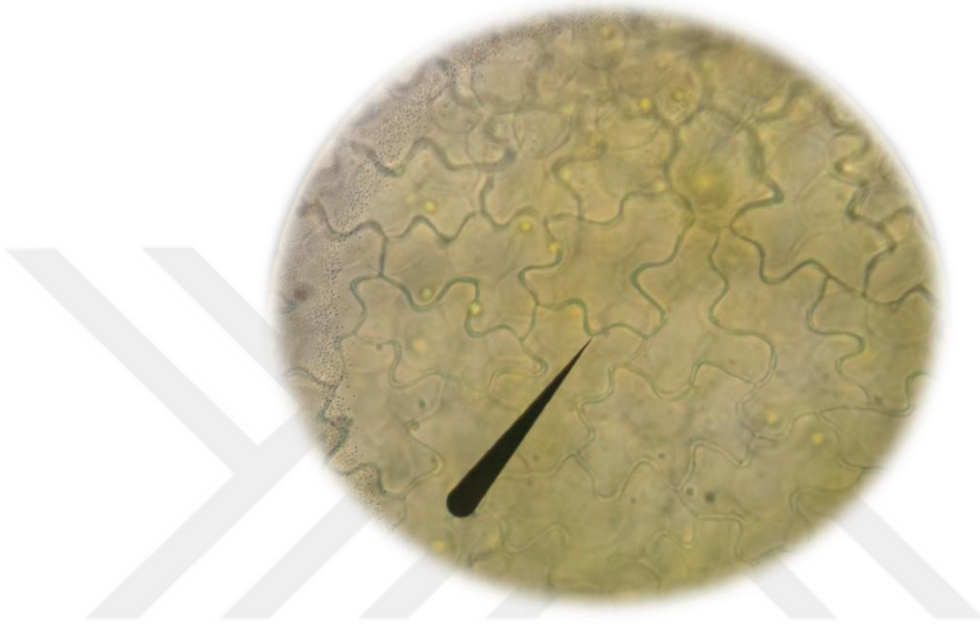


Resim-15: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson

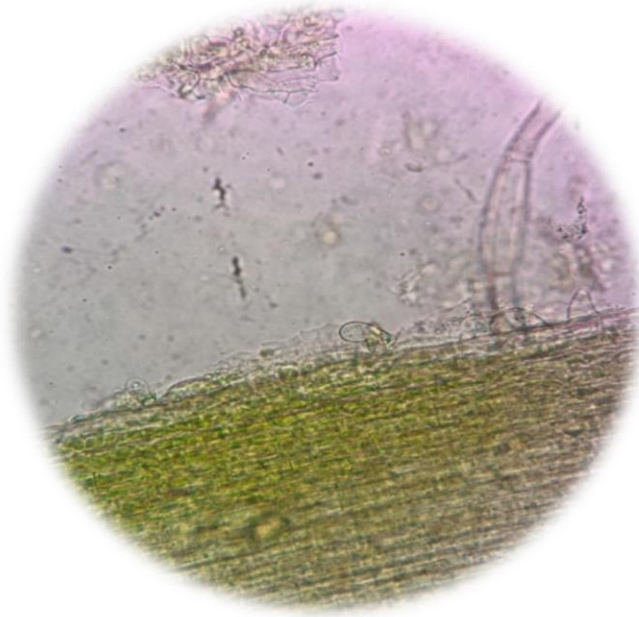


Resim-16: *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson

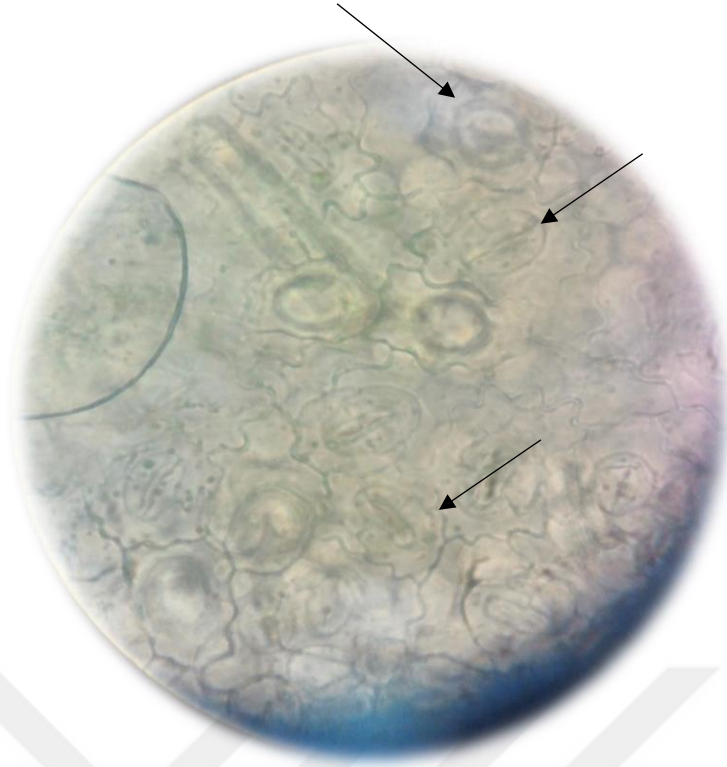
Yaprak dokusundaki epidermis hücreleri kıvrımlı-dalgalı duvarlı olup, kütikula tabakası çizgilidir. Üst epidermiste bir kaç tane stoma bulunur veya seyrek bulunmaktadır. Stomalar ağırlıklı olarak alt epidermiste bulunmaktadır. Stoma tipi diasitiktir. Yaprak kenarının yakınındaki epidermis hücreleri ise daha düz kenarlı izodiyametik şekilli, belirgin bir şekilde boncuk şeklinde olup antiklinal duvarda çukurlaşma görülmektedir.



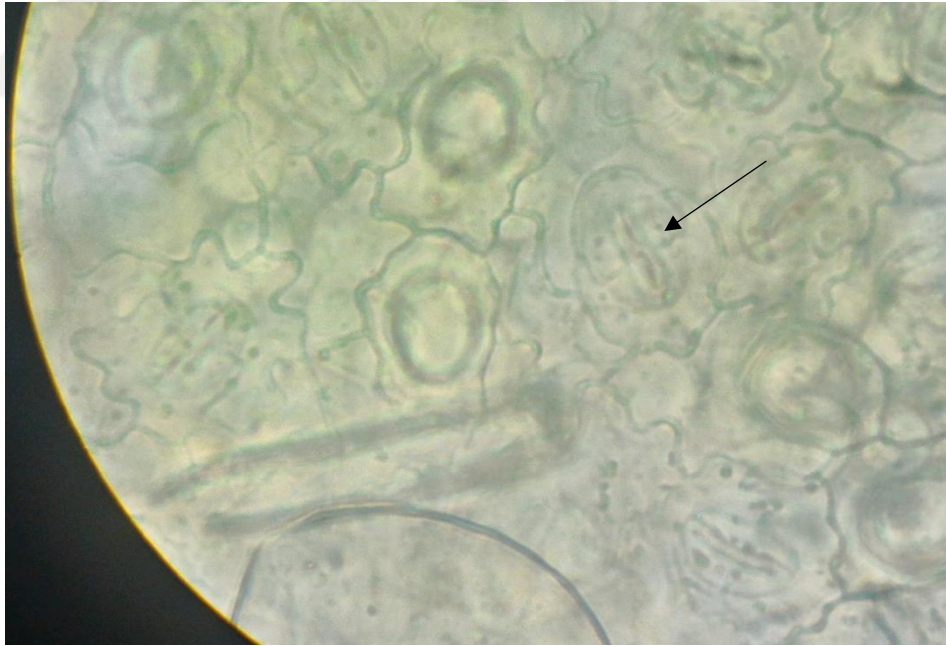
Resim-17: Kıvrımlı-dalgalı duvarlı epidermis hücreleri (yaprak yüzeysel kesit, 1000x büyütme)



Resim-18: Yaprak kenarının yakınındaki epidermis hücreleri (yaprak yüzeysel kesit, 400xbüyütme)

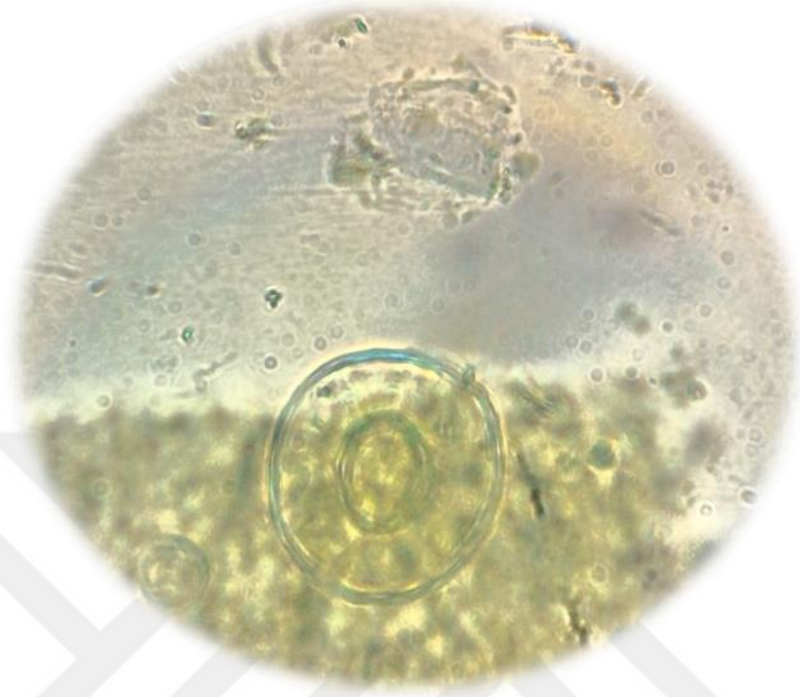


Resim-19: Diasitik stomalar (yaprak yüzeysel kesit, 1000x büyütme)

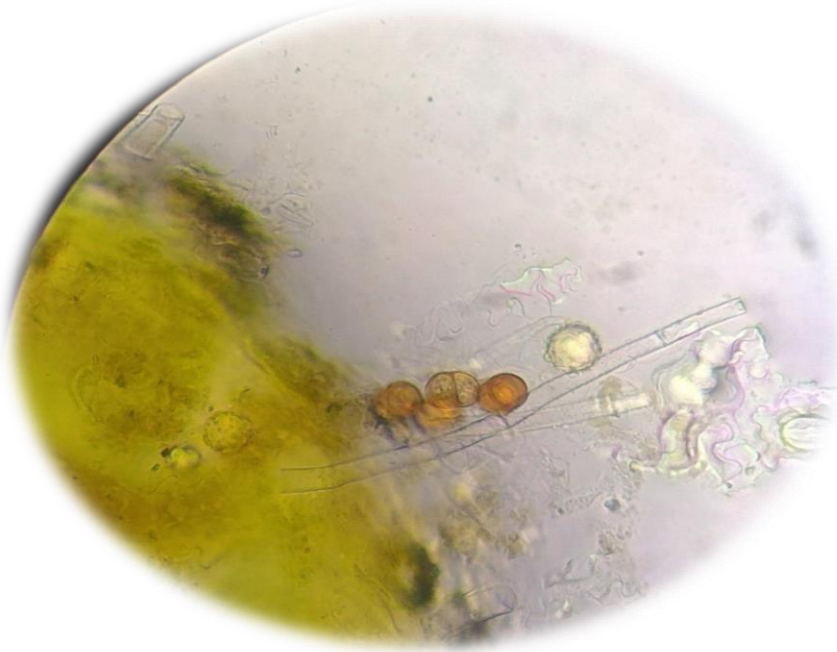


Resim-20: Diasitik stomalar (yaprak yüzeysel kesit, 1000x büyütme)

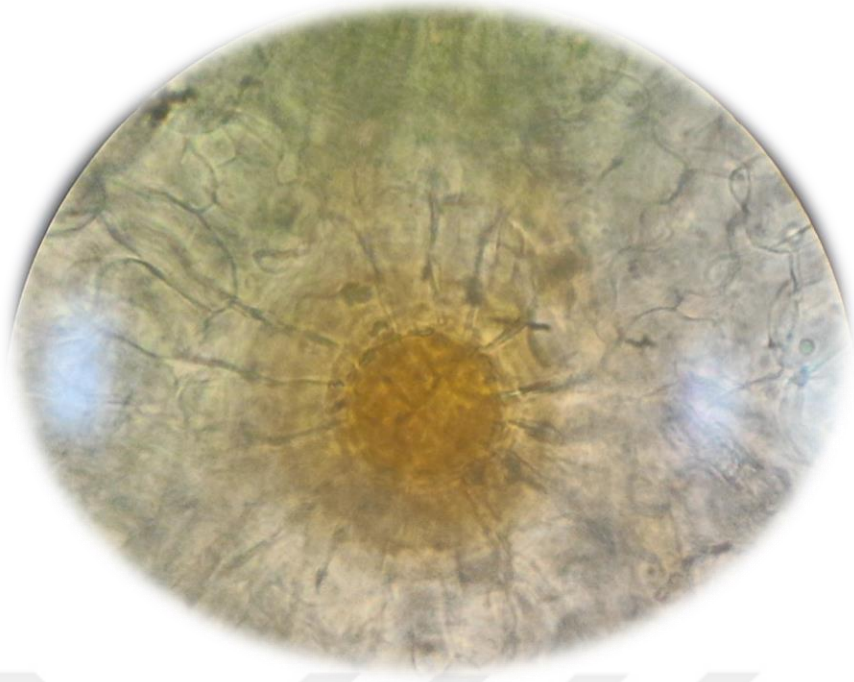
Labiatae tipi salgı tüyü bulunmaktadır. Labiatae tipi salgı tüyü tek hücreli sap ve çok hücreli (8-12 hücreli) baş kısmından oluşmaktadır. Mikroskop altında iki takson karşılaştırıldığında pek çok özelliklerinin benzer olduğu saptanmıştır.



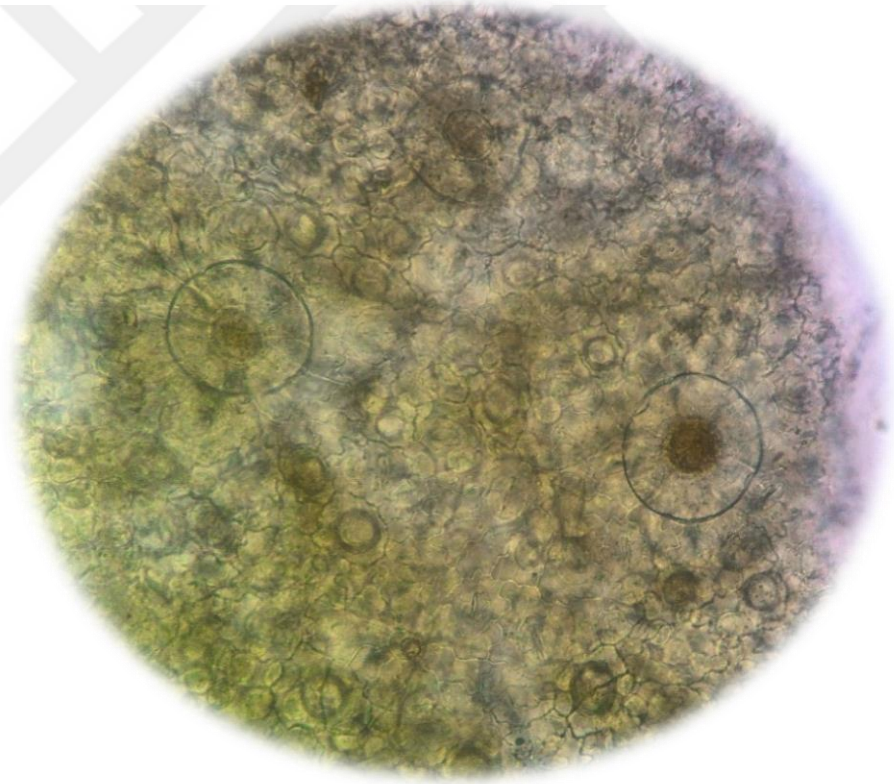
Resim-21: Labiatae tipi salgı tüyü üstten görünüş (yaprak yüzeysel kesit, 1000x büyütme)



Resim-22: Labiatae tipi salgı tüyü yandan görünüş (yaprak yüzeysel kesit, 400x büyütme)



Resim-23: Labiatae tipi salgı tüyü üstten görünüş (yaprak yüzeysel kesit, 1000x büyütme)



Resim-24: Labiatae tipi salgı tüyü üstten görünüş (yaprak yüzeysel kesit, 1000x büyütme)

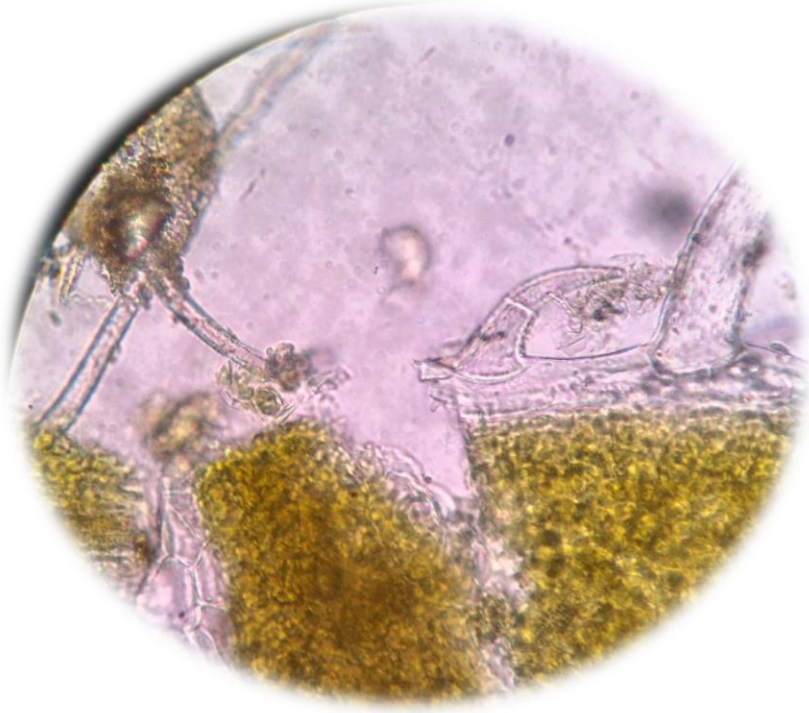
Çok sayıda bulunan örtü tüyleri kısa, konik, tek veya iki hücreli veya uzun şekillidir. Uç kısımları sivri olup genelde uniseriattır.



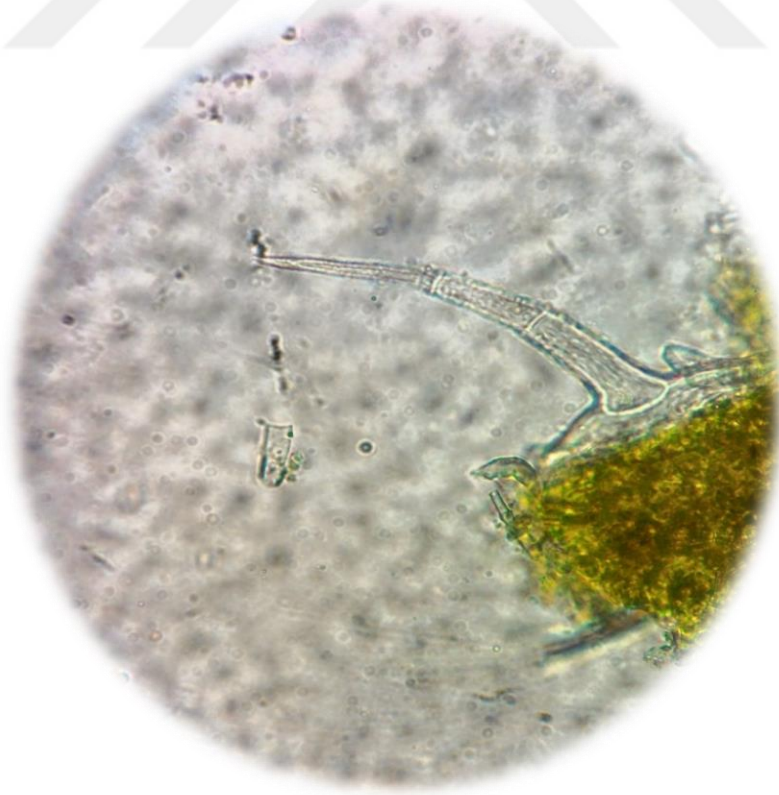
Resim- 25: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400x büyütme)



Resim- 26: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400x büyütme)



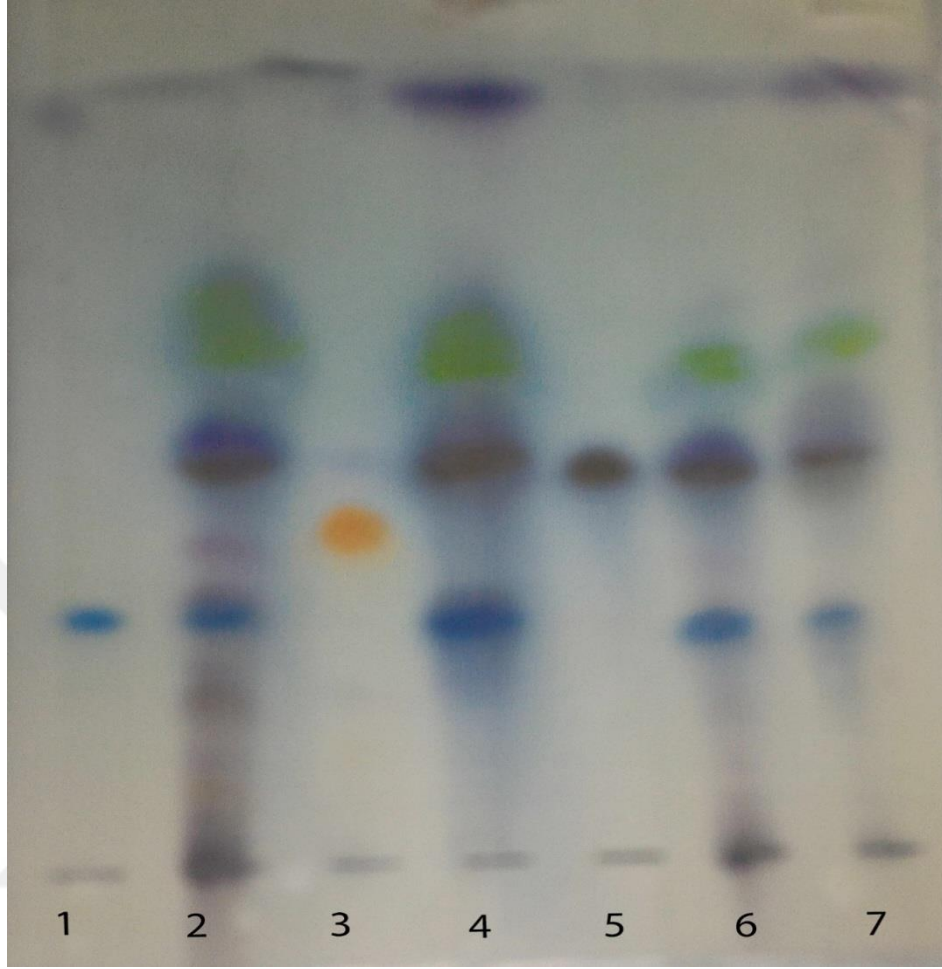
Resim- 27: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400x büyütme)



Resim- 28: Örtü tüyü (yaprak yüzeysel kesit, 400x büyütme)

4.2. Kimyasal Bulgular

4.2.1. İTK Analizi Bulguları



Resim-29: İnce Tabaka Kromatografisi (Uçucu yağ sonucu)

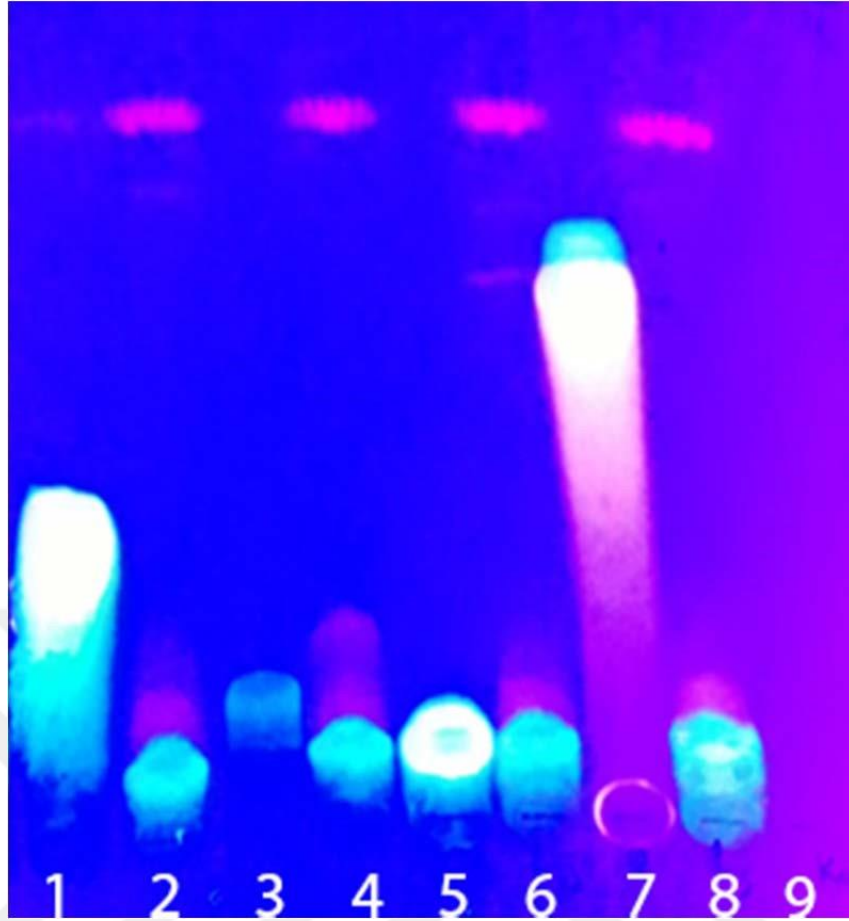
1: R_f : 0.34 Mentol

3: R_f :0.44 Piperiton

5: R_f :0.51 Pulegon

(2 ve 4 numara Long örneğine, 6 ve 7 numara TYP örneğine aittir).

R_f değerleri dikkate alındığında mentol ve pulegon kalitatif olarak ince tabaka kromatografisi yöntemi ile tespit edilmiştir.



Resim-30: İnce Tabaka Kromatografisi (Metanol ekstresi sonucu)

1. Rf : 0.48 -Kafeik asit
2. LONG (Mikrodalga ekstraksiyonu)
3. Rf: 0.23-Gallik asit
4. TYP
5. Rf : 0.20-Rozmarinik asit
6. LONG (Ultrasonik ekstraksiyonu)
7. Rf : 0.79-Kersetin
8. LONG (Soxhlet ekstraksiyonu)
9. Kateşin tespit edilemedi.

Metanolik ekstrelerden elde edilen sonuçlara bakıldığında; sadece rozmarinik asit hem iki alt türde hem de farklı ekstre tiplerinde kalitatif olarak tespit edilmiştir.

4.2.2. Spektrofotometrik Analiz Bulguları

Mikroalga Ekstraksiyonu:

Ekstraksiyon sonucunda ekstrelerin toplam fenol miktarının gallik asit eşdeğeri 25-39.9 (mg/g) aralığında olduğu saptanmıştır. Toplam flavonoit miktarının ise kersetin eşdeğeri 10.4-30.9 (mg/g) aralığında olduğu saptanmıştır.

Toplam fenol ve flavonoit miktarı sonuçlarına bakıldığında; her iki ekstraksiyon parametreleri birbirini doğrulamaktadır. Buna göre referans alınan bileşenlerin yapıları da düşünüldüğünde, 400W, 40°C, 1:20 oran ve 20 dk. değerlerinin bu çalışmada yapılacak ekstraksiyon işlemi için uygun olduğuna karar verilmiştir. Ekstraksiyon metodu belirlendikten sonra ekstraksiyonda kullanılacak çözücü için su ve metanol ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılmıştır. Aynı ekstraksiyon metodu kullanılarak da farklı taksonlar arasındaki değişiklikler araştırılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki Tablo-7'deki gibi hesaplanmıştır:

Tablo-7: Mikroalga Ekstraksiyon Sonucu			
	Toplam Fenol Miktarı (mg/g)	Toplam Flavonoit Miktarı (mg/g)	
LONG (Su)	39.9±0.01	26.3±0.19	
LONG (MeOH)	93.6±0.02	69.5±0.26	
TYP (Su)	46.6±0.03	32.8±0.18	
TYP (MeOH)	143.5±0.04	70.9±0.39	

Yukarıdaki sonuçlara bakıldığında metanol ile hazırlanan ekstrelerin toplam fenol ve flavonoit içerikleri daha fazladır. Ayrıca taksonlar arasında TYP ekstre değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Ultrasonik Ekstraksiyon:

Ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrelerle ait toplam fenol ve flavonoit miktarı Tablo-8'de yer almaktadır.

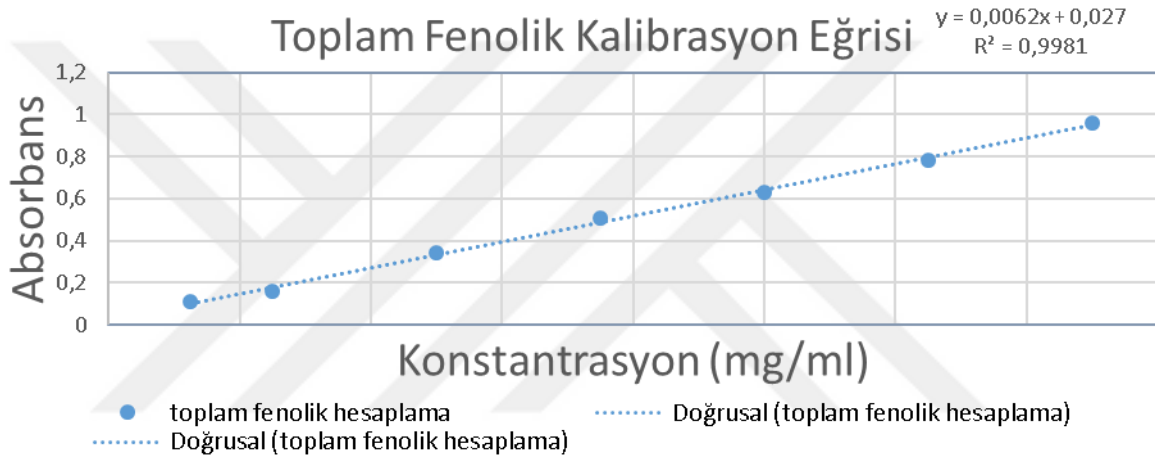
Tablo-8: Ultrasonik Ekstraksiyon Sonucu		
	Toplam Fenol Miktarı (mg/g)	Toplam Flavonoit Miktarı (mg/g)
3 saat	165.4±0.02	68.2±0.09
6 saat	176.9±0.04	60.3±0.14
9 saat	177.6±0.04	61.96±0.12

Soxhlet Ekstraksiyonu:

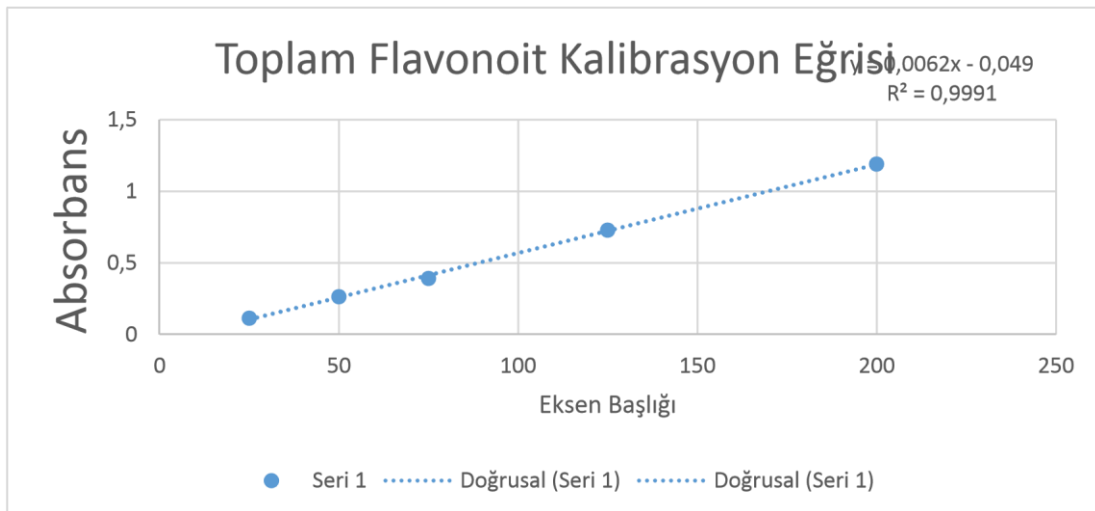
Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstratlara ait toplam fenol ve flavonoit miktarı Tablo-9’de yer almaktadır.

Tablo-9: Soxhlet Ekstraksiyon Sonucu		
	Toplam Fenol Miktarı (mg/g)	Toplam Flavonoit Miktarı (mg/g)
3 saat	162.3±0.05	64.14±0.21
6 saat	169±0.04	64.14±0.42
9 saat	166.6±0.03	65.9±0.08

Toplam fenol ve flavonoit analizlerine ilişkin kalibrasyon eğrileri şekil-13 ve şekil14’de yer almaktadır.

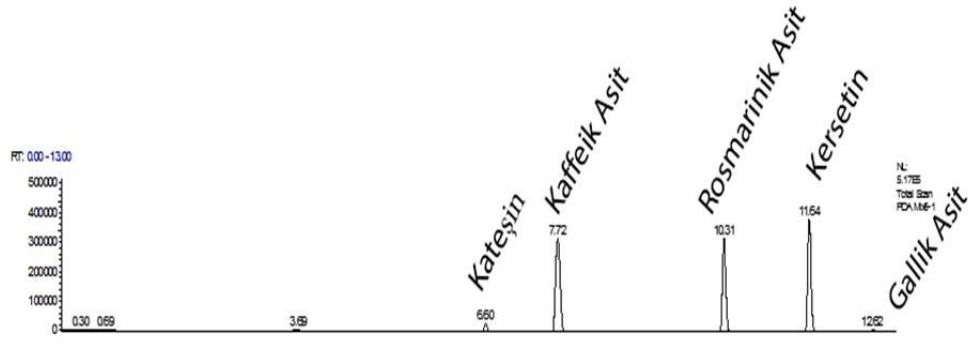


Şekil-13: Toplam fenolik kalibrasyon eğrisi

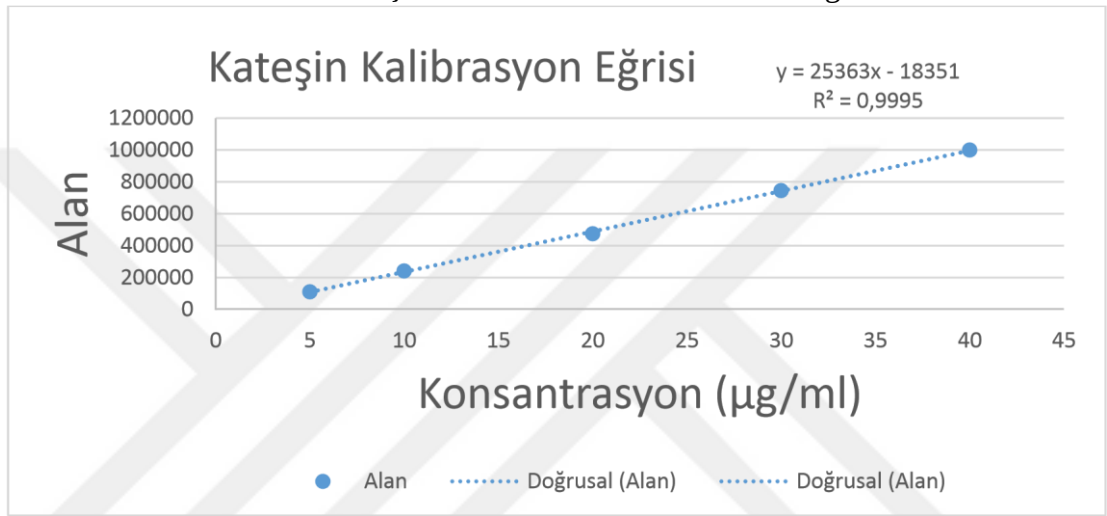


Şekil-14: Toplam flavonoit kalibrasyon eğrisi

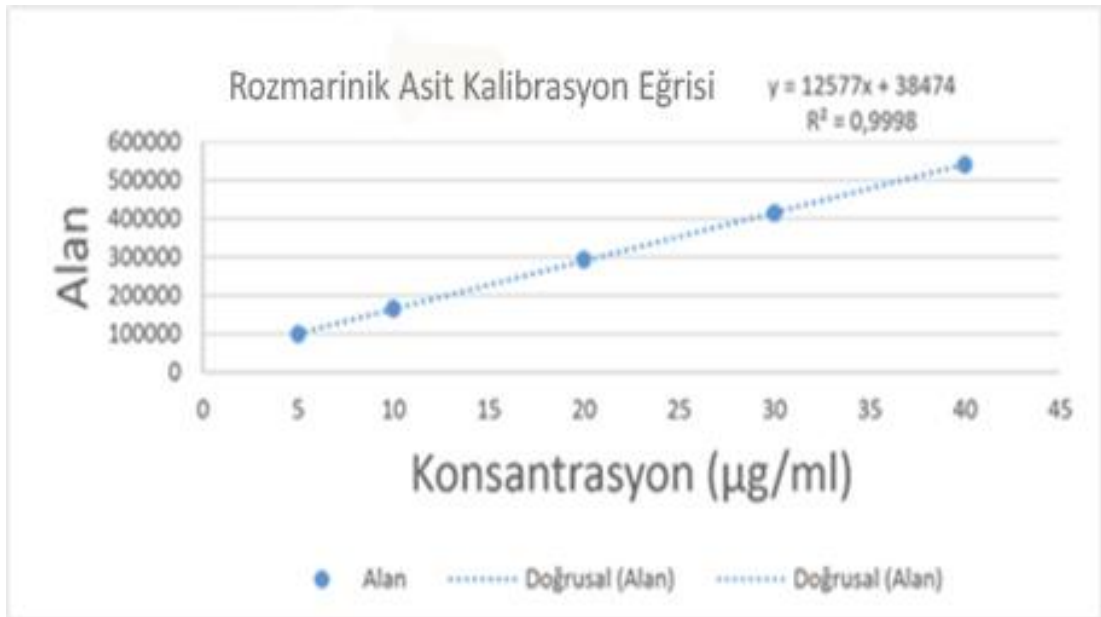
4.2.3. UHPLC Analizi Bulguları



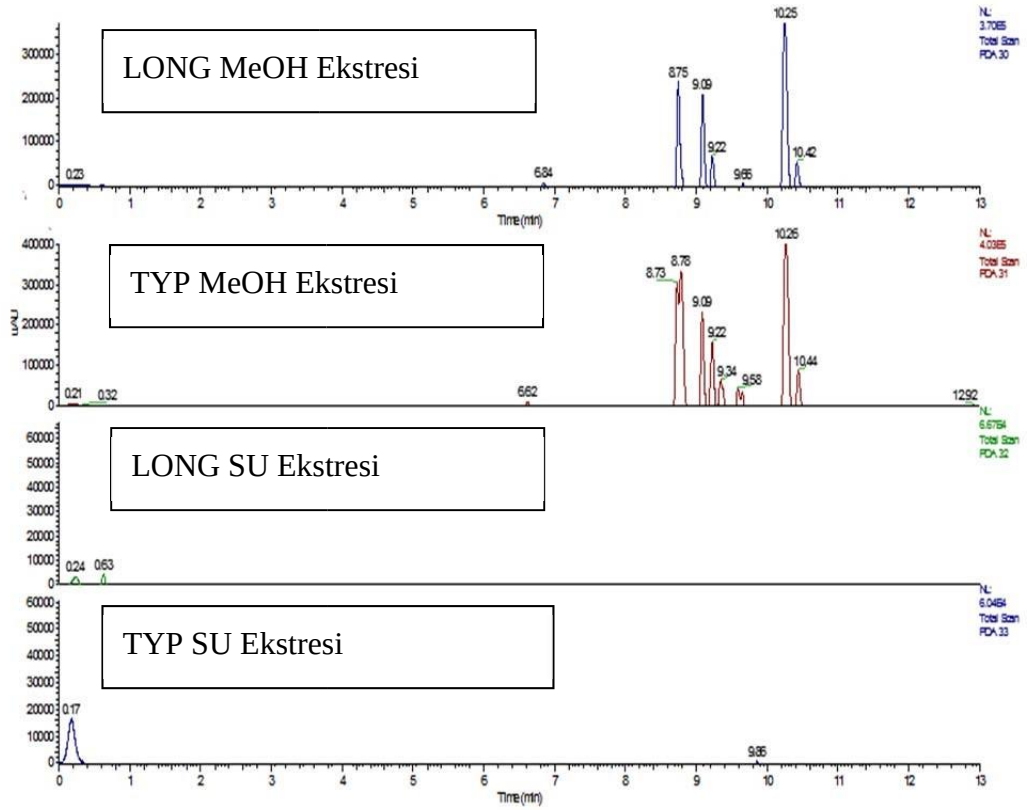
Şekil-15: Standartlara ait kromatogram



Şekil-16: Kateşin'e ait kalibrasyon grafiği



Şekil-17: Rozmarinik Asit'e ait kalibrasyon grafiği



Şekil-18: Ekstrelelere ait kromatogramlar (Yukarıdan aşağıya doğru; LONG Metanol ekstresi, TYP metanol ekstresi, LONG su ekstresi, TYP su ekstresi)

Kromatogramlar incelendiğinde; metanol ekstrelerimizde rosmarinik asit ve kateşin bulunduğu görülmektedir. Bu maddelerin ekstrelerdeki miktarları hesaplanmış ve Tablo-10’da verilmiştir:

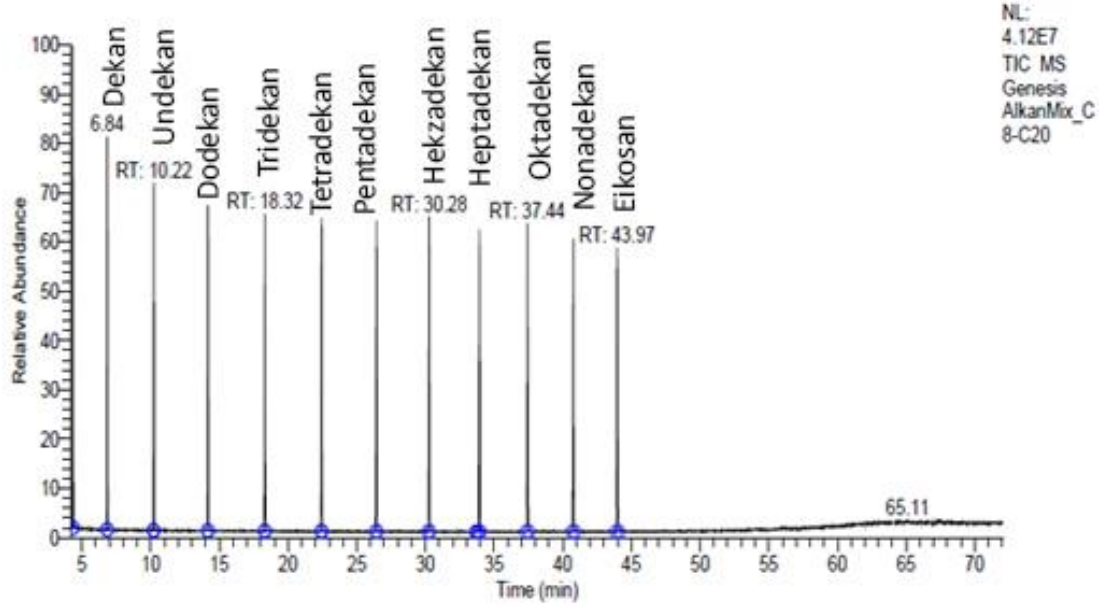
Tablo-10: Ekstrelerin Kateşin ve Rozmarinik Asit miktarları		
	Kateşin (mg/g)	Rozmarinik Asit (mg/g)
TYP (Mikrodalga Ekst.)	3.25±0.01	29.52±0.56
TYP (Soxhlet Ekst.)	3.23±0.15	21.82±0.92
TYP (Ultrasonik Ekst.)	3.25±0.02	19.73±0.09
LONG (Mikrodalga Ekst.)	3.20±0.03	29.20±0.44

4.2.4. GC-MS Analizi Bulguları

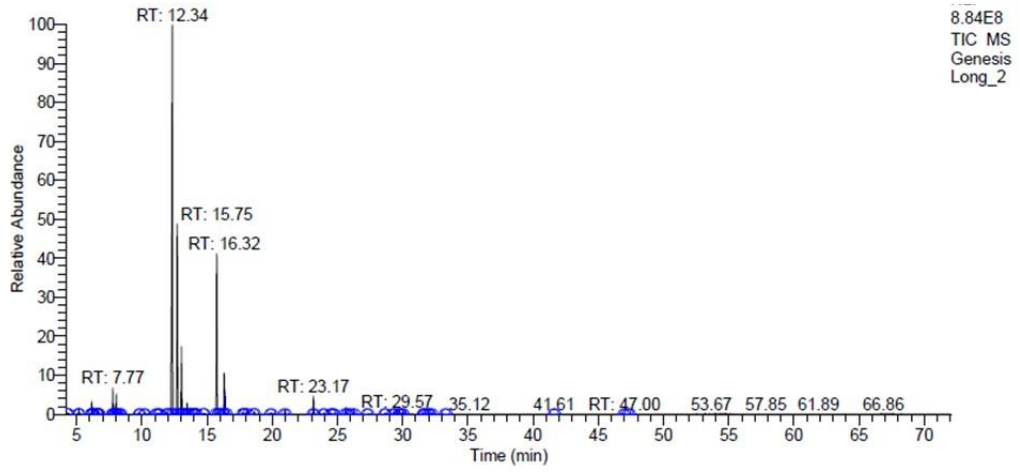
Hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağların GC-MS yardımıyla uçucu bileşenleri belirlenmiştir. LONG taksonunda %2, TYP taksonunda ise % 1.75 (ml/g) uçucu yağ elde edilmiştir. Majör bileşenler Tablo-11-12’deki gibidir:

Tablo-11: LONG uçucu yağ majör bileşenleri			
LONG	AI	RT	AREA(%)
Menton	1154	12.34	43.20
İzomenton	1163	12.72	17.32
Pulegon	1238	15.75	15.07

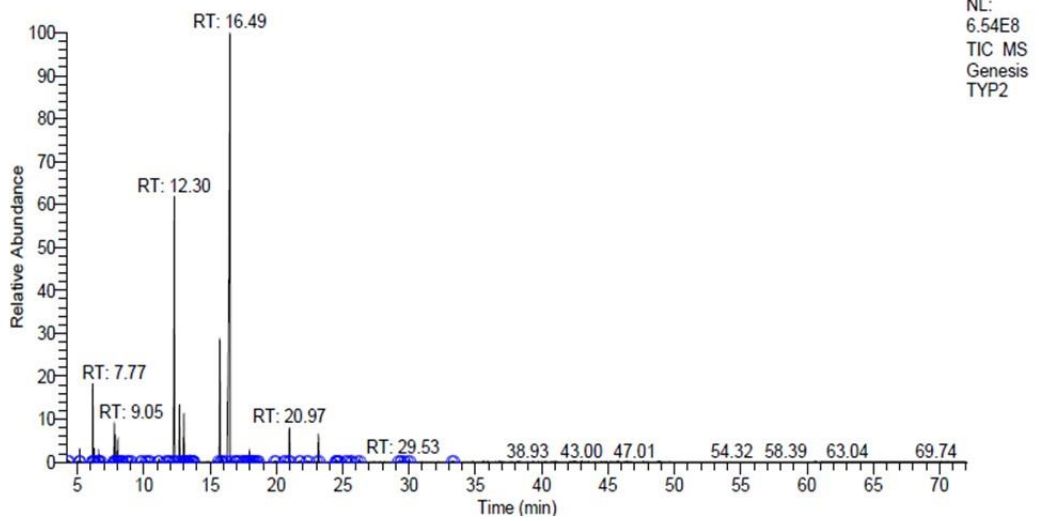
Tablo-12: TYP uçucu yağ majör bileşenleri			
TYP	AI	RT	AREA(%)
Menton	1153	12.30	16.46
İzomenton	1163	12.69	3.78
Pulegon	1238	15.74	7.81
Cis-Piperiton oksit	1256	16.90	49.55



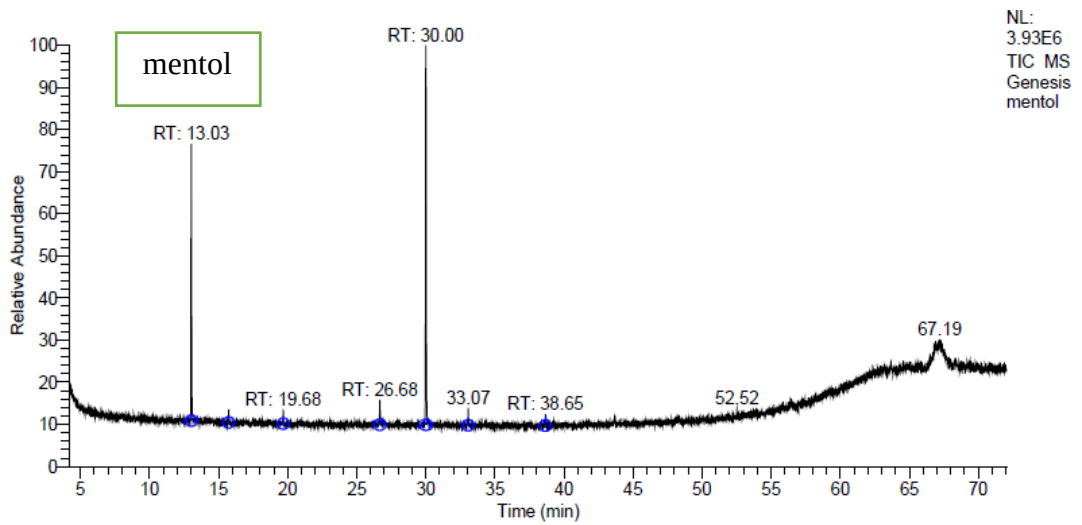
Şekil-19: Alkan karışımı GC-MS kromatogramı



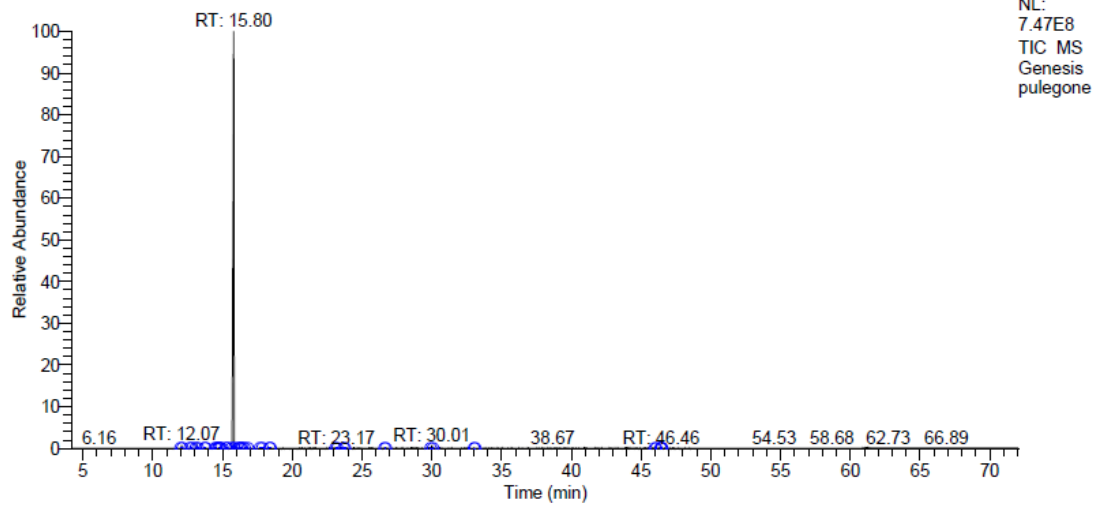
Şekil-20: LONG GC-MS kromatogramı



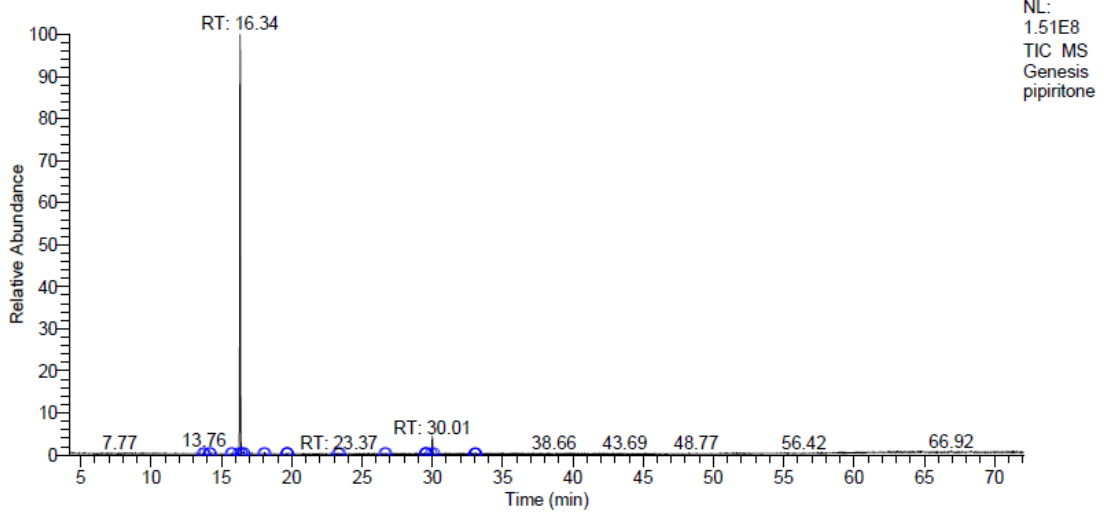
Şekil-21: TYP GC-MS kromatogramı



Şekil-22: Mentol GC-MS kromatogramı



Şekil-23: Pulegon GC-MS kromatogramı



Şekil-24: Piperiton GC-MS kromatogramı

Tablo-13: <i>Mentha longifolia</i>(L.) Hudson subsp. <i>longifolia</i> (L.) Hudson				
RI	AREA (%)		Similarity Indis (SI)	GS-MS Kütüphanesi
933	0.32	α -pinen	963	Mainlib
			962	Wiley
972	0.64	sabinen	989	Wiley
977	0.42	β -pinen	982	Wiley
990	0.37	β -mirsen	978	Wiley
994	0.15	3-oktanol	952	Wiley
			941	Replib
1028	1.76	limonen	975	Wiley
			975	Mainlib
1030	0.52	1.8-sineol	978	Replib
			975	Wiley
1036	1.23	(Z)- β -osimen	990	Wiley
			983	Replib
1046	0.11	(E)- β -osimen	920	Wiley
1154	43.2	menton	983	Wiley
1163	17.32	izomenton	977	Replib
			977	Wiley
1171	5.51	mentol	991	Mainlib
			986	Wiley
1171	35.58	mentol (standart madde)	922	Wiley
1174	0.39	isopulegon	921	Wiley
			920	Replib
1182	0.97	neo-mentol	983	Wiley
1188	0.43	neoisomentol	973	Wiley
1195	0.1	mirtenal	909	Wiley
1238	15.07	pulegon	977	Replib
			977	Wiley
1239	97.47	pulegon (standart madde)	978	Replib
			978	Wiley
1253	3.94	cis-piperiton oksit	970	Wiley
1293	0.39	metil asetat	955	Wiley
			952	Mainlib
1338	0.13	Piperiton	907	Wiley
1252	94.44	piperitenon (standart madde)	986	Wiley
			981	Replib

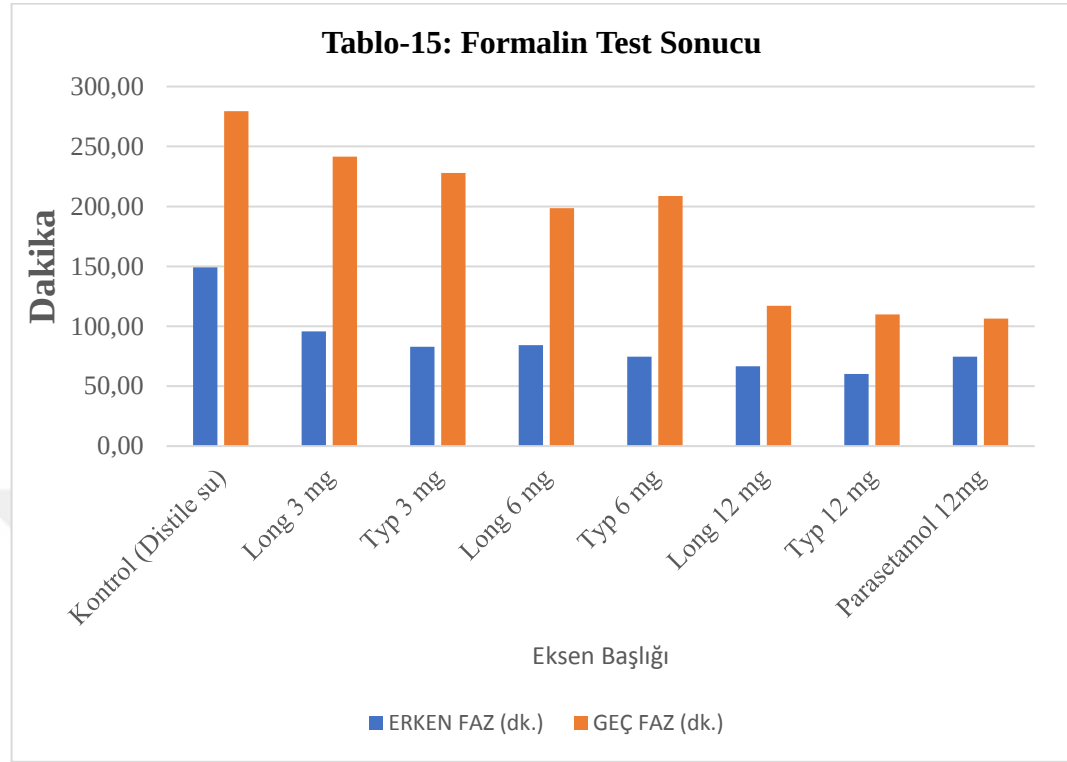
1364	0.39	piperiton oksit	977	Wiley
1418	1.66	β -(E)-karyofillen	982	Wiley
			976	Replib
1480	0.61	germakren D	976	Wiley
1495	0.48	o-menth-8-ene, 4-izopropiliden-1- vinil-	917	Replib
			917	Wiley
1575	0.24	spatulenol	916	Mainlib
			916	Wiley
			871	Replib
1582	0.44	D-viridiflorol	918	Wiley

Tablo-14: <i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson subsp. <i>typhoides</i> (Briq.) Harley var. <i>typhoides</i> (L.) Hudson				
AI	AREA (%)		Similarity Indis (SI)	GS-MS Kütüphanesi
933	0.52	α -pinen	971	Wiley
972	0.64	sabinen	991	Wiley
977	0.62	β -pinen	986	Wiley
990	0.52	β -mirsen	983	Wiley
994	0.27	3-oktanol	965	Wiley
			959	Replib
1028	1.93	limonen	978	Wiley
			977	Mainlib
1030	1.36	1.8-sineol	984	Replib
			982	Wiley
1036	1.02	(Z)- β -osimen	988	Wiley
			980	Replib
1046	0.09	(E)- β -osimen	920	Wiley
1057	0.05	γ -terpinen	886	Wiley
			880	Mainlib
1065	0.15	cis-sabinen hidrat	936	Wiley
1123	0.14	3-oktanil asetat	879	Replib
			879	Wiley
986	16.46	menton	986	Wiley
1163	3.78	izomenton	978	Wiley
			977	Replib
1171	2.84	mentol	991	Mainlib
			985	Wiley
1171	35.58	mentol (standart madde)	922	Wiley

1174	0.16	isopulegon	897	Wiley
			896	Replib
1176	0.11	terpin-4-ol	919	Wiley
			909	Mainlib
1182	0.4	neo-mentol	978	Wiley
1188	0.17	L- (-)-mentol	947	Wiley
1190	0.08	α -terpineol	895	Wiley
			893	Mainlib
			891	Replib
1238	7.81	pulegon	979	Replib
			979	Wiley
1239	97.47	pulegon (standart madde)	978	Replib
			978	Wiley
1242	0.3	D-karvon	947	Wiley
			930	Replib
1256	49.55	cis-piperiton oksit	978	Wiley
1291	0.62	timol	973	Replib
			973	Wiley
1293	0.38	metil asetat	949	Wiley
			945	Mainlib
1298	0.19	diosfenol	891	Wiley
			891	Mainlib
1364	2.29	piperiton oksit	989	Wiley
1418	1.92	β -(E)-karyofillen	985	Mainlib
			978	Replib
			977	Wiley
1480	0.44	germakren d	971	Wiley
1496	0.22	o-menth-8-ene, 4- isopropiliden-1- vinil-	898	Replib
			898	Wiley
1575	0.15	spatulanol	879	Wiley
1580	0.37	karyofillen oksit	936	Wiley
			935	Replib
			932	Mainlib

4.3. Antinosiseptif Aktivite Bulguları

4.3.1. Formalin Testi Bulguları



4.3.2. Hot Plate Testi Bulguları

Tablo-16: Hot Plate Test Sonucu (gecikme süresi sn)			
	15 dk	30 dk	60 dk
Pozitif Kontrol 400 mg/kg (Parasetamol)	6.51±0.59	5.63±4.91	6.33±2,75
Negatif Kontrol (Distile Su)	1.49±1.46	2.10±1.07	2.08±1.10
TYP 100 mg/kg	2.96±2.04	2.98±0.97	3.11±2.48
TYP 200 mg/kg	5,39±4.11	4.11±1.33	3.43±0.51
TYP 400 mg/kg	4,81±0,56	6.76±1.63	6.65±0.70

4.3.3. Akut Toksisite Testi Bulguları

48 saat sonra hem TYP hem de LONG ekstrelerinde herhangi bir ölüm gözlenmemiştir. Bunun sonucu olarak LD₅₀ > 3200 mg/kg olarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

3 farklı floristik bölgeye sahip olan ülkemiz, coğrafi konumu, jeolojik yapısı, toprak özellikleri ve farklı iklim bölgeleri nedeniyle 11.707 bitki türünün doğal yayılış gösterdiği ve endemizm oranının oldukça yüksek olduğu (%31,3) zengin bir flora sahiptir.

Lamiaceae (Labiatae) familyası, ülkemiz florasını oluşturan familyalar içinde Asteraceae ve Fabaceae'den sonra en çok türe sahip olan 3. familyadır. Ülkemizde 43 cins ve 610 tür ile temsil edilmektedir. Lamiaceae, Lamiales ordosunun en zengin familyasıdır. Toplam 236 cins ve 7.000'den fazla tür içermektedir. Sıcak ve ılıman bölgelerde, geniş alanlarda yayılış gösteren ve etnobotanik açıdan önemli olan familyanın üyeleri otsu, yarı çalı veya çalı ve aromatik bitkilerdir (24-26).

Mentha longifolia, Lamiaceae (Labiatae) familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Türkiye'de geniş yayılış gösteren *Mentha longifolia*'nın ülkemizde 3 taksonu yayılış göstermektedir (18-20).

Halk arasında bitkinin taze veya kurutulmuş sürgün ve yaprakları çay ve baharat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yaprakları ve çiçekli sürgünleri, ekstre, şurup, esans şeklinde ve suyu sıkılarak kullanılmaktadır. Kuvvet verici, hazmı kolaylaştırıcı, öksürük giderici, yatıştırıcı, gaz giderici, bulantıyı önleyici, ishale ve kasılmalara karşı etkili olduğu bilinmektedir. Geçmişte özellikle baş ağrısı olmak üzere çeşitli ağrılar için kullanıldığı bilinmektedir (21-23).

Genel olarak *Mentha longifolia* taksonlarında bulunduğu saptanan fitokimyasallar; alkaloitler, saponinler, glikozitler, tanenler, antrakınonlar, terpenoitler, fenoller ve flavonoidlerdir. Yapılan çalışmalarda kateşin, rosmarinik asit, apigenin, luteolin, naringenin, kafeik asit, gallik asit ve rutin gibi fenolik bileşikler tespit edilmiştir. *Mentha longifolia* taksonları fenolik bileşiklerinden dolayı antioksidan, antiülser, hepatoprotektif, antienflamatuar, antidiyabetik ve kolagog gibi birçok etkiye sahiptir. Uçucu yağından dolayı da antimikrobiyal, antispazmodik, karminatif ve antiviral etkisi olduğu bilinmektedir (70-74).

Bu tez çalışmasında Giresun'un Dereli ilçesinin Kümbet köyündeki Uzundere kenarından Ekim 2015 tarihinde toplanmış olan (İZE 6054 ve 6055) *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* ve *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides*'in

morfolojik ve anatomik özellikleri, uçucu yağ bileşimi, yaprak ekstrelerinin fenolik bileşikleri ve analjezik aktivitesi araştırılmıştır.

Taksonlarımız morfolojik ve organoleptik olarak litaretürde belirtilen özellikleri göstermektedir. *Mentha* cinsine ait diğer türlerden gövde yapraklarının ortada, üst kısımda daha geniş olması ve yapraklarının sesil olmasıyla ayrılır. Yapraklar üzerinde, 30x büyütme yapabilen mercek ile gerçekleştirilen makroskobik incelemelerde şu genel özellikler tespit edilmiştir: Yapraklar genellikle 50 x 20 mm'den daha küçük, sapsız veya nadiren saplı, oblong-eliptikten oblong lanseolata kadar, ortanın üst kısmında daha geniş, ucu $\pm$ akut, tabanı kordattan subkordata kadar, kenarı çok sayıda düzensiz ve sıklıkla yayılmış dişli keskin serrattır. Lamina pürüzsüz veya hafifçe pürüzlü, üst tarafı yeşilden gri-tomentoza kadar, alt tarafı yeşilden beyaz-tomentoza kadar, her iki yüzeyinde de bazen ince, çok kısa yumuşak tüylüdür (Resim 12-16) (34).

İncelemelerimiz esnasında taksonların özellikleri karşılaştırılmış ve farklılıkları tespit edilmiştir. Taksonların yapraklarının sesil olmasıyla taksonlardan ayrılmaktadır. *Mentha longifolia* subsp. *longifolia*'da, yapraklar yeşil 50 mm x 18 mm'den büyüktür. Alt yüzünde ince çeperli tüyler bulunmaktadır. Yapraklar kurduğunda belirgin şekilde buruşmaktadır. Spika güçlüdür. Dallar sesil veya subsesildir. *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides*'in yaprakları gri-tomentoz iken diğer takson olan *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *calliantha*'nın yaprakları yeşildir. *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides*'in yaprakları genellikle 50 mm x 20 mm'den küçüktür. Alt yüzünde kalın çeperli tüyler bulunmaktadır. Yapraklar kurduğunda çok az buruşmaktadır. Spika daha incedir. Dallar pedunkulattır. (Resim 12-16) (34).

Toz drog üzerinde, Sartur, Kloralhidrat reaktifi ve Zeiss-Primo Star mikroskop kullanılarak yapılan incelemelerde şu özellikler tespit edilmiştir: Yaprak dokusundaki epidermis hücreleri kıvrımlı-dalgalı duvarlı olup, kütikula tabakası çizgilidir. Üst epidermiste birkaç tane stoma bulunur veya hiç stoma bulunmamaktadır. Stomalar ağırlıklı olarak alt epidermiste bulunmaktadır. Stoma tipi diasitiktir. Yaprak kenarının yakınındaki epidermis hücreleri ise daha düz kenarlı izodiyametrik şekilli, belirgin bir şekilde boncuk şeklinde olup antiklinal duvarda çukurlaşma görülmektedir. Tek hücreli sap ve çok hücreli (8-12 hücreli) baş kısmından oluşan Labiatae tipi salgı tüyü bulunmaktadır. Çok sayıda bulunan örtü tüyleri kısa, konik, tek veya iki hücreli veya uzun şekillidir. Uç kısımları sivri olup

genelde uniseriattır. Mikroskop altında iki takson karşılaştırıldığında pek çok özelliklerinin benzer olduğu saptanmıştır. 10x ve 40x oküler ile bakıldığında TYP örneklerinde yoğun tüy yapıları görülmektedir. LONG örneklerinde bu yapılar daha seyrek görülmektedir. 100x oküler altındaki görüntüler fotoğraf makinası ile kaydedilmiştir (Resim 17-28).

Mentha longifolia subsp. *longifolia* ve *Mentha longifolia* subsp. *typhoides* var. *typhoides* taksonlarından hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağlarda mentol ve pulegonun varlığı kalitatif olarak İTK ile tespit edilmiştir (Resim 12, 30). Literatürde % 0.75-1.07 elde edilen uçucu yağ miktarları çalışmamızda kullandığımız taksonlarda ilk takson için %2, ikinci takson için %1.75 olarak tespit edilmiştir. Taksonlarımızın yapraklarda bulunan uçucu yağ miktarlarının daha fazla olduğu görülmüştür.

Yaptığımız literatür araştırmasında, bir çalışmada *Mentha longifolia* (L.)'da piperiton oksit (%28.3), piperiton (%24.9), germakren D (%8.16), borneol (%5.96) ve β -karyofillen (%5.94) anabileşenler olarak belirlenmiştir. Diğer bir çalışmaya göre pulegon (%54.41) izomenton (%12.02), 1,8-sineol (%7.4), borneol (%6.85) ve piperiton oksit (%3.19) ana bileşenler olarak belirlenmiştir. Başka bir çalışmada ise *cis*-piperiton epoksit (%7.8-77.6), piperiton oksit (%1.5-49.1), karvon (%0.0-21.5), pulegon (%0.3-5.4), menton (%0.0-16.6), timol (%1.5-4.2), β -tuyon (%0.2-3.2), karvakrol (%0.0-2.7), ve (*E*)-karyofillen (%0.9- 2.5) ana bileşen olarak saptanmıştır. LONG ile yapılan bir çalışmada *cis*-piperiton epoksit (%18.4), pulegon (%15.5) ve piperiton oksit (%14.7) anabileşen olarak saptanmıştır. TYP ile yapılan bir çalışmada piperiton oksit, piperiton oksit, pulegon ve karvon ana bileşenler olup, ülkemizde karadeniz bölgesinde piperiton oksit, linalol, karvon, trans-sabinen hidrat, menton ve β -karyofillen ana bileşen olarak kayıtlarda yer almaktadır. Her iki taksona ait uçucu yağın içerikleri GC-MS ile belirlenmiştir. Çalışmamızda *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* (L.) Hudson yapraklarından elde edilen uçucu yağında menton (%43.20), izomenton (%17.32), pulegon (%15.07); *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides* (L.) Hudson yapraklarından elde edilen uçucu yağında ise *cis*-piperiton oksit (%49.55), menton (%16.46), pulegon (%7.81), izomenton (%3.78) ana bileşenler olarak saptanmıştır (Şekil 19, 20) (Tablo 11-14) (77,78,81, 146,161).

LONG taksonunda yer alan α -pinen, sabinen, β -pinen, β -mirsen, 3-oktanol, limonen, 1.8 sineol, (Z)- β -osimen, (E)- β -okimen, menton, izomenton, mentol,

pulegon, piperiton, piepriton oksit, β -(E)-karyofillen, germakren D, spatulenol bileşenleri ile TYP taksonunda yer alan α -pinen, sabinen, β -pinen, β -mirsen, 3-oktanol, limonen, 1.8 sineol, (Z)- β -osimen, (E)- β -osimen, γ -terpinen, cis-sabinen hidrat, menton, izomenton, mentol, pulegon, timol, piperiton, piepriton oksit, β -(E)-karyofillen, germakren D, spatulenol, karyofillen oksit bileşenleri literatür çalışmamızda diğer çalışmalarda da saptandığı görülmüştür (77,78,81, 146,161).

Analiz ve aktivite çalışmalarında kullanılacak ekstrelerin hazırlanması için ekstraksiyon yöntemleri olarak; mikrodalga ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu, solvan olarak ise metanol ve su seçilmiştir (Resim 4-10).

Fenolik maddeler bitkilerde hücre boşluklarında veya hücre duvarına bağlı olarak ester veya eter şeklinde bulunmaktadır. Çözücü kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda; çözücünün katıya nüfuz etmesi, çözgenin katı matriksi çözündürmesi ve çıkarılması, yüzeye difüzyon gibi parametreler önemlidir. Bitki hücrelerinin parçalanmasıyla protoplazmanın daha geçirgen hale gelmesi katı-sıvı ekstraksiyonunda önemli bir adımdır. Bitki öğütülerek partikül boyutu azaltılmaktadır. Bu şekilde çözücünün hücre duvarına ve sitoplazmaya erişimi kolaylaşmaktadır.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon tekniğinde, mikrodalga ile çözücü ve bitki dokuları ısıtılarak ekstraksiyon kinetiği arttırılmakta ve karışım hızlandırılmaktadır. Mikrodalgaların hücre yüzeyinde meydana getirdiği değişimler elektron mikroskobu yardımıyla görüntülenmiştir. Mikrodalga ekstraksiyonu; ekstraksiyon süresinin kısa olması, çözücü miktarının az olması, düşük maliyet ve yüksek verim gibi avantajları sayesinde son yıllarda diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (63).

Çalışmamızda kullandığımız mikrodalga cihazında tüplere konulan bitki parçacıkları çözücünden hafif olduğu için tüpün üst kısmında toplanmıştır. Optimizasyon çalışması sırasında bitkinin çözücüyle muamelesinin arttırılmasının verimi arttırdığı görülmüştür. Ancak tüp haznelerinin küçük olması çok az miktarlarda, çok tekrarlı çalışma yapmayı zorunlu hale getirmiştir. Daha farklı bir tüp yapısı ve çalkalayıcı desteğiyle yapılacak bir mikrodalga ekstraksiyonunda verimin yükseleceği öngörülmüştür.

Genellikle *Mentha longifolia* (L.)’da 4 biyoaktif molekül grup bulunur. Bunlar fenolik asit, flavonoit, monoterpenler ve triterpenlerdir. En sık bulunan fenolik bileşik rozmarinik asittir. İTK çalışmalarında; metanol ekstralarında yukarıdaki 4 grupta yer

alan rozmarinik asit, gallik asit, kafeik asit, kersetin ve kateşin fenolik asit ve flavonoidleri; uçucu yağda da mentol, piperiton ve pulegon monoterpen bileşikler araştırılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında; sadece rozmarinik asitin hem her iki taksonda hem de farklı yöntemlerle elde edilen ekstre tiplerinde kalitatif olarak tespit edildiği görülmüştür. Monoterpenlerden ise mentol ve pulegon her iki taksonda da tespit edilmiştir. Rozmarinik asit ve kateşinin UPLC analizi ile miktarları tespit edilmiştir. Buna göre LONG ve TYP örneklerinin içerdikleri kateşin miktarı sırasıyla 3.20 ± 0.03 , 3.25 ± 0.01 mg/g; rozmarinik asit miktarı ise 29.20 ± 0.44 , 29.52 ± 0.56 mg/g içerdikleri saptanmıştır. Bu veriler mikrodalga ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrelerde hesaplanmıştır. 3 farklı ekstraksiyon tekniklerini (mikrodalga Soxhlet, ultrasonik) karşılaştırmak için TYP örneği kullanılarak yapılan çalışmada kateşin miktarı sırasıyla 3.25 ± 0.01 , 3.23 ± 0.15 , 3.25 ± 0.02 mg/g olduğu belirlenmiştir. Rozmarinik asit miktarı ise 29.52 ± 0.56 , 21.82 ± 0.92 , 19.73 ± 0.09 mg/g olduğu belirlenmiştir. Kateşin üzerinde ekstraksiyon çeşidinin etkisi görülmezken rozmarinik asit miktarının mikrodalga ekstraksiyonda en fazla ultrasonik ekstraksiyonda ise en az olduğu tespit edilmiştir (Şekil-15-18) (Tablo-10) (Resim 29,30) (183,185).

Her iki taksona ait, mikrodalga ekstraksiyonu ile elde edilen metanol ve su ekstralarının toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu metoduna göre tespit edilmiş olup, standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Söz konusu ekstraların toplam flavonoid miktarı ise alüminyum klorit-kolorimetrik metodu kullanılarak saptanmış, standart olarak kersetin kullanılmıştır. Literatürde toplam fenol miktarı gallik asit eşdeğeri 71.43, 93.47 mg/g (metanol ekstraları), 30.32, 113.8 mg/g (etanol ekstresi) tannik asit eşdeğeri 67.2 mg/g (metanol ekstraları), rutin eşdeğeri 288.82 mg/g (etanol ekstresi) ve toplam flavonoid miktarı kateşin eşdeğeri 12,35 mg/g (metanol ekstresi), rutin eşdeğeri 106.7 mg/g (etanol ekstresi) olduğu görülmüştür. Çalışmamızdaki sulu ekstraların toplam fenol miktarının gallik asit eşdeğeri 39.9-46.6 (mg/g) aralığında olduğu, toplam flavonoid miktarının ise kersetin eşdeğeri 26.3-32.8 (mg/g) aralığında olduğu saptanmıştır. Metanol ekstralarının toplam fenol miktarının daha yüksek olduğu ($93.6-177.6$ mg/g gallik asit eşdeğeri) ve en yüksek değerinin ultrasonik ekstraksiyon sonucu (177.6 mg/g) olduğu saptanmıştır. Metanol ekstraların toplam flavonoid miktarı ise ($60.3-70.9$ mg/g kersetin eşdeğeri) ve en yüksek değerinin mikrodalga ekstraksiyon sonucu olduğu (70.9 mg/g) saptanmıştır. Sulu ekstralarının toplam fenol miktarlarının literatürdeki diğer örneklerle göre düşük olduğu ancak

toplam flavonoit miktarlarının daha fazla olduğu görülmüştür. Buna karşın metanol ekstraktlarının toplam fenol ve flavonoit miktarlarının literatüre göre yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 13, 14, Tablo 7-9) (72,74, 78,142,182,186).

Buradan yola çıkılarak; 3, 6 ve 9 saat süreyle ultrasonik ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen TYP metanol ekstraktlarının da fenol ve flavonoit içeriği saptanmıştır. TYP metanol ekstraktları için; ekstraksiyonda kullanılan yöntemler karşılaştırıldığında, en yüksek fenol (9 saat, 177.6 ± 0.04 mg/g) ve flavonoit (3 saat, 68.2 ± 0.09 mg/g) içeriğinin ultrasonik ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktlarda olduğu tespit edilmiştir. Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen TYP metanol ekstraktlarında da fenol ve (en yüksek-6 saat, 169 ± 0.04 mg/g) ve flavonoit (en yüksek-9saat, 65.9 ± 0.08 mg/kg) miktarları saptanmıştır (Şekil 13, 14) (Tablo 7-9).

Cochrane kütüphanesi, Wiley kütüphanesi, Scopus, Pubmed, Sciencedirect veritabanlarında yapılan aramalarda bu taksonlarla ilgili deney hayvanları üzerinde yapılan bir analjezik çalışmaya rastlanılmamıştır. Metanol ekstraktlarının analjezik etkileri ilk aşamada formalin testi ile belirlenmiştir. Ekstraktların etkinliği parasetamolle karşılaştırıldığında LONG 400 mg/kg ve TYP 400 mg/kg metanol ekstraktlarının erken fazda akut ağrıda daha etkin olduğu, geç fazda (inflamasyon eşlik eder) ise parasetamole yakın bir etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Taksonlar arasında kayda değer bir farklılık olmamakla beraber TYP ekstraktlarının çok az farklılıkla daha etkin olduğu görülmüştür (Tablo 15).

Daha az deney hayvanı kullanmak için birbirine yakın sonuçlar gösteren taksonlardan 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg TYP metanol ekstresi ile hot plate yöntemi kullanılarak antinösetif etkisi araştırılmaya devam edilmiştir. Örnek uygulandıktan sonraki 15 dk. 30 dk. 60 dk. süreleri sonunda deney hayvanlarının sıcak plaka üzerindeki tepkileri 30 saniye boyunca gözlenmiştir. 15 dk. süre sonundaki tepkiler incelendiğinde parasetamolün daha etkin olduğu (tepki süresi 6.51 ± 0.59) 30 ve 60 dk. sonundaki tepki sürelerine bakıldığında 400 mg/kg TYP ekstraktlarının daha etkin olduğu görülmüştür (Tablo 16).

Akut toksisite testi için Lorke metodu kullanılmıştır. 48 saat sonunda hem TYP hem de LONG ekstraktlarında herhangi bir ölüm gözlenmemiştir. Bunun sonucu olarak $LD_{50} > 3200$ mg/kg olarak belirlenmiştir. Literatür verilerinde de toksik olmadığı belirtilen *Mentha longifolia* L. Hudson bitkisine ait bu iki taksonda gerçekleştirdiğimiz çalışmalar bu verileri desteklemektedir (68).

Günümüzde bitkilerin etken maddeleri, etkileri ve toksisiteleri gibi konulardaki multidisipliner çalışmalar gittikçe artarken, çalışmamızda elde edilen verilerin gelecekte yapılacak araştırmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır. Doğal yayılış ortamlarından bitki örneklerinin toplanması ile gerçekleştirilen çalışmalarımızın; hem aynı türe ait ülkemizde yayılış gösteren diğer taksonlar üzerinde hem de iyi tarım uygulamaları çerçevesinde üretilecek kültür bitkileri üzerinde, kimyasal içerik ve farmakolojik etki yönünden devam etmesi hedeflenmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mentha longifolia türünün farmakolojik etkileri etnobotanik çalışmalarla araştırılmıştır. Bu etkiler *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalarla bilimsel temellere dayandırılmıştır. Günümüzde bitkilerin etken maddeleri, etkileri ve toksisiteleri gibi konulardaki multidisipliner çalışmalar gittikçe artarken, çalışmamızda elde edilen verilerin gelecekte yapılacak araştırmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır. Elde ettiğimiz olumlu sonuçların ileri çalışmalarla zenginleştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmalara bitki kalitesini artıracak çalışmalar eklenmelidir. Bitkinin doğal ortamda toplanması sırasında yapılan gözlemler, daha verimli döller elde etmek için iyi tarım uygulamaları çerçevesinde yetiştirilmesi gerektiğini de göstermiştir.

İçerdiği fitokimyasal bileşenlerden dolayı birçok etki gösteren *Mentha longifolia* türü farmakopelerde yer almamaktadır. Bu kadar zengin etkiye sahip olan bu türün standardizasyon çalışmaları yapılmalı ve etkiyi belirleyen fitokimyasal grupların ekstraksiyon yöntemleriyle araştırılması gerekmektedir. Doğal yayılış ortamlarından bitki örneklerinin toplanması ile gerçekleştirilen çalışmalarımızın, hem aynı türe ait ülkemizde yayılış gösteren diğer taksonlar üzerinde hem de iyi tarım uygulamaları çerçevesinde üretilecek kültür bitkileri üzerinde, kimyasal içerik ve farmakolojik etki yönünden devam etmesi hedeflenmektedir.

7-KAYNAKLAR

1. Tuzlacı E. Türkiye'nin yabancı besin bitkileri ve ot yemekleri. Alfa yayınları, 1. Basım, İstanbul; 2011.
2. Frank JA. An illustrated history of the herbals. New York: Columbia University Press; 1977.
3. Boxer, Arabella & Back, Philippa. The Herb Book. London: Octopus Books; 1980.
4. Baytop T. Türkiye'de bitkiler ile tedavi; Geçmişte ve bugün. İstanbul: Nobel Yayınevi; 1999: S 13-45.
5. Ford, Brian J. Images of science: a history of scientific illustration. New York: Oxford University Press; 1993.
6. Grieve M. A modern herbal: the medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folk-lore of herbs, grasses, fungi, shrubs and trees, with all their modern scientific uses. New York; Dover Publications, Inc.; 1970.
7. Grigg B. Green pharmacy: A history of herbal medicine. New York: Viking Press; 1982.
8. Sibly E. Culpeper's english physician and complete herbal. London: J. Adlard; 1810.
9. Pedanius D. Codex Vindobonensis medicus graecus 1 of the Austrian National Library, Vienna; twelve miniatures. Graz, Austria: Akademische Druckerei und Verlagsanstalt; 1979.
10. Gunther, Robert T. The greek herbal of Dioscorides. New York: Hafner Publishing; 1959.
11. Mez-Mangold L. A history of drugs. Basle, Switzerland: F. Hoffmann-La Roche & Co., Ltd.; 1971.
12. Waite EA, editor. The hermetic and alchemical writings of aureolus philippus theophrastus bombast, of hohenheim, called paracelsus the great, in two volumes. New York: University Books, Inc.; 1967.
13. Kaya A. Tıbbi bitkiler ve etnobotanik çalışmalar. Merkezefendi Geleneksel Tıp Derneği. Bitkilerle tedavi sempozyumu. Zeytinburnu, İstanbul; 2010.
14. Çubukçu B, Sarıyar G, Meriçli AH, Sütülpınar N, Mat A, Meriçli F. Fitoterapi yardımcı ders kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fak. Yay. No. 4311; 2002.

15. Seçmen Ö. Türkiye florası. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi ders notları. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Basımları No:120;2008.
16. Yılmaz H, Küçüközcü G, Terzi E. Tıbbi ve aromatik bitkilerin yetiştirilmesi. Düzce: Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu;2010.
17. Batı Akdeniz Kalkınma Ajansı. Tıbbi ve aromatik bitkiler sektör raporu. Aralık 2012. <https://www.baka.org.tr/uploads/1357649536tibbi-ve-aromatik-bitkiler-sektor-raporu-5aralik.pdf>.
18. Harley RM, Brighton CA. Chromosome number in the genus *Mentha* L. Bot J Linn Soc 1977; 74:71–96.
19. Chambers H. *Mentha*: Genetic resources and the collection at Usda-Arsncgr-Corvallis. Lam Newsl 1992; 1:3–4.
20. Stamenkovic V. Our Non-Harming Medicinal Herbs, second revised and expanded edition. Leskovac: NIGP Trend; 2005.
21. Giray H. T. Bit. Kor. Derg. 1982; 6: 249 – 259.
22. Peyman M, Sina M, Milad M, Shahin A. Pharmacological and therapeutic effects of *Mentha longifolia* L. and its main constituent, menthol. Anc Sci Life 2013; 33(2):131–138.
23. Healthcare T. Pdr for Herbal Medicines, Fourth Edition. Montvale: Medical Economics Company, Inc. at; 2000.
24. Asha D, Lizzy M, Rishad. K.S. Evaluation of hptlc fingerprints of flavonoids and antioxidant activity of selected medicinal plants of Lamiaceae family, Intl J Pharmacognosy and Phytochemical Res 2015; 7(2):240-245.
25. Raja RR. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: An Overwiev. Res J Med Plant 2012; 6(3):203-213.
26. Sarac N, Uğur A. Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. EurAsia J Bio Sci 2007; 1:28-34.
27. Giuliani C, Maleci BL. Insight into the structure and chemistry of glandular trichomes of Labiatae, with emphasis on subfamily Lamioideae. Plant Syst Evol 2008; 276:199-208.
28. Özkan M. Glandular and eglandular hairs of *Salvia recognita* Fisch. and Mey. (Lamiaceae) in Turkey. Bangladesh J Bot 2008; 37:93-95.
29. Hendawy SF, El-Din EAA, Aziz EE, Ömer EA. Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* l. under organic fertilization conditions. Ozean J Appl Sci 2010; 3:203-216.

30. Naguib NYM. Organic vs. chemical fertilization of medicinal plants: A Concise Review of Researches. *Advances in Environmental Biology* 2011; 5:394-400.
31. World Health Organization (WHO), 2008. "Traditional medicine" Fact sheet number: 134. Retrieved from "<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>
32. Venkateshappa S.M, Sreenath K.P. Potential medicinal plants of Lamiaceae American Intl. J. Res. Formal Appl Natural Sci 2013; 13-239:82-87
33. Ersoy H. Flora Of Turkey'de bulunan Lamiaceae (ballıbabagiller) familyası nın revizyonu, Trakya Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi. Danışmanlar: Olgun G, Ekim T.; 2009.
34. Davis, PH., Mill, R.R., Tan, K., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vols. 7. Edinburg: Edinburg University Press; 1982.
35. Andro RA. Physiological and biochemical comparative research on taxa of the genus *Mentha* L., University of Iași, Faculty of Biology, Doktoral Thesis. Scientific advisor: Zamfirache MM.; 2012.
36. Bhat S, Maheshwari P, Kumar S, Kumar A. *Mentha* species: In vitro regeneration and genetic transformation. *Molecular Biology Today* 2002; 3(1):11-23.
37. European Pharmacopoeia 7.1 Edition 2011.p. 1213-1214.
38. Kapp K. Polyphenolic and essential oil composition of *Mentha* and their antimicrobial effect. University of Helsinki, Division of Pharmaceutical Biosciences Faculty of Pharmacy, Doktoral Thesis. Supervisors: Vuorela H, Vuorela P, Püssa T, Raal A.; 2015.
39. Turkish Plants Data Service (TÜBİVES) Version 2.0 Beta, <http://www.tubives.com/index.php>.
40. <http://dx.doi.org/10.2305/iucn.uk.2014-.rlts.t164306a42320630.en>.
41. Polat R, Çakılcioglu U, Ulasan DM, Paksoy YM. Survey of wild food plants for human consumption in Elazığ (Turkey). *Indian Journal of Traditional Knowledge* 2015; 1(1):69-75.
42. Polat R, Cakilcioglu U, Satıl F., Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingöl-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 148:951-963.
43. Özüdoğru B, Akaydın G, Erik S, Yeşilada E. Inferences from an ethnobotanical field expedition in the selected locations of Sivas and Yozgat provinces (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137:85-98.
44. Bulut G, Tuzlaci E. An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa- Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 149:633-647.

45. Çakılcıoğlu U, Khatun S, Türkoğlu İ, Hayta Ş. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137:469-486.
46. Hayta Ş, Polat R, Selvi S. Traditional uses of medicinal plants in Elazığ (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 154:613-623.
47. Tuzlacı E, Doğan A. Turkish folk medicinal plants Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharmaceutical journal* 2010; 12:136-143.
48. Özdemir E, Alpınar K. An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus mountains: Aladağlar (Niğde- Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 166:53-65.
49. Kaval İ, Behçet L, Çakılcıoğlu U. Ethnobotanical study on medicinal plants in Geçitli and its surrounding (Hakkari- Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 155:171 – 184.
50. Mükemre M, Behçet L, Çakılcıoğlu U. Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Çatak (Van- Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2015;166: 361 – 374.
51. Ünsal Ç, Vural H, Sarıyar G, Özbek B, Ötük G. Traditional Medicine In Bilecik Province (Turkey) And Antimicrobial Activities Of Selected Species. *Turk J Pharm Sci* 2010; 7 (2):139-150.
52. Kültür Ş. An ethnobotanical study of Kırklareli (Turkey). *Phytologia Balcanica* 2008; 14 (2): 279-289.
53. Kültür Ş. Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey) *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 111:341–364.
54. Polat R, Satıl F. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir- Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 139:626- 641.
55. Kızıllarslan Ç, Özhatay N. An ethnobotanical study of the useful and edible plants of İzmit. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2012; 16:194-200.
56. Güler B, Manav E, Uğurlu E. Medicinal plants used by traditional healers in Bozüyük (Bilecik–Turkey). *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 173:39–47.
57. Güzel Y, Güzelşemme M, Miski M. Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 174:118–152.

58. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha YM, Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. Sasidharan et al., Afr J Tradit Complement Altern Med 2011; 8(1):1-10.
59. Sarker SD, Latif Z, Gray AI. editors. Natural products isolation, methods in molecular biology. New Jersey: Humana Press Inc.;2006.
60. Flórez N, Conde E, Domínguez H. Microwave assisted water extraction of plant compounds. J Chem Technol Biotechnol 2015; 90:590–607.
61. Büyüktüncel SE. Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi Temmuz 2012; Cilt 32: Sayı 2:209-242.
62. Capelo JL, Mota AM. Ultrasonication for analytical chemistry. Current Analytical Chemistry 2005; 1(2):193-201.
63. Angela M, Meireles A. editors. Extracting bioactive compounds for food products. New York: CRC Press; 2009.
64. <https://documents.tips/documents/encyclopedia-of-separation-science-traction-ultrasound-extractions.html>.
65. Gavahian M, Farhoosh R, Farahnaky A, Javidnia K, Shahidi F. Comparison of extraction parameters and extracted essential oils from *Mentha piperita* L. using hydrodistillation and steamdistillation. Intern Food Research Journal 2015; 22(1):283-288.
66. Gill K, Gupta R, Bhise S, Bansal M, Gill G. Effect of hydro distillation process on extraction time and oil recovery at various moisture contents from *Mentha* leaves. Intl J Engineering Sci 2014;4(6):8-12.
67. Adham AN. Comparative extraction methods, phytochemical constituents, fluorescence analysis and HPLC validation of rosmarinic acid content in *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* and *Ocimum basilicu*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2015; 3(6):130-139.
68. Amabeoku GJ, Erasmus SJ, Ojewole JAO, Mukinda JT. Antipyretic and antinociceptive properties of *Mentha longifolia* Huds. (Lamiaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. Methods Find Exp Clin Pharmacol 2009; 31(10):645-649.
69. Hawrył MA, Niemiec M, Słomka K, Hajnos WM, Szymczak G. Micro-2d-tlc separation of phenolics in some species of mint and their fingerprints on diol bonded polar stationary phase. Acta Chromatographica 2016;28(1):119-127.
70. Eli Y, Yili A, Liu Y, Aisa HA. Chemical constituents of *Mentha longifolia* from Xinjiang. Chemistry of Natural Compounds 2012; 48 (4):683-684.

71. Najafian S, Rowshan V. Polyphenolic compounds of *Mentha longifolia* and Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) in Iran. *Intl Res J Appl Basic Sci* 2013; 4 (3): 608-612.
72. Okbi SYA, Mohamed DA, Fadel HHM. Phytochemical constituents, antioxidant and anticancer activity of *Mentha citrata* and *Mentha longifolia*. *Res J Pharm Bio and Chem Sci* 2015;6(1):739-751.
73. Güllüce M, Orhan F, Adigüzel A, Bal T, Guvenalp Z, Demirezer LÖ. Determination of antimutagenic properties of apigenin-7-O-rutinoside, a flavonoid isolated from *Mentha longifolia* (L.) Huds. ssp. *longifolia* with yeast DEL assay. *Toxicology and Industrial Health* 2012;29(6):534–540.
74. Spiridon L, Bodirlau R, Teaca CA. Total phenolic content and antioxidant activity of plants used in traditional Romanian herbal medicine. *Cent Eur J Biol* 2011; 6(3):388-396.
75. Khani A, Asghari J. Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Science* 2012; 12 (73):1-10.
76. Mokaberinejad R, Zafarghandi N, Bioos S, Dabaghian HF, Naseri M, Kamalinejad M et. al. *Mentha longifolia* syrup in secondary amenorrhea: a double-blind, placebo-controlled, randomized trials. *DARU J Pharma Sci* 2012; 20 (97):1-8.
77. Aksit H, Demirtaş I, Telci I, Tarimcilar G. Chemical diversity in essential oil composition of *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *typhoides* (Briq.) Harley var. *typhoides*. *Turkey J Essential Oil Res* 2013; 25(5):430-437.
78. Iqbal T, Hussain AI, Chatha SAS, Naqvi SAR, Bokhari TH. Antioxidant Activity and Volatile and Phenolic Profiles of Essential Oil and Different Extracts of Wild Mint (*Mentha longifolia*) from the Pakistani Flora. *J Analytical Methods in Chemistry* 2013; 536490:1-6.
79. Bertoli A, Leonardi M, Kryzyzanowska J, Oleszek W, Pistelli L. In vitro production of *Mentha piperita* not containing pulegone and menthofuran. *Acta Biochemica Polonica* 2011; 58(4):581-587.
80. Rasooli I, Rezaei MB. Bioactivity and chemical properties of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha longifolia* (L.) Huds *J Essential Oil Res* 2002; 14 (2):141-146.

81. Sharopov FS, Sulaimonova VA, Setzer WN. Essential oil composition of *Mentha longifolia* from wild populations growing in Tajikistan. Journal of Medicinally Active Plants 2012; (2):76-84
82. Yücel A, Çimen A. Nöropatik ağrı: Mekanizmalar, tanı ve tedavi. Ağrı 2005; 17:1.
83. Hışıl Y. Enstrümental gıda analizleri. İzmir: Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayın No:31; 2011.
84. Datt JD. Herbal drugs and fingerprints evidence based herbal drugs. New Delhi: Springer; 2012.
85. Özöğüt D. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü, Organik Kimya Lab. Notları.
86. Kamboj A. Analytical evaluation of herbal drugs. Chandigarh College of Pharmacy; Landran, Mohali India Available from: www.intechopen.com.
87. Vallisuta O, Olimat SM, editors. Drug discovery research in pharmacognosy. InTech; 2012.
88. Kulkarni KM, Patil LS, Khanvilkar VV, Kadam VJ. Fingerprinting techniques in herbal standardization. Indo American J Pharm Res 2014; 4(2):1049-1062.
89. Zavoi S, Fetea F, Ranga F, Pop RM, Baciuc A, Socaciu. Comparative fingerprint and extraction yield of medicinal herb phenolics with hepatoprotective potential, as determined by uv-vis and ft-mir spectroscopy. Not Bot Horti Agrobot 2011; 39(2):82-89.
90. Bansal A, Chhabra V, Rawal RK, Sharma S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. Journal of Pharmaceutical Analysis 2014; 4(4):223–233.
91. Patel R, Patel K, Significance of various chromatographic techniques in herbal drug analysis. J Chemical and Pharm Res 2016; 8(7):877-882.
92. Giridhar V. Quality control of herbal drugs through UV-Vis spectrophotometric analysis. Intl J Ayurvedic Medicine 2015; 6(1):102-109.
93. Mendes DSC. Chromatographic fingerprinting and quality control of herbal medicines: comparison of two officinal chinese pharmacopoeia species of *Dendrobii* based on high-performance liquid chromatography and chemometric analysis. Thesis for the degree of European Master in Quality in Analytical Laboratories. Supervisors: Grung B, Liang Y.

94. Ahmad M, Pukhtoon MPZ, Mukhtar A, Zafar M, Sultana S, Jahan S. Ethnopharmacological survey on medicinal plants used in herbal drinks among the traditional communities of Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 184:54-186.
95. Wyk BEV. The potential of South African plants in the development of new food and beverage products. *South African Journal of Botany* 2011;77: 857-868.
96. Manganelli REU, Tomei PE. Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. *Journal of Ethnopharmacology* 1999;65:181 – 202.
97. De Beer JJJ, Wyk BEV. An ethnobotanical survey of the Agter-Hantam, Northern Cape Province, South Africa. *South African Journal of Botany* 2011; 77:741-754.
98. Yaseen G, Ahmad M, Zafar M, Sultana S, Kayani S, Cetto AA et.al. Traditional management of diabetes in Pakistan: Ethnobotanical investigation from Traditional Health Practitioners. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 174:91– 117.
99. Wyk BEV, A review of Khoi-San and Cape Dutch medical ethnobotany. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 119:331–341.
100. Shinwari ZK, Gilani SS. Sustainable harvest of medicinal plants at Bulashbar Nullah, Astore (Northern Pakistan). *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 84:289 – 298.
101. Barros AS, Morais SM, Ferreira PAT, Vieira ÍGP, Craveiro AA, Fontenelle ROS et. al. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products* 2015; 76:557–564.
102. Bibi T, Ahmad M, Edwards ES, Tareen MN, Jabeen R, Abdullah I. Ethnomedicinal uses of plants in the treatment of paediatric geohelminth infections in Kalat district of Northern Balochistan, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 183:176 –186.
103. Aziz AM, Adnan M, Khan HA, Rehman AU, Jan R, Khan J. Ethno-medicinal survey of important plants practiced by indigenous community at Ladha subdivision. South Waziristan agency, Pakistan. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2016; 12(53):1-14.
104. Bhatia H, Sharma PY, Manhas RK, Kumar K. Ethnomedicinal plants used by the villagers of district Udhampur J&K India. *Journal of Ethnopharmacology* 2014;51: 1005–1018.

105. Ahmed MA, Eisa SS, Shamey I, Mohamed AA, Hussin S. A study on the Flora of El Qantara Sharq in Norht Sinai Egypt. *Annals of Agricultural Sceince* 2015; 60 (1):169-182.
106. Maksoud HSA, Azer SA. Taxonomical and comparative studies on some wild and cultivated species of genus *Mentha* in Egypt. *J Appl Sci Res* 2013; 9(10):6567-6573.
107. Şenkardeş İ, Tuzlacı E. Nevşehir'in güney ilçelerindeki bitkilerin yöresel adları. *Avrasya Terim Degisi* 2016; 4 (1):29-39.
108. Altundağ E, Öztürk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Social Behavioral Sci* 2011; 19:756-777.
109. Kose LS, Moteetee A, Vuuren VS. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Maseru district of Lesotho. *Journal of Ethnophnopharmacology* 2015;170: 184-200.
110. Moteetee A, Kose LS. Medicinal plants used in Lesotho for treatment of reproductive and post reproductive problems. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 194:827- 849.
111. Manganelli REU, Tomei PE. Ethnopharmacobotanical studies of the Tuscan Archipelago. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 65:181 – 202.
112. Eissa TAF, Palomino OM, Carretero ME, Serranillos MPG. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt. *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 151:317-332.
113. Moteetee A, Wyk BEV. The medical ethnobotany of Lesotho: a review. *Bothalia* 2011; 41 (1):209–228.
114. Moteetee A, Kose LS. Medicinal plants used in Lesotho for treatment of reproductive and post reproductive problems. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 194:827- 849.
115. Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM. Flavone glycosides from *Mentha longifolia*. *Fitoterapia* 1999; 70:478 –483.
116. Lall N, Kishore N. Are plants used for skin care in South Africa fully explored? *Journal of Ethnopharmacology* 2014; 153:61–84.
117. Philander AL. An ethnobotany of Western Cape Rasta bush medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 138:578 – 594.

118. Grabherr G. Biodiversity in the high ranges of the Alps: Ethnobotanical and climate change perspectives. *Global Environmental Change* 2009; 19:167–172.
119. Orhan F, Baris Ö, Yanmis D, Bal T, Güvenalp Z, Güllüce M. Isolation of some luteolin derivatives from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* and determination of their genotoxic potencies. *Food Chemistry* 2012; 135:764–769.
120. Barış Ö, Karadayı M, Yanmis D, Güvenalp Z, Bal T, Güllüce M. Isolation of 3 Flavonoids from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subsp. *longifolia* and Determination of Their Genotoxic Potentials by Using the *E. coli* WP2 Test System. *Journal of Food Science* 2011; 76(9):212-217.
121. Sekulić DT, Božin B, Smoliński A. Chemometric study of biological activities of 10 aromatic Lamiaceae species essential oils. *J Chemometrics* 2016; 30:188 – 196.
122. Dukic NM, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B, Matavulj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med* 2003; 69:413–419.
123. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J Sci Food Agric* 2010; 90:1827–36.
124. Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Şengül M, Adigüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol.* 2003; 85:231–235.
125. Kitic D, Jovanovic T, Ristic M, Palic R, Palic R, Stojanovic G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) P.W. Ball from Montenegro. *J Essent Oil Res* 2002; 14:150–152.
126. Sahin F, Karaman I, Güllüce M, ögütçü H, Şengül M, Adigüzel A, et al. Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *J Ethnopharmacol.* 2003;87:61–65.
127. Hajlaoui H, Ben FA, Snoussi M, Noumi E, Bakhrouff A. Effect of *Mentha longifolia* L. ssp *longifolia* essential oil on the morphology of four pathogenic bacteria visualized by atomic force microscopy. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4:1122–1127.
128. Hajlaoui H, Trabelsi N, Noumi E, Snoussi M, Fallah H, Ksouri R et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25:2227–2238.

129. Khattak S, Rehman SU, Khan T, Shah HU, Shad AA, Ahmad M. In vitro screening for biological pharmacological effects of indigenous medicinal plants, *Mentha longifolia* and *Aloe vera*. J Chem Soc Pak 2004; 26:248–251.
130. Gibriel YAY, Hamza AS, Gibriel AY, Mohsen SM. In vivo effect of mint (*Mentha viridis*) essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolated from stored corn. J Food Saf 2011; 31:445–451.
131. Al-Bayati FA. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009; 8(20):1-6.
132. El-Badry AA, Al-Ali KH, El-Badry YA. Activity of *Mentha longifolia* and *Ocimum basilicum* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia duodenalis*. Sci Parasitol 2010; 11:109–17.
133. Mann CM, Cox SD, Markham JL. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Lett Appl Microbiol 2000; 30:294–297.
134. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. Lett Appl Microbiol 1999; 29:130–135.
135. Al-Younis NK, Argushy ZM. Antibacterial evaluation of some medicinal plants from Kurdistan region. J Duhok Univ 2009; 12:256–261.
136. Akroum S, Bendjeddou D, Satta D, Lalaoui K. Antibacterial activity and acute toxicity effect of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. Am Eurasian J Sci Res 2009; 4:93–96.
137. Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. Bioorg Med Chem 2003 ;11:1995–2000.
138. Miyazawa M, Hisama M. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. Biosci Biotechnol Biochem 2003; 67:2091–2099.
139. Xiao M, Shao Y, Yan W, Zhang Z. Measurement and correlation of solubilities of apigenin and apigenin7-O-rhamnosylglucoside in seven solvents at different temperatures. J Chem Thermodyn 2011; 43:240–243.
140. Sarac N, Ugur A. Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. Eurasian J Bio Sci 2007; 4:28–37.

141. Yigit D, Yigit N, Özgen U. An investigation on the anticandidal activity of some traditional medicinal plants in Turkey. *Mycoses* 2009; 52:135–140.
142. Gursoy N, Tepe AS, Tepe B. Determination of in vitro antioxidative and antimicrobial properties and total phenolic contents of *Ziziphora clinopodioides*, *Cyclotrichium niveum*, and *Mentha longifolia* ssp. *typhoides* var. *typhoides*. *J Med Food* 2009; 12:684–689.
143. Jawdah YA, Sobh H, Salameh A. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3208–3213.
144. Snoussi M, Hajlaoui H, Noumi E, Usai D, Sechi LA, Zanetti S et al., In vitro anti-*Vibrio* spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:3071–3076.
145. Shahverdi AR, Rafii F, Tavassoli F, Bagheri M, Attar F, Ghahraman A. Piperitone from *Mentha longifolia* var. *chorodictya* Rech F. reduces the nitrofurantoin resistance of strains of enterobacteriaceae. *Phytother Res* 2004; 18:911–914.
146. Mkaddem M, Bouajila J, Ennajar M, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha* (*longifolia* L. and *viridis*) essential oils. *J Food Sci* 2009; 74:358–363.
147. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr J* 2011; 27:13–39.
148. Pajohi MR, Tajik H, Farshid AA, Basti AA, Hadian M. Effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and nisin alone and in combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a food model and bacterial ultrastructural changes. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8:283–290.
149. Kozan E, Küpeli E, Yesilada E. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their in vivo anthelmintic activity. *J Ethnopharmacol* 2006; 108:211–216.
150. López V, Martín S, Serranillos MPG, Carretero ME, Jäger AK, Calvo MI. Neuroprotective and neurochemical properties of mint extracts. *Phytother Res* 2010; 24:869–874.
151. Raya MDP, Utrilla MP, Navarro MC, Jiménez J. CNS activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in mice and rats. *Phytother Res* 2006; 4:232–234.

152. Dukić NM, Jakovljević V, Mira P, Gasić O, Zabo A. Pharmacological study of *Mentha longifolia* phenolic extracts. *Pharm Biol* 1996; 34:359–364.
153. Jan S, Khan MA, Uddin S, Murad W, Hussain M, Ghani A. Herbal recipes used for gastrointestinal disorders in Kaghan Valley, Nwfp, Pakistan. *Pak J Weed Sci Res* 2008; 14:169–200.
154. Khan SW, Khatoon S. Ethnobotanical studies on some useful herbs of Haramosh and Bugrote valleys in Gilbit, Northern areas of Pakistan. *Pak J Bot* 2008; 40:43–58.
155. Hussain K, Shahazad A, Hussain SZ. An ethnobotanical survey of important wild medicinal plants of Hattar District Haripur, Pakistan. *Ethnobotanical Leaf* 2008; 12:29–35.
156. Çakilcioglu U, Khatun S, Türkoğlu I, Hayta S. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Maden (Elazig-Turkey). *J Ethnopharmacol* 2011; 137:469–486.
157. Shah AJ, Bhulani NN, Khan SH, Ur Rehman N, Gilani AH. Calcium channel blocking activity of *Mentha longifolia* L. explains its medicinal use in diarrhoea and gut spasm. *Phytother Res* 2010; 24:1392–1397.
158. Naseri MKG, Naseri ZG, Mohammadian M, Birgani MO. Ileal relaxation induced by *Mentha longifolia* (L.) leaf extract in rat. *Pak J Biol Sci* 2008; 11:1594–1599.
159. Amin GJ, Maham M, Naghadeh BD, Kheiri F. Effects of *Mentha longifolia* essential oil on ruminal and abomasal longitudinal smooth muscle in sheep. *J Essent Oil Res* 2012; 24:61–69.
160. Sousa PJC, Magalhães PJC, Lima CC, Oliveira VS, Leal-Cardoso JH. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30:787–791.
161. Güllüce M, Sahin F, Sökmen M, Özer H, Daferera D, Sökmen A, et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chem* 2007; 103:1449–1456.
162. Ahmad N, Fazal H, Ahmad I, Abbasi BH. Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicol Ind Health* 2012; 28:83–89.
163. Berselli PVR, Zava S, Montorfano G, Corsetto PA, Krzyzanowska J, Oleszek W, et al. A mint purified extract protects human keratinocytes from short-term, chemically induced oxidative stress. *J Agric Food Chem* 2010; 58:11428–11434.

164. Said O, Saad B, Fulder S, Khalil K, Kassis E. Weight loss in animals and humans treated with “weighlevel”, a combination of four medicinal plants used in traditional Arabic and Islamic medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 874538:1-6
165. Sahib AS. Treatment of irritable bowel syndrome using a selected herbal combination of iraqi folk medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 148:1008–1012.
166. Mokaberinejad R, Akhtari E, Tansaz M, Bioos S, Kamalinejad M, Zafarghandi N et. al. Effect of *Mentha longifolia* on FSH Serum Level in Premature Ovarian Failure. *Open J Obstetrics and Gynecology* 2014; 4:356-360.
167. Odeyemi OO, Yakubu MT, Masika PJ, Afolayan AJ. Toxicological evaluation of the essential oil from *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* leaves in rats. *J Med Food* 2009; 12:669–674.
168. Okoh OO, Afolayan AJ. The effects of hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods on the chemical composition and toxicity of essential oils from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis*. *Afr J Pharm Pharmacol* 2011; 5:2474–2478.
169. Gündüz A. Acilde ağrı yöntemi. K.T.Ü Tıp Fakültesi Acil Tıp ABD: <http://docplayer.biz.tr/28749932-Acilde-agri-yonetimi-doc-dr-abdulkadir-gunduz-k-t-u-tip-fakultesi-acil-tip-anabilim-dali.html>.
170. Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 3(2):37 – 48.
171. http://ekutuphane.teb.org.tr/pdf/raporlar/agri_v_akilci_analje/6.pdf
172. Akkaya A. Ağrı tanımı ve sınıflaması. Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD 2013; <https://www.slideshare.net/akkayaa2/ar-ve-snflamas>.
173. Akçaboy EY. Ağrı tanımı, patofizyolojisi, sınıflaması. Ankara Numune E.A Hastanesi Algoloji birimi Ankara 2016; <http://kanser.gov.tr/dosya/erkanyavuzakcaboy.pdf>.
174. Dizdar Y. Ağrının fizyolojisi ve iletileri. İstanbul Üniversitesi İst. Tıp Fak. Farmakoloji ABD; <http://ekutuphane.teb.org.tr/pdf/eczaciodasiyayinlari/aneljezikle/3.pdf>
175. Babacan A. Ağrı, ağrı yolları ve ağrılı hastaya yaklaşım. Gazi Üniversitesi Tıp Fak.; <http://med.gazi.edu.tr/posts/download?id=20754>.

176. Dobrucalı UH. Ağrı tanım, sınıflama ve patofizyoloji. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği; <http://slideplayer.biz.tr/slide/2819069/>.
177. Giri L, Andola HC, Purohit VK, Rawat MSM., Rawal RS., Bhatt ID.. Chromatographic and spectral fingerprinting standardization of traditional medicines: an overview as modern tools. Research Journal of Phytochemistry 2010; 4(4):234-241.
178. Vij VV, Sharma V, Kumar P, Deshmukh R. Herbs as positive modulator in neuropathic pain and their antinociceptive effect. Review Article, Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy 2014; 2 (3):378-387.
179. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels J. Agric. Food Chem. 2003; 51:609-614.
180. Khatiwora E, Adsul VB, Kulkarni MM, Deshpande NR, Kashalkar RV. Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomoea carnea*. Intl J ChemTech Res 2010; 2(3):1698-1701.
181. Karabay-Yavasoglu NU, Karamenderes C, Baykan S, Apaydin S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities and acute toxicity of *Achillea nobilis* subsp. *neilreichii* extract in mice and rats. Pharmaceutical Biology 2007; 45(2):162–168.
182. Stanisavljević DM, Stojičević SS, Đorđević SM, Zlatković BP, Veličković DT, Karabegović IT et al. Antioxidant activity, the content of total phenols and flavonoids in the ethanol extracts of *Mentha longifolia* (L.) Hudson dried by the use of different techniques. Chem Ind & Chem Engineering Quarterly 2012;18(3):411–420.
183. Patonay K, Korózs M, Murányi Z, Kónya EP. Polyphenols in northern Hungarian *Mentha longifolia* (L.) L. treated with ultrasonic extraction for potential oenological uses. Turk J Agric For 2017; 41:208-217.
184. Abootalebian M, Keramat J, Kadivar M, Ahmadi F, Abdinian M. Comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *Mentha longifolia* accessions. Annals of Agricultural Science 2016; 61:175–179.
185. Brahmi F, Khodir M, Mohamed c, Pierre D. Chemical composition and biological activities of *Mentha* species. Intech 2017; 3:47-79.
186. Nickavar B, Alinaghi A, Kamalinejad M. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. Iranian J Pharm Res 2008; 7(3):203-209.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Diyarbakır'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Diyarbakır'da tamamladım. Lisans eğitimimi Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. Lisans eğitimim boyunca Biyoteknoloji Klübü'nde bilimsel çalışmalarda bulundum. Bu konudaki çalışmalarına daha sonra iş hayatında da devam ettim. Bitki biyoteknolojisi, bitkisel ilaç ve gıda takviyeleri alanında Ar-Ge çalışmalarında yer aldım. Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda başladığım yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim. Son olarak Sağlık Meslek Lisesi'nde sağlık derslerini vermekteyim.

e-posta:fgecimli@gmail.com

