

YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ  
ECZACILIK FAKÜLTESİ  
FARMAKOGNOZİ VE FİTOTERAPİ ANABİLİM DALI

*MELISSA OFFICINALIS* L. SUBSP. *OFFICINALIS* BİTKİSİ  
ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR

FİTOTERAPİ PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. ÖZNUR GÜVEN İŞMAN

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. HASAN KIRMIZİBEKMEZ

İSTANBUL

2010

## ÖZET

*Melissa officinalis* L. (oğul otu) yatıştırıcı, gaz giderici, midevi ve terletici olarak yıllardır halk arasında kullanılmakta olup, bu kullanımları deneysel olarak da kanıtlanmıştır. Bitkinin taze veya kurutulmuş yapraklarından hazırlanan ekstraları içeren fitoterapötikler sinirsel gerginliğe bağı uykusuzluğun tedavisinde ve sedatif olarak kullanılmaktadır. Yapraklarındaki başlıca sekonder metabolitlerden biri olan rozmarinik asit (hidroksisinnamik asit türevi), *M. officinalis* için belirleyici bir bileşiktir. Avrupa Farmakopesi monografında verilen yöntemde de droğun içermiş olduğı toplam hidroksisinnamik asit yüzdesi rozmarinik asit üzerinden hesaplanmaktadır.

Bu çalışmada, *M. officinalis* bitkisinin botanik özellikleri, yapraklarının kimyasal içeriğı, biyolojik aktivite çalışmaları ve kullanılışı ile ilgili bilgiler ayrıntılı olarak incelenmiştir. Doğadan toplanan ve kültüre alınmış örneklerin Avrupa Farmakopesi 6.0'da belirtilen tüm analizlere uygunluğu araştırılmıştır. Bu amaçla her iki örnek üzerinde makroskobik ve mikroskobik incelemeler, yabancı madde ve bütün kül tayini, İTK ve UV spektroskopisi deneyleri yapılmış ve her iki örneğin de Avrupa Farmakopesinde belirtilen kriterlere uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Spektrofotometrik yöntem ile rozmarinik asit üzerinden toplam yüzde hidroksisinnamik asit değerleri, doğadan toplanan örnekte % 10.12 ve kültüre alınmış örnekte ise % 8.45 olarak bulunmuştur. Farmakopede belirtilen spektral yöntemle ilave olarak her iki örnek için Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) yöntemi kullanılarak rozmarinik asit teşhisi ve miktar tayini de yapılmıştır. YPİTK analizi sonucunda doğadan toplanan ve kültüre alınmış örneklerde rozmarinik asit yüzdeleri sırasıyla % 3.4 ve % 7.2 olarak tayin edilmiştir. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz kalitatif ve kantitatif analiz sonuçları, 'İyi Tarım Uygulamaları' kapsamında kültüre alınmış örneğin istenen özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, aktarlarda 'melisa' adı altında sıkça satılan bir drog olan *Verbena officinalis* (Verbenaceae) ile *M. officinalis*'in morfolojik, mikroskobik ve kromatografik olarak karşılaştırması yapılmış olup farkları tartışılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Melissa officinalis*, Lamiaceae, Avrupa Farmakopesi analizi, Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK), Rozmarinik asit

## SUMMARY

*Melissa officinalis* (lemon balm) has long been used as sedative, carminative, sudorific and stomachic in folk medicine and these effects have been proved experimentally. The phytotherapeutics, containing the extracts prepared from fresh or dried leaves are utilized as sedative and in the treatment of insomnia due to nervousness. Rosmarinic acid (hydroxycinnamic acid derivative), which is one of the main secondary metabolites in the leaves, is used as a marker compound for *M. officinalis*. In the monograph of European Pharmacopoeia, the percentage of total hydroxycinnamic acid derivatives of the drug is calculated over rosmarinic acid.

In this study, botanical characteristics, chemical constituents, biological activities and uses of *M. officinalis* were given in detail. The compliance of both the cultured sample and the sample that were collected from the nature with the European Pharmacopoeia 6.0 was determined. For this purpose, macroscopic and microscopic examinations, foreign matter and total ash determination, TLC and UV spectroscopy experiments were performed and it was concluded that both samples comply with the monograph of the European Pharmacopoeia. Total hydroxycinnamic acid percentages were calculated as 10.12 % in the sample which was collected from the nature and 8.45 % in cultured sample in the spectrophotometric assay. Moreover, the determination and quantitation of rosmarinic acid was performed by using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) in both samples. According to the HPTLC analysis results, rosmarinic acid percentages were found to be 3.4 % and 7.2 % in samples collected from the nature and in samples that were cultured respectively. Qualitative and quantitative analysis results of the study indicate that the desired features were found in cultured sample in terms of “Good Agricultural Practices”. Besides this, morphologic, microscopic and chromatographic comparison of *M. officinalis* with a drug, *Verbena officinalis* (Verbenaceae) often sold as ‘melisa’ in herbalists, was performed and the results were discussed.

**Keywords:** *Melissa officinalis*, Lamiaceae, European Pharmacopoeia analysis, HPTLC, Rosmarinic acid.

## TEŞEKKÜRLER

Tez konumu belirleyen ve tez çalışmalarım süresince bana her konuda destek olan, yardımlarını ve bilgilerini esirgmeden benimle paylaşan, zevk alarak çalıştığım değerli Hocam Doç. Dr. Hasan Kırmızıbekmez'e gösterdiği sabır ve emek için çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında kıymetli zamanını ve bilgilerini benimle paylaşan, beni her konuda aydınlatan ve eğiten, onunla çalışabilme imkanı bulduğum için kendimi şanslı hissettiğim Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı kıymetli Hocam Prof. Dr. Erdem Yeşilada'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beni akademisyen olmam konusunda yüreklendiren, hiçbir destek ve imkânı benden esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Dilek Demir Erol'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmamda kullandığım kültür materyalini bana temin eden, tıbbi ve aromatik bitkilerin kültürü ile ilgili bir çok bilgiyi öğreten değerli Hocam Doç. Dr. Yüksel Kan'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında bana her şekilde yardımcı olup destek veren çalışma arkadaşlarıma ve teknisyenimize teşekkür ederim.

Destekleri için kardeşim Aliye Çerağ İşman'a ve kuzenim Yrd. Doç. Dr. Eren İşman'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, bana destek olan sevgili eşim Dr. Onuralp İşman'a ve her türlü başarımın arkasındaki iki insana, annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay	I
Özet	II
Summary	III
Teşekkürler	V
İçindekiler	V I
Kısaltmalar	V III
Tablolar	X
Şekiller	X I
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. BOTANİK BİLGİLER	4
2.1.1. Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri	4
2.1.2. Melissa Cinsinin Genel Özellikleri	5
2.1.3. <i>Melissa officinalis</i> L.	5
2.1.4. <i>Melissa officinalis</i> L. Alttürlerine Ait Tayin Anahtarı	5

<b>2.1.5.</b>	<i>Melissa officinalis</i> L. Türünün Yayılışı ve Habitatı	<b>6</b>
<b>2.1.6.</b>	<i>Melissa officinalis</i> L. Bitkisinin Kültürü	<b>6</b>
<b>2.2.</b>	<b>FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR</b>	<b>8</b>
<b>2.2.1.</b>	Uçucu Yağ	<b>8</b>
<b>2.2.2.</b>	Flavonoitler	<b>11</b>
<b>2.2.3.</b>	Fenolik Asitler	<b>13</b>
<b>2.2.4.</b>	Terpenler	<b>15</b>
<b>2.3.</b>	<b>BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI</b>	<b>18</b>
<b>2.3.1.</b>	Anti-ülserojenik Aktivite	<b>18</b>
<b>2.3.2.</b>	Antispazmodik Aktivite	<b>18</b>
<b>2.3.3.</b>	Antimikrobiyal Aktivite	<b>19</b>
<b>2.3.3.1.</b>	Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite	<b>19</b>
<b>2.3.3.2.</b>	Antiviral Aktivite	<b>20</b>
<b>2.3.4.</b>	Antienflamatuvar Aktivite	<b>22</b>
<b>2.3.5.</b>	Antikolinergik Aktivite	<b>22</b>
<b>2.3.6.</b>	Asetilkolinesteraz İnhibisyonu	<b>23</b>
<b>2.3.7.</b>	Demans Üzerindeki Etki	<b>23</b>
<b>2.3.8.</b>	Antioksidan Aktivite	<b>24</b>
<b>2.3.9.</b>	Sedatif Aktivite	<b>25</b>
<b>2.3.10.</b>	Anti-tiroit Aktivite	<b>26</b>
<b>2.3.11.</b>	Diğer Etkiler	<b>27</b>

<b>2.4. KULLANILIŞ</b>	<b>28</b>
2.4.1. Yaprakların Uygulama Şekli	28
2.4.2. Dozaj	28
2.4.3. Halk İlacı Olarak Kullanılış	29
<b>2.5. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi</b>	<b>32</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	<b>34</b>
<b>3.1. MATERYAL</b>	<b>34</b>
3.1.1. Makroskobik İnceleme	34
3.1.2. Mikroskobik İnceleme	35
3.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi	35
3.1.4. Kurutmada Kayıp	35
3.1.5. Bütün Kül Tayini	35
3.1.6. Spektrofotometrik Analiz	35
3.1.7. YPİTK	36
<b>3.2. YÖNTEM</b>	<b>37</b>
3.2.1. Avrupa Farmakopesi 6.0 Monografi	37
3.2.1.1. Makroskobik İnceleme	40
3.2.1.2. Mikroskobik İnceleme	40
3.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi	40
3.2.1.4. Kurutmada Kayıp	41
3.2.1.5. Bütün Kül Tayini	41

3.2.1.6.	Spektrofotometrik Analiz	42
3.2.2.	YPİTK	42
4.	BULGULAR	45
4.1.	FARMAKOPE ANALİZLERİ	45
4.1.1.	Makroskobik İnceleme	45
4.1.2.	Mikroskobik İnceleme	46
4.1.3.	İnce Tabaka Kromatografisi	47
4.1.4.	Deneyler	48
4.2.	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi	49
4.3.	<i>Verbena officinalis</i> 'e (aktar örneği) Ait Bulgular	54
4.3.1.	Makroskobik İncelemeler	54
4.3.2.	Mikroskobik İncelemeler	54
4.3.3.	İnce Tabaka Kromatografisi	55
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA	57
6.	KAYNAKLAR	61
7.	ÖZGEÇMİŞ	



## **KISALTMALAR**

ALP: Alkalen Fosfataz

ALT: Alanin Transaminaz

AST: Aspartat Transaminaz

BHA: Bütillenmiş Hidroksi Anisol

BHT: Bütillenmiş Hidroksi Toluen

D: Doğal *Melissa officinalis* örneği

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

DQF-COSY: Double-Quantum Filtered Correlated Spectroscopy

ESCAP: The European Scientific Cooperative On Phytotherapy

ED<sub>50</sub>: Effective Dose in 50 %

GK-KS: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi

Ha: Hektar

HEp-2: Human Epithelial Carcinoma Cell

HIV: Human Immunodeficiency Virüs

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HRESIMS: High Resolution Electron Spray Ionization Mass Spectrometry

HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence

HSV: Herpes Simpleks Virüsü

IC<sub>50</sub>: Inhibitory Concentration in 50%

İTK: İnce Tabaka Kromatografisi

K: Kültüre alınmış *Melissa officinalis* rneęi

KCl: Potasyum Klorr

K<sub>2</sub>O: Potasyum Oksit

LC-DAD-ESI-MS: Liquid Chromatography- Diode Array Detection-ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry

LPO: Lipit Peroksidasyonu

MFC: Minimum Fungicidal Concentration

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

NMR: Nükleer Manyetik Rezonans

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Fosfor Pentoksit

TSH: Tiroid Stimule Edici Hormon

UV: Ultra Viyole

YPİTK: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi

YPSK: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 1.</b> <i>Melissa officinalis</i> bitkisinden elde edilen flavon ve flavonoller	1 2
<b>Tablo 2.</b> <i>Melissa officinalis</i> bitkisinden elde edilen flavanonlar	1 3
<b>Tablo 3.</b> <i>Melissa officinalis</i> bitkisinden elde edilen ursan türevi bileşikler	1 6
<b>Tablo 4.</b> <i>Melissa officinalis</i> bitkisinden elde edilen oleanan türevi bileşikler	1 7
<b>Tablo 5.</b> <i>Melissa officinalis</i> bitkisinin halk arasındaki kullanımı	3 0
<b>Tablo 6.</b> Uçucu yağların İTK kromatogramının şematik olarak gösterilmesi	4 7
<b>Tablo 7.</b> Farmakope Analizine ait deney sonuçları	4 8
<b>Tablo 8.</b> Düzeltme çalışmalarına ait bulgular	4 9
<b>Tablo 9.</b> Doğal ve kültür formlarına ait Farmakope analiz sonuçları	5 8
<b>Tablo 10.</b> <i>Verbena officinalis</i> ile <i>M. officinalis</i> morfolojik, mikroskopik ve kromatografik farkları	6 0

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Melissa officinalis</i> L.	3
Şekil 2. Binoküler lup altında görünüm (D)	4
	5
Şekil 3. Binoküler lup altında görünüm (K)	4
	5
Şekil 4. Lamiaceae tipi salgı tüyü (D) ve (K)	4
	6
Şekil 5. Çok hücreli örtü tüyü (D) ve (K)	4
	6
Şekil 6. Epidermada stoma ve komşu hücreleri (D) ve (K)	4
	6
Şekil 7. Boydan görünüşte diş tüyler (D) ve (K)	4
	7
Şekil 8. Görünür ışıkta uçucu yağların ve standartların İTK kromatogramı	4
	8
Şekil 9. Referans rozmarinik asit ve örneklerdeki rozmarinik asitlerin UV spektrumlarının karşılaştırılması (CAMAG Scanner)	5
	0
Şekil 10. Rozmarinik asitin kalibrasyon eğrisi	5
	1
Şekil 11. K örneğine ait iki boyutlu YPİTK kromatogramı	5

	2
<b>Şekil 12.</b> Referans ve örneklere ait üç boyutlu YPİTK kromatogramı	5
	3
<b>Şekil 13.</b> <i>Verbena officinalis</i> 'e ait makroskobik inceleme	5
	4
<b>Şekil 14.</b> <i>Verbena officinalis</i> 'e ait mikroskobik inceleme- Anomastik stoma	5
	4
<b>Şekil 15.</b> <i>Verbena officinalis</i> 'e ait mikroskobik inceleme- Salgı tüyü	5
	4
<b>Şekil 16.</b> <i>Verbena officinalis</i> 'e ait mikroskobik inceleme- Tek hücreli örtü tüyü	5
	4
<b>Şekil 17.</b> <i>M. officinalis</i> ile aktar örneğinin CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ekstralarının karşılaştırılması	5
	5
<b>Şekil 18.</b> <i>M. officinalis</i> örnekleri ile aktar örneğinin MeOH ekstralarının karşılaştırılması	5
	6

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) çok yıllık otsu ve aromatik bir bitki olup, anavatanı Anadolu'nun dış bölgeleri, Asya'nın batısı ve Türkiye'nin Akdeniz bölgesidir (1). 'Melisa' adı, Yunanca'da 'Bal arısı' anlamındadır. Arıları cezbedici özelliğinden dolayı Türkçe'de 'oğul otu' adıyla bilinmektedir. Anadolu'da bal arılarına oğul verdirmek için, yeni kovan üzerine, taze oğul otu dalları çırpılmaktadır (2). Bitkinin yaprakları Anadolu halk tıbbında terletici, gaz giderici, midevi, yatıştırıcı ve antiseptik olarak kullanılmaktadır (3, 4).

Çok eski zamanlardan beri gıdalara ve içeceklere aroma vermek amacıyla *M. officinalis*'in yapraklarından faydalanılmıştır. Tıbbi amaçla ise soğuk algınlığı, baş ağrısı, mide-bağırsak sistemi bozuklukları, sinirsel gerginlik ve romatizma tedavisinde kullanılmaktadır. *M. officinalis*'in metanol ekstresi, yapısındaki fenolik asitlere bağlı olarak antioksidan özellikler göstermektedir. Yapraklarından elde edilen uçucu yağ, anti-bakteriyel ve anti-fungal özellikleri ile tanınmasının yanında hafif depresyon ve spazm rahatsızlıklarının tedavisinde de etkili bulunmuştur (5, 6). Depresyonları, kaygı durumlarını, stresi ve uykusuzluğu gidermek için uçucu yağdan aromaterapide de faydalanılmaktadır (7). The European Scientific Cooperative On Phytotherapy (ESCOP) monografında "Melissae folium" adı altında yaprakların dahilen gerginlik, huzursuzluk ve sindirim sistemi rahatsızlıklarında (hafif spazm), haricen ise uçuk tedavisinde etkili olduğu kayıtlıdır (8). *M. officinalis* yaprak ekstreleri ve yapraklardan elde edilen uçucu yağ üzerinde yapılmış olan biyolojik aktivite çalışmalarında antispazmodik (8), antiviral (8-10) antibakteriyel ve antifungal (5), antioksidan (5, 11) ve sedatif (12, 13) etkiler saptanmıştır.

*M. officinalis* üzerinde yapılmış olan fitokimyasal çalışmalar, bitkinin hidroksisinnamik asit türevi, flavonoid, uçucu yağ, tanen ve terpenik yapıda sekonder metabolitler içerdiğini ortaya koymuştur (14-16).

*M. officinalis* yapraklarında bulunan hidroksisinnamik asit türevi olan rozmarinik asit, bu bitki için belirleyici bir bileşik olarak kabul edilmekte olup antiviral, antibakteriyel, antioksidan ve antiinflamatuvar gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (17).

Bu alışmada *M. officinalis* zerinde yapılan fitokimyasal araştırmaların ve biyolojik aktivite çalışmalarının derlenmesi, *M. officinalis*'in doğal ve kültür formlarının Avrupa Farmakopesi 6.0 monografina uygunluğunun araştırılması, her iki form için Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ile rozmarinik asit teşhisi ve miktar tayini yapılması, doğal ve kültür formların farklılığının ortaya koyulması amaçlanmıştır. Ayrıca *M. officinalis* yerine sıklıa kullanılan *Verbena officinalis* (Verbenaceae) ile *M. officinalis*'in temel morfolojik, mikroskopik ve kromatografik farklarına da değinilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümdeki bilgiler üç ana başlık altında verilmiştir.

- Botanik Bilgiler
- Fitokimyasal Çalışmalar
- Biyolojik Aktivite Çalışmaları ve Kullanılış



Şekil 1. *Melissa officinalis* L.



## 2.1. BOTANİK BİLGİLER

Tür: *Melissa officinalis* L.

Familya: Lamiaceae

Takım: Lamiales

İngilizce isimleri: Lemon balm, balm, sweet balm (18)

Bu bölümde Lamiaceae familyasının, *Melissa* cinsinin ve *M. officinalis*'in genel botanik özellikleri, Türkiye'de yetişen *M. officinalis* alttürlerine ait tayin anahtarı, yayılışı ve tarımı ile ilgili bilgiler sunulmaktadır.

### 2.1.1. Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri

Bir veya çok yıllık otsu bitkiler ya da çalılar. Genellikle guddeli ve aromatik. Gövdeler 4 köşeli veya değil. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pinnat, her zaman karşılıklı ve dekusat dizilişte.

Çiçek durumu basit olarak braktelerin veya üst yaprakların koltuklarından çıkan simozlar ve genellikle vertisillatlar oluşturacak şekilde; spika, kapitulum, rasemoz ve simoz durumunda. Çiçekler ginodioik bitkilerde hermafrodit veya erkek çiçek körelmiş, zigomorf, genellikle bilabiat. Brakteler yapraklardan tamamen farklı veya benzer; brakteoller var veya yok. Kaliks kalıcı, gamosepal, genellikle üstte 3, altta 2 dişli bölüm olmak üzere 5 loblu, nadiren loblar veya dişler 1 ve 1 veya 1 ve 4, veya kaliks aktinomorf; 5-20 damarlı. Korolla gamopetal, zigomorfik ve bilabiat, genellikle belirsiz 2 loblu üst dudak ( kukuleta veya miğfer), falkat, dik veya konkav, ve 3 loblu alt dudak (labellum); nadiren üst dudak küçülmüş ve alt dudak 5 loblu, veya 1 üst ve 4 alt loblu, veya korolla aktinomorf. Stamenler korollaya birleşik, genellikle 4 ve didinam, veya 2 verimsiz stamen; üst çift genellikle alt çiftten kısa; anter tekaları 2 veya 1 hücreli, paralel veya birbirinden ayrı. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli ve 4 ovüllü, 4 loblu. Stilus genellikle korolladan daha uzun, ginobazik, nadiren değil, üstte kısaca bifit. Meyve, olgunlukta 4 nuksa ayrılan bir şizokarp. Her nuksa bir tohumlu. Müsilajlı yapı ıslatıldığı zaman şişer (1).

### 2.1.2. *Melissa L. cinsinin Genel Özellikleri*

*Melissa* cinsi, çok yıllık bitkilerden oluşur. Vertisillatlar tek taraflı, çiçekli yaprakların koltuk kısımlarında birkaç veya birçok çiçeklenme, kaliks tüpsü-kampanulat, 13 damarlı, 2 dudaklı; üst dudak basık, 3 dişli (orta diş Türkiye türlerinde genellikle yok), alt dudak yarık; boğaz kısmında  $\pm$  tüyler eksik. Korolla 2 dudaklı, tüp kavisli, orta kısmın üstünden itibaren genişlemiş; üst dudak dik veya hafif kukuletalı, emerginat, alt 3 loblu. Stamenler 4 ve korolla içinde, yaysı ve birbirine yönelmiş; anter tekaları ayrı. Stilus boyları hemen hemen eşit, nukslar pürüzsüz (1).

### 2.1.3. *Melissa officinalis L.*

Çok yıllık. Gövde 28-95 cm veya daha fazla, dik, dallanmış, sıkışık veya seyrek salgı-tüylü, uzun villoz tüylü veya tüysüz veya az çok çıplak. Yapraklar ovat veya eliptik, 18-95 x 13-75 mm, yatık villoz veya seyrek kısa yumuşak tüylü veya tüysüz, akut veya obtus, kuneat veya kordat, krenat (tabanı hariç). Çiçek yaprakları benzer şekilde, altta kuneat veya kordat, kenarda krenat veya serrat. Vertisillatlar 4-12 çiçekli. Brakteoller yaprağa benzer şekilde, dar veya ovat, 3-10 x 1.2-7 mm. Kaliks 6-10 mm, kısa salgı tüylü veya uzun örtü tüylü; üst dudak 2-3 dişli, orta diş sıklıkla eksik veya tamamen yok olmuştur; alt dudak dişleri dar olarak üçgensel lanseolat. Korolla beyazlaşan soluk sarı, bazen de soluk leylak rengi, (8-)9-14(-16) mm (1).

### 2.1.4. *Melissa officinalis* Alttürlerine Ait Tayin Anahtarı (1)

1. Gövde yoğun olarak kısa yumuşak salgı tüylü, uzun tüyler eksik; yapraklar tabanda kuneat; kaliksin üst dudağın orta dişi farklı, enli üçgensel.....subsp. *officinalis*

1. Gövde en az derecede biraz uzun yayık tüylü, villoz veya az çok tüysüz; yapraklar tabanda trunkattan subkordata kadar; kaliksin üst dudağın orta dişi farklı ya da körelmiş

2. Gövde ve yapraklar yoğun olarak villoz veya tomentoz, çok sayıda uzun yayık tüylü ve genellikle birkaç salgı tüylü; kaliksin üst dudağının orta dişi körelmiş veya yok olmuş.....subsp. *altissima*

2. Gövde ve yapraklar seyrek olarak piloz veya az çok tüysüz, salgı bezi birkaç tane veya çok sayıda; kaliksin orta dişi veya üst dudağı oldukça farklı, üçgensel.....subsp. *inodora*

### **2.1.7. *Melissa officinalis*'in Yayılışı ve Habitatı:**

*Melisa officinalis* Türkiye'de Akdeniz bölgesinde doğal olarak yetişmektedir. Dünyada ise Güney Avrupa, Kuzey Afrika, doğuda Kafkasya'ya kadar ve İran'ın kuzeyinde doğal olarak yetişmektedir. Doğal alt türleri tüm Akdeniz ülkelerinde ve Alpler'in güneyinde bulunmaktadır. Genellikle Avrupa'nın merkezinde kültürü yapılmaktadır. Üç alt türü de (*officinalis*, *altissima*, *inodora*) ülkemizde doğal olarak yetişmektedir (1, 19).

*M. officinalis* bitkisi orman alanları, makilerin yetiştiği bölgeler, kayalık yamaçlar ve yarıklar, akarsu kenarları, boş ve ıssız araziler, yol kenarlarında 1800 m yüksekliğe kadar yetişmektedir (1).

### **2.1.8. *Melissa officinalis* Bitkisinin Kültürü:**

Son yıllarda bitkisel kökenli ilaçların tedavi amacıyla ilgi görmesi, kokulu bitkilerin parfümeri, gıda ve kozmetik sanayinin esas hammaddesini oluşturması, tıbbi ve aromatik bitkilere olan talebi arttırmıştır. Bu talebin artışı doğadan toplanan bitkilerin aşırı tahribine neden olmuştur. Doğal ortamı tahrip etmeden devamlı, kaliteli ve standartlara uygun ürün üretmek için tıbbi ve aromatik bitkilerin kültürü yapılmaya başlanmıştır. Tıbbi bitkiler kültüre alınarak yabancı madde taşımayan ve etken madde verimi yüksek bitkiler elde edilmektedir. Hasat ve hasat sonrası işlemler daha kolay ve ekonomik yapılmaktadır. Ülke ekonomisine ve endüstriyel sektörlerin gelişmesine katkı sağlanmaktadır (20).

Ülkemizde tarımı yeterli seviyede yapılamayan *M. officinalis*, az da olsa genellikle bahçelerde yetiştirilmektedir. Diğer taraftan birçok Avrupa ülkesinde tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımı için geniş alanlarda kültür yapılmaktadır. Türkiye'de *M. officinalis*, hem iç hem de dış pazarlara doğal ortamından toplanarak satılmaktadır. Fakat doğal ortamından toplanarak ihraç edilen türlerde ürün standardizasyonu sağlanamadığından bu ürünlere yurt dışı talepleri düşmektedir. Aynı zamanda çok geniş

kullanım aralığına sahip olan *M. officinalis* için doğal ortamından toplanan miktarlar yetersiz kalmaktadır (20).

*M. officinalis*'in yetiştirildiği bölgenin jeolojik ve coğrafi özellikleri, sıcaklığı, gün uzunluğu, ışık yoğunluğu, su miktarı, toprağın besin içeriği, gübre çeşidi ve miktarı bitkinin uçucu yağ verimini ve bileşimini önemli derecede etkilemektedir (20).

Çekirdek ve aşı dallarından yayılma gösteren bitkinin genellikle 40000/Ha.da ekimi yapılır. Bitkinin 10 yıllık ömrü vardır. Fakat toprağı yenilemek için yapılan hasat döngüsü ile her beş yılda bir yenisiyle değiştirilir. Kuzey yarım kürede bitkinin yayılımı Nisan'dan Temmuz'a kadar devam etmektedir. İlk yıl hasat, Ağustos'ta yapıldıktan sonra iki hasat denenir. İlki Haziran'da ikincisi Ağustos'ta yapılır. Yağmurlu havalarda yapraklar siyaha döneceği için hasat sıcak ve güneşli havada ve genellikle elle yapılır. Güzel görünüm için yapraklar güneş altında bırakılmamalıdır (21).

*M. officinalis* türünün kültürünün yapılacağı deneysel alandaki toprağın balçık ve kilden oluşan verimli toprak olması ve organik maddeler yönünden fakir olması (% 1) gerekmektedir. Toprağın doygunluğu, pH değeri, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ve K<sub>2</sub>O içerikleri sırasıyla % 69, 7.6, 70 kg/ha ve 815 kg/ha olmalıdır (22).

## 2.2. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

*M. officinalis* üzerinde yapılmış olan kimyasal çalışmalar sonucunda bitkiden elde edilip yapısı tayin edilen bileşik grupları uçucu yağ, flavonoidler, fenilpropanoit türevleri ve triterpenler olarak belirlenmiştir. Aşağıda bu bileşikler ayrıntılı olarak verilmiştir.

### 2.2.1. Uçucu yağ

*M. officinalis*'in yapraklarından elde edilen uçucu yağın monoterpenler ve seskiterpenler yönünden zengin olduğu görülmektedir. Uçucu yağın temel bileşikleri sitral (geranial, neral) ve sitronellal olup yağa karakteristik limon kokusu vermektedir. Uçucu yağda bulunan terpenik bileşiklerin sınıflandırması aşağıda verilmiştir.

#### a) Monoterpenler:

Aldehitler: Geranial (sitral A), neral (sitral B), sitronellal

Alkoller: Sitronellol, geraniol, linalol, borneol

Hidrokarbonlar:  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen,  $\beta$ -osimen, sabinen

#### b) Seskiterpenler:

Hidrokarbonlar: Karyofillen, karyofillen oksit, germakren D

*M. officinalis* yapraklarından uçucu yağ genellikle su distilasyonu yöntemiyle elde edilir. Toz edilmiş yaprakların 1-4 saat distilasyonu ile ancak % 0.2-0.4 arasında uçucu yağ verimi elde edilebilmektedir (2, 14). Uçucu yağ, taze limon kokusu ve açık sarı rengi ile karakterizedir (3).

*M. officinalis* uçucu yağı Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi (GK-KS) ile analiz edilmiş ve temel bileşiklerinin monoterpen aldehit yapısındaki sitral A (geranial), sitral B (neral) ve sitronellal olduğu belirlenmiştir (10). Yapılan kantitatif analizler sonucunda, uçucu yağdaki sitronellal ve sitral (neral ve geranial) yüzdeleri sırasıyla % 2-40 ve % 10-30 olarak belirlenmiştir. Bu bileşikleri  $\beta$ -karyofilen, germakren D, osimen ve sitronellol takip etmektedir (14, 23).

Diğer taraftan, başka bir çalışmada *M. officinalis*'in *altissima* alt türlerinde sitral tipi aldehitlerin olmadığı görülmüştür (24).

Tınmaz ve arkadaşlarının (2001) Çanakkale'nin ekolojik koşullarında yetişmiş ve farklı zamanlarda toplanan *M. officinalis* bitkileri üzerinde yaptığı bir araştırmada, en yüksek uçucu yağ verimi (% 0.14) çiçeklenmenin başlangıcında toplanan bitkide elde edilmiştir (14).

Yüksek verim ve kalite özelliklerine sahip, tarıma uygun *M. officinalis* popülasyonlarını belirlemek amacıyla yurt içi ve yurt dışı kaynaklardan 11 *M. officinalis* türü Ege bölgesinde birbirinden farklı ekolojik özelliklere sahip Menemen (deniz seviyesinde, ılıman iklim) ve Bozdağ (deniz seviyesinden 1000 m yükseklikte, kışlar kar yağışlı) lokasyonlarında üç yıl süre ile adaptasyon denemesine alınmıştır. Çalışma sonucunda uçucu yağın temel bileşikleri geranial, neral, sitronellal, geraniol,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen, linalool, ve borneol olarak belirlenmiştir. Menemen ve Bozdağ lokasyonlarının her ikisinde de uçucu yağın ana bileşenin geranial olduğu tespit edilmiştir.  $\beta$ -pinen oranı, Menemen'e göre Bozdağ'da çok düşük çıkarken Türkiye popülasyonlarında yurt dışına oranla daha yüksek bulunmuştur. Bitkiye limon kokusunu veren sitral (neral ve geranial) oranı ise Avrupa popülasyonlarında daha yüksek çıkmıştır (25).

Yunanistan'da üç farklı lokaliteden toplanan *M. officinalis* örneklerinden elde edilen uçucu yağın analizi GK ve GK-KS ile yapılmıştır. Ana bileşik olarak  $\beta$ -pinen (% 6.4-18.2), sabinen (% 6.9-17.4), (*E*)-karyofillen (% 7.2-15.3) ve karyofillen oksit (% 12.6-24.4) tespit edilirken sitral ve sitronellal bileşiklerine rastlanmamıştır (6). Bir diğer çalışmada da, Yunanistan'da yetişen *M. officinalis* subsp. *altissima* alt türlerinden elde edilen kültür formlarında yaprakların temel bileşegi  $\beta$ -karyofillen (% 7.3-12.6), germakren D (% 34.8-51.5), sabinen (% 0.9-14.7) ve  $\beta$ -pinen (% 0.5-8.0) olduğu belirlenirken yine sitral ve sitronellale rastlanmamıştır (25).

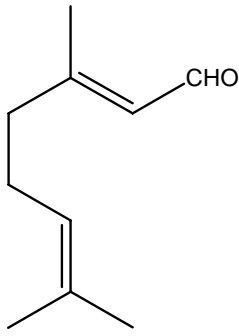
Polonya'da kültürü yapılan *M. officinalis* popülasyonlarından elde edilen uçucu yağ miktarının bitkinin kısımlarına göre dağılımı araştırıldığında yapraklarda % 0.08-0.25, tüm bitkide ise % 0.06-0.167 oranında uçucu yağ bulunmuştur. Ayrıca doğadan toplanan bitki materyalindeki uçucu yağ miktarı, kültür formundakinden; taze

materyalin uçucu yağ içeriği de kuru olandan daha yüksek çıkmıştır. Aynı zamanda sitral, sitronellal, linalol, neral, geranial içerikleri de popülasyonlar arasında büyük farklılık göstermiştir (26).

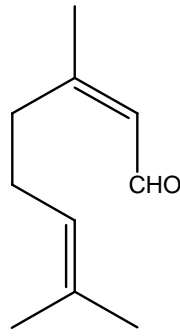
*M. officinalis*'in uçucu yağının bileşiminde yer alan temel bileşiklerin formülleri:

### 1) Monoterpenler

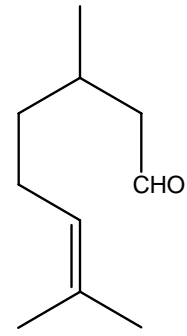
#### a) Aldehitler



Geranial (sitral A)

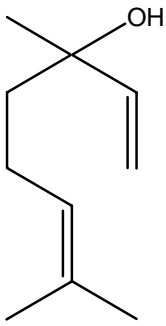


Neral (sitral B)

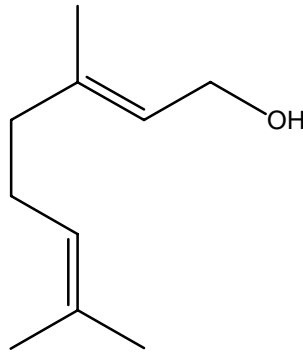


Sitronellal

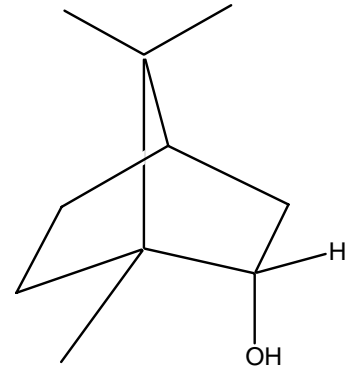
#### b) Alkoller



Linalol

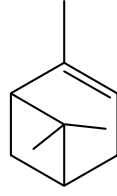


Geraniol

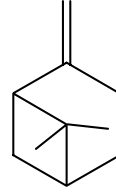


Borneol

### c) Hidrokarbonlar

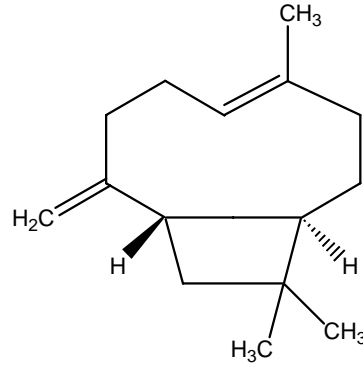


$\alpha$ -pinen



$\beta$ -pinen

### 2) Seskiterpenler

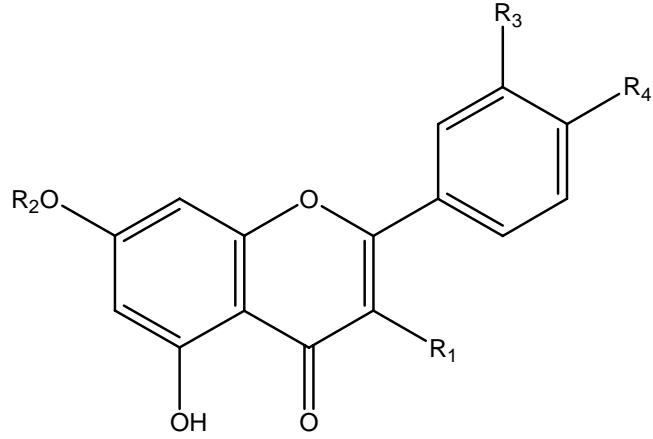


(*E*)-karyofillen

### 2.2.2. Flavonoitler

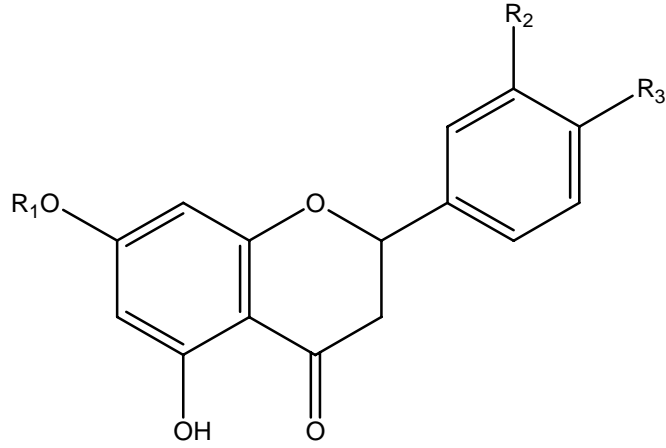
*M. officinalis*'den elde edilen flavonoitlerin çoğunlukla flavon, flavonol ve flavanon yapısında oldukları görülmüştür. Bu bileşikler bitkinin yapraklarından izole edilip yapıları aydınlatılmış ya da YPSK yöntemiyle ekstrelerde varlıkları saptanmıştır. Bu bileşikler aşağıdaki tablolarda verilmiştir.





**Tablo 1.** *Melissa officinalis* bitkisinden elde edilen flavon ve flavonoller

Bileşik	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Kaynak
Apigenin	H	H	H	OH	14
Apigenin 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozit	H	Glukoz	H	OH	27
Luteolin	H	H	OH	OH	14, 15, 27
Luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozit	H	Glukoz	OH	OH	14, 27
Luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukuronopiranozit	H	Glukuronopiranoz	OH	OH	27
Luteolin 3'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukuronopiranozit	H	H	<i>O</i> -Glukuronopiranoz	OH	27
Luteolin 7- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozit-3'- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukuronopiranozit	H	Glukoz	<i>O</i> -Glukuronopiranoz	OH	27
Kemferol	OH	H	H	OH	14
Kersetin	OH	H	OH	OH	14



**Tablo 2. *Melissa officinalis* bitkisinden elde edilen flavanonlar**

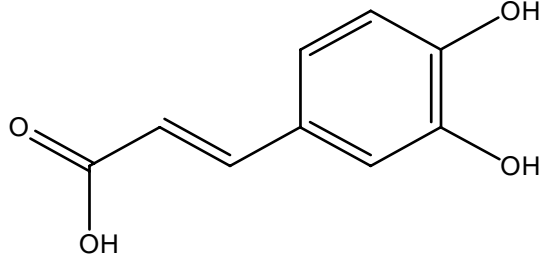
Bileşik	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Kaynak
Naringin	Neohesperidoz	H	OH	16
Naringenin	H	H	OH	16
Hesperidin	Rutinoz	OH	OCH <sub>3</sub>	16
Hesperetin	H	OH	OCH <sub>3</sub>	16
Eriyodiktiyol	H	OH	OH	16
Eriyodiktiyol 7- <i>O</i> -glukozit	Glukoz	OH	OH	16

### 2.2.3. Fenolik asitler

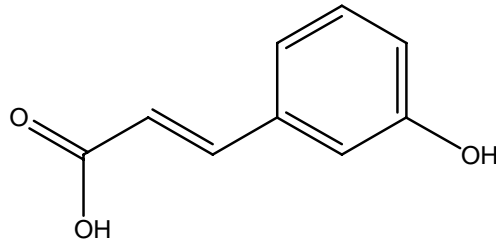
#### a) Hidroksisinnamik asit türevleri

*M. officinalis*'in toplam hidroksisinnamik asit içeriği spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilmiştir. Bu sonuçlara göre yaprakların rozmarinik asit üzerinden hesaplanmış % 11 total hidroksisinnamik asit içerdiği belirtilmiştir. YPSK yöntemiyle yapraklarda % 4.1 oranında rozmarinik asit varlığı saptanmıştır (14). Bir başka çalışmada, Slovakya'da yetişen *M. officinalis*'in YPSK ile analizi yapılmıştır. Metanol-su (60:40) karışımının en etkili ekstraksiyon çözücüsü olduğu saptanan yöntemde, ekstredeki fenolik asitlerin verimleri şöyledir: rozmarinik asit 17.03 mg/g, kafeik asit 1.99 mg/g ve protokateşik asit 0.041 mg/g (28, 29).

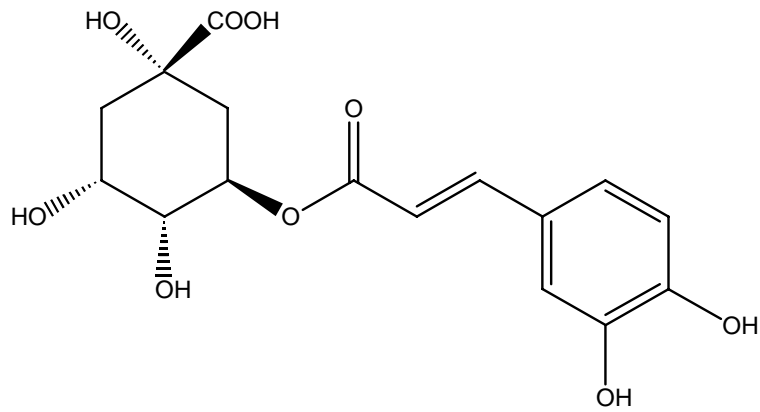
Bitkiden elde edilen hidroksisinnamik asit türevi bileşikler, kafeik asit, *m*-kumarik asit, klorojenik asit ve rozmarinik asittir (14, 17, 28, 30). Bu bileşiklerin formülleri aşağıda verilmiştir.



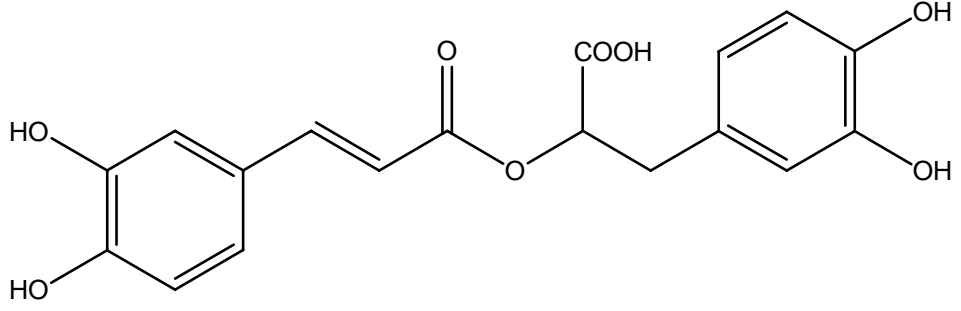
Kafeik asit



*m*-kumarik asit

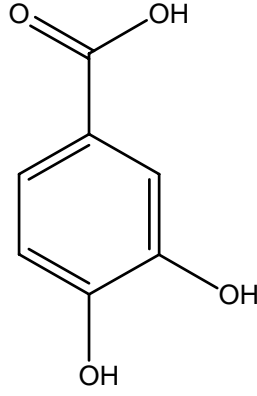


Klorojenik asit



Rozmarinik asit

#### b) Benzoik asit türevleri



Protokateşik asit

#### 2.2.4. Terpenler

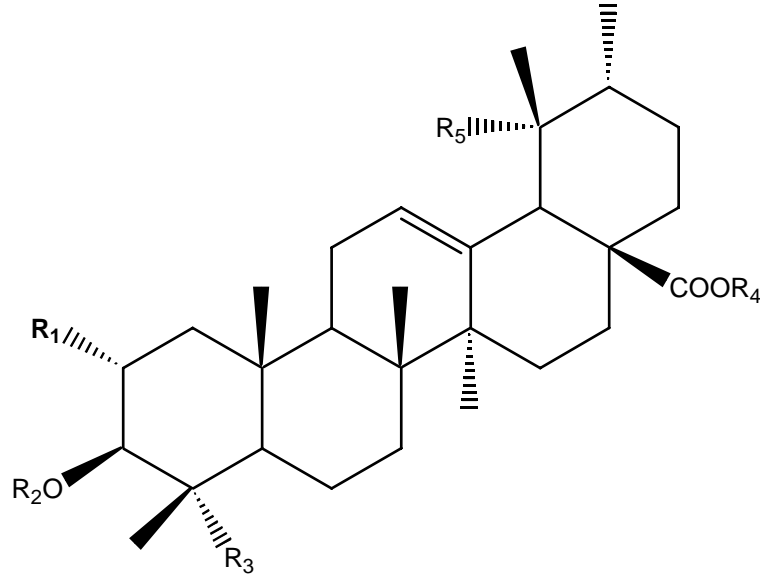
Bu kısımda uçucu yağ yapısında yer almayan, bir başka ifadeyle uçucu özellik göstermeyen bileşiklere yer verilmiştir. *M. officinalis*'den elde edilmiş olan terpenoitleri iki grup altında toplanmıştır.

##### a) Monoterpen glukozitler

*Melissa officinalis*'te geranil ve öjenol glukozitleri gibi birkaç monoterpen glukozitinin varlığı saptanmıştır (14).

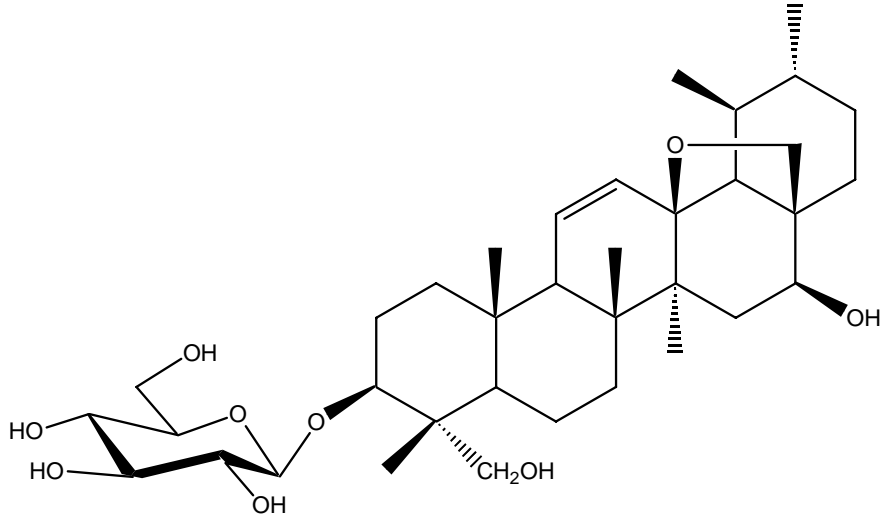
## b) Triterpenler

Bitkinin yapraklarından hazırlanmış olan alkol (MeOH veya EtOH) ekstrelerinden olunan ve ursan tipi bilinen pentasiklik triterpen yapısındaki bileşiklerin (ursolik asit, oleanolik asit, quadranoside III) yanısıra, *M. officinalis*'in kurutulmuş sap ve yaprakları kullanılarak altı yeni triterpen (bir yeni ursen glukoziti ve beş yeni sülfatlı ursan ve oleanan triterpenleri) izole edilmiş ve bileşiklerin yapıları, 1D-(<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C) ve 2D-(DQF-COSY, HSQC ve HMBC) NMR ve HRESIMS analizleri gibi kapsamlı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatılmıştır (15). Bileşikler ve formülleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

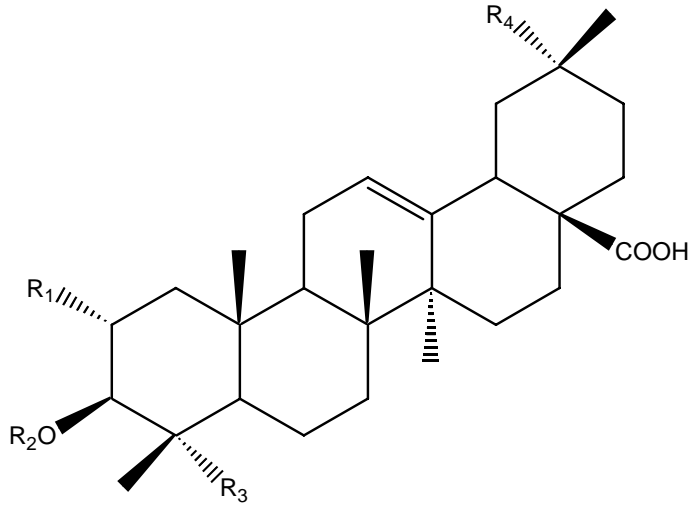


Tablo 3. *Melissa officinalis* bitkisinden elde edilen ursan türevi bileşikler

Bileşik	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Kaynak
Ursolik asit	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	15, 31
Rotundik asit 3,23-disülfat ester	H	SO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> OSO <sub>3</sub> H	H	OH	15
23-hidroksitormentik asit 3,23-disülfat ester	OH	SO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> OSO <sub>3</sub> H	H	OH	15
Niga-içigozit F1	OH	SO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> OSO <sub>3</sub> H	Glukoz	OH	15



3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 23-trihidroksi-13,28-epoksiurs-11-en-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozit



Tablo 4. *Melissa officinalis* bitkisinden elde edilen oleanan türevi bileşikler

Bileşik	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Kaynak
Oleanolik asit	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	15, 31
29-hidroksihederagenin 3,23-disülfat ester	H	SO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> OSO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> OH	15
Staklik asit A 3,23-disülfat ester	OH	SO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> OSO <sub>3</sub> H	CH <sub>2</sub> OH	15

### 3. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

#### 2.3.1. Anti-ülserojenik Aktivite

İndometazin verilerek gastrik ülser oluşturulmuş sıçanlarda, melisa yapraklarının etanollü sıvı ekstresinin, mide asit salgısını engelleyici ve sitoprotektif özellikleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, ekstre doza bağımlı olarak (2.5-10 ml/kg oral doz) asit üretimini azaltıp münin salgısını artırırken, serbest prostaglandin E<sub>2</sub> ve lökotriyenlerde de artışa neden olmuştur. Ekstrenin anti-ülserojenik aktivitesi histolojik olarak da kanıtlanmış olup sitoprotektif aktivitesi ise kısmen içeriğindeki flavonoitlere ve radikal süpürücü etkisine bağılı bulunmuştur (32).

#### 2.3.2. Antispazmodik Aktivite

Melisa yapraklarının uçucu yağı, izole kobay ileumunda, sıçan duodenumunda ve sperm kanalında, tavşan jejenumunda ve aortunda test edildiğinde antispazmodik aktivite göstermiştir. Yağın aynı zamanda kobay farelerinin nefes borusu (EC<sub>50</sub>: 22 mg/l) ve elektrik uyarımı ile kasılmış ince bağırsak kası (EC<sub>50</sub>: 7.8 mg/l) üzerinde gevşetici etkisi görülmüştür (33).

Diğer taraftan, melisa yaprağından 2.5 ml/l ve 10 ml/l konsantrasyonda hazırlanan sulu-alkollü ekstre (1 kısım bitki 3.5 kısım etanol), asetilkolin ve histamin uyarıcıları ile kobay ileumunda oluşturulmuş kasılma üzerinde test edildiğinde belirgin bir antispazmodik aktivite göstermemiştir (34).

*M. officinalis* uçucu yağı ve yağın temel bileşeni olan sitralin İBS (İrritabil Barsak Sendromu) hastalığı üzerindeki gevşetici etkisi araştırılmıştır. Bunun için üç farklı spazm yapıcı (KCl, asetilkolin ve serotonin) ile tavşan ileumlarında kasılma oluşturulmuştur. *M. officinalis* uçucu yağı ve sitral, KCl depolarizasyonuna ve muskarinik (asetilkolin) veya serotonerjik (serotonin) reseptörler agonist etkinin inhibisyonuna bağılı olarak ileum kasılmasını gevşetmiştir. Bu üç spazmojene karşı *M. officinalis* uçucu yağı ve sitral karşılaştırıldığında aynı konsantrasyonlarda sitralin tek başına, kasılmayı kontrol etme başarısı uçucu yağa oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu da spazmolitik etkiden daha çok sitralin sorumlu olduğunu göstermiştir (35).

### **2.3.3. Antimikrobiyal Aktivite**

#### **2.3.3.1. Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite**

Yugoslavya 'da kültüre alınan *M. officinalis*'den elde edilmiş olan uçucu yağın antibakteriyel etkinliği, penisilinin (500 ve 1000 µg/cm<sup>3</sup>) pozitif kontrol olarak kullanıldığı bir çalışmada çukur agar difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm bakteri suşlarına karşı değişen seviyelerde antibakteriyel aktivitesi ortaya çıkan uçucu yağın *n*-hekzan ile hazırlanan dilüsyonları (% 20 ve % 50) penisiline dirençli olan Gram-negatif bakteri suşlarını bile inhibe etmiştir. Aynı çalışmada uçucu yağın, dermatomiyositis hastalığına neden olan *Trichophyton tonsurans* mantarına karşı antifungal aktivitesi de denenmiştir. Pozitif kontrol olarak sentetik bir antimikotik ilaç olan bifonazol'un (MFC=10 µl/ml) kullanıldığı çalışmada, uçucu yağ (MFC=15 µl/ml) bifonazole yakın düzeyde antifungal aktivite göstermiştir (5).

Sırbistan'da yapılan bir çalışmada *M. officinalis*'in petrol eteri, kloroform, etil asetat, *n*-bütanol ve sulu ekstralarının antibakteriyel ve antiproliferatif etkileri karşılaştırılmıştır. En etkili antibakteriyel aktivitenin, *Sarcina lutea* bakterisi üzerinde denemeler sonucunda petrol eteri ve etil asetat ekstralarında olduğu saptanmıştır. Kloroform ekstresi, % 50 inhibe edici konsantrasyonu ile en güçlü antiproliferatif etkiyi göstermiştir (11).

Almanya'da yapılan bir araştırmada, *Nepeta cataria*, *N. cataria* var. *citriodora* ve *M. officinalis* uçucu yağlarının solunum sistemine etki eden ve cilt enfeksiyonlarına neden olan bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri araştırılmıştır. Kullanılan tüm Gram(+) ve Gram(-) bakteri suşları üzerinde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *M. officinalis* uçucu yağı göstermiştir. Özellikle *Streptococcus pneumoniae* suşuna karşı en düşük MIC değeri ile en etkili *M. officinalis* uçucu yağı bulunmuştur (36).

Üç haftayı aşkın süren bir çalışmada, maymunlara topikal olarak (% 5, taşıyıcı içinde) rozmarinik asit uygulanmıştır. Plasebo ile karşılaştırıldığında rozmarinik asitin gingival ve plak indeksini anlamlı oranda azalttığı saptanmıştır (p<0.001) (37).



### 2.3.3.2. Antiviral Aktivite

Melisa yapraklarının sulu ekstresi Newcastle Disease virüsü, Semliki Forest virüsü, influenza virüsü, miksovirus, çiçek hastalığı virüsü ve *Herpes simplex* virüsüne karşı antiviral aktivite (ED<sub>50</sub>: 16 µg/ml) göstermiştir (38 - 41).

Lamiaceae familyasındaki bitkilerin anti-HIV-1 aktiviteleri araştırıldığında MT-4 hücre kültürleri üzerinde en etkili *M. officinalis* sulu ekstresi (ED<sub>50</sub> = 3.8) bulunmuştur. Ayrıca bitkilerin, izole edilmiş HIV-1 suşlarının replikasyonunda, HIV-1 revers transkriptaz aktivitesi incelendiğinde yine en etkili *M. officinalis* sulu ekstresi bulunmuştur (9).

Melisa ekstresinin HSV virüslerine karşı *in vitro* ortamda antiviral aktivitesi tanımlanmıştır. Bulgular bitkinin topikal kullanımı ile de uygunluk göstermiştir (12).

*M. officinalis*'in uçucu yağının *herpes simplex* virüsü üzerinde inhibe edici etkisi *in vitro* ortamda denendiğinde uçucu yağ, % 0.0004 ve % 0.00008 dilüsyonlarında sırasıyla HSV-1 ve HSV-2 virüslerine karşı % 50 inhibitör konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) göstermiştir. Toksik olmayan konsantrasyonlarda uçucu yağ kullanıldığında virüs plağı oluşumunun anlamlı oranda azaldığı görülmüştür (HSV-1 için % 98.8, HSV-2 için % 97.2). Buna göre, virüsün konakçı hücreye penetrasyonundan önce uygulanan Melisa uçucu yağı, herpesvirüs üzerinde doğrudan antiviral etki göstermiştir (10).

*M. officinalis*'in sulu alkollü ekstresinin, Vero hücreleri üzerinde HSV-2 virüs tipine karşı antiviral aktivitesi test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak asiklovir kullanılan çalışmada, melisa ekstresi toksik olmayan konsantrasyonlarda (0.025-1 mg/ml) HSV-2 virüsünün sitopatik etkilerini azalttığını göstermiştir. En yüksek inhibe edici etki (% 60) 0.5 mg/ml konsantrasyonunda elde edilmiştir (42).

*M. officinalis*'in uçucu yağının HEp-2 hücreleri üzerinde HSV-2 replikasyonuna karşı etkilerini değerlendirmek için uçucu yağın beş farklı konsantrasyonu (25, 50, 100, 150 ve 200 µg/ml) hazırlanmıştır. 100 µg/ml konsantrasyona kadar uçucu yağın HEp-2 hücrelerine toksik olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte 100 µg/ml konsantrasyonun üzerinde önemsiz oranda toksik bulunmuştur. *M. officinalis* uçucu yağının toksik olmayan konsantrasyonlarda HSV-2 replikasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. *M.*

*officinalis*'in bu etkisinin uçucu yağın bileşiminde önemli bir yer tutan ve protein sentezinin inhibisyonundan sorumlu olan sitral ve sitronellalden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (43).

115 hastanın katıldığı çok merkezli, açık, kontrollü bir çalışmada melisa yaprağının liyofilize sulu ekstresini (70:1) içeren % 1 krem, derideki *Herpes simplex* lezyonlarının iyileşme süresini önemli ölçüde kısaltmıştır ( $p<0.01$ ). Bu krem, idoxuridin ve tromantidin HCl içeren diğer virostatiklerle karşılaştırıldığında enfeksiyonun nüksetme aralığını da belirgin oranda uzatmıştır ( $p<0.01$ ). Bu etkileri takiben 5 gün içinde lezyonların ebatlarındaki belirgin bir azalma, 116 hastanın katıldığı çok merkezli, çift-körlü, plasebo kontrollü başka bir çalışmada doğrulanmıştır (44).

Randomize, çift-körlü, plasebo-kontrollü bir çalışmada % 1 *M. officinalis* yaprak kuru ekstresini (70:1) içeren standardize melisa kreminin *herpes simplex labialis* tedavisindeki etkisi araştırılmıştır. *Herpes simplex labialis* öyküsü (her sene en az dört kere) olan 66 hastadan 34'ü topikal olarak melisa kremi ile tedavi edilirken 32 hastaya da plasebo verilmiştir. Kremler uçuklu bölgeye günde 4 kez olmak üzere 5 günden fazla uygulanmıştır. *Herpes labialis* semptomları ikinci günde azami hassasiyete ulaştığından ve buna bağlı olarak şikâyetler belirgin bir öneme sahip olduğundan ikinci gündeki şikâyetlerin giderilmesi birinci dereceden önemli parametre olarak alınmıştır. Tedavi sonucunda melisa kremi kullanan grupta plasebo grubuna göre belirgin bir iyileşme saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Buna ek olarak, iyileşme süresini kısaltması, enfeksiyonun yayılmasını önlemesi ve tipik semptomlarda (kaşıntı, karıncalanma, yanma, batma, şişkinlik, gerginlik, eritem) hızlı azalma sağlaması nedeniyle melisa kremi avantajlı sayılmaktadır. Melisa kreminin karşı direnç gelişimi gözlenebilmesine rağmen enfeksiyonun nüks etme süresini uzattığı da bir gerçektir (45).

% 1 kuru melisa ekstresi içeren kremin (Lomahephan®) topikal preparatı kullanılarak iki çalışma yapılmıştır. İlk denemede 115 yetişkin hastada herpes lezyonu olan bölgeye günde 5 defa melisa kremi uygulanmıştır. Hastaların % 96'sında sekizinci günde, % 60'ında dördüncü günde ve % 87'sinde altıncı günde iyileşme sağlanmıştır. Kremin karşı gösterilen tolerans mükemmel olup sadece üç hasta uygulama sırasında yanma ve paresteziden yakınmıştır. İkinci denemede başlangıç semptomlarının ilk 72 saati içinde olan 67 hasta randomize ve plasebo kontrollü bir çalışmaya tabi

tutulmuşlardır. Plasebo ile karşılaştırıldığında melisa grubunda, lezyon ebatlarındaki azalma ve iyileşme süresindeki kısalma daha anlamlı bulunmuştur ( $p<0.1$ ) (46).

Bir başka çalışmada ise, topikal melisa ekstresi kullanımının genital ve oral herpes semptomlarının süresini ve şiddetini azalttığı tespit edilmiştir (18).

#### **2.3.4. Antienflamatuvar Aktivite**

*M. officinalis* bitkisinin sekonder metaboliti olan rozmarinik asit, laboratuvar ortamında enflamatuvar reaksiyonların komplemana bağımlı mekanizmasını inhibe etmiştir (47).

Rozmarinik asit intravenöz olarak 0.1-1 mg/kg doz aralığında uygulandığında sıçanların pençelerindeki ödemi azaltmıştır. Aynı çalışmada, rozmarinik asit 1 mg/kg (intravenöz) ve 10 mg/kg (intramusküler) dozlarda uygulandığında sıçanlarda derideki pasif anafilaksiyi de inhibe etmiştir (48).

*M. officinalis* bitkisinin etanol ekstresi, uçucu yağı ve uçucu yağın yapısındaki bileşikler (sitril, geranial, neral) *in vitro* ortamda proenflamatuvar maddelerin (eikozanoidler, lökotrien B<sub>4</sub> ve tromboksan B<sub>2</sub>) oluşumunu inhibe etmiştir. Sulu ekstresinin ise böyle bir aktiviteden yoksun olduğu görülmüştür (12).

#### **2.3.5. Antikolinergik Aktivite**

Melisa yaprağının etanol ekstresinin merkezi sinir sistemindeki kolinerjik reseptörlere bağlanma aktivitesi araştırılmıştır. Ekstre insan serebral korteks hücre membranları homojenatında nikotin ve skopolamini, nikotinik ve muskarinik reseptörlerden uzaklaştırmıştır ( $IC_{50}<1$  mg/ml). Melisa yaprak ekstresinde zayıf bir nikotinik ligant olan kolin bulunmuştur. Ekstre nikotinik reseptörlere karşı daha fazla afinite göstermiştir (49).

### **2.3.6. Asetilkolinesteraz İnhibisyonu**

Melisanın sulu etanol ekstresinin *in vitro* ortamda asetilkolin reseptörlerini (asetilkolin reseptör agonistleri, ileri yaşlarda meydana gelen Alzheimer's gibi nörodejeneratif hastalıklarda kullanılmaktadır.) taşıyan beyin hücre zarında nikotinin ve skopolaminin reseptörlere bağlanmalarını yarışmalı bir şekilde inhibe etmiştir (12).

*M. officinalis* yapraklarından hazırlanan etanol (% 45) ekstresinin asetilkolinesteraz inhibe edici etkisi, referans bileşik olarak fizostigmin kullanılarak değerlendirilmiştir. Lineer regresyon analizi kullanarak standarta ait eğri grafiğinden yola çıkarak ekstrenin potansiyeli hesaplanmıştır. Ekstrenin 10. dk.'daki aktivitesi değerlendirilmiş ve 1 mg ekstre  $1.72 \pm 0.16$  µg fizostigmin'e eşdeğer olarak bulunmuştur. Biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen fraksiyonlama işlemi sonucunda birçok fraksiyonda aktivite varlığı saptanmıştır. En aktif fraksiyonun kimyasal bileşikleri LC-DAD-ESI-KS ve NMR teknikleri kullanılarak incelenmiş olup bu fraksiyonda *trans*-rozmarinik asit, *cis*-rozmarinik asit ve rozmarinik asit metoksi türevi bir bileşiğin varlığı saptanmıştır (30).

### **2.3.7. Demans Üzerindeki Etki**

Çeşitli demans durumlarına sahip, belirgin oranda ajitasyonu olan ve yaş ortalaması 78.5 olan 72 hasta dört hafta boyunca çok merkezli çift- körlü plasebo-kontrollü bir çalışmaya katılmışlardır. 36 hasta topikal olarak % 10 melisa uçucu yağı içeren losyon ile 36 hasta da plasebo losyon ile tedavi edilmiştir. Losyonlar hastaların yüzlerine ve her iki kollarına aromaterapötik tedavi ile nazikçe uygulanmıştır. Melisalı losyonu kullananlardaki gelişim skoru % 35 iken plasebo losyonu kullananlarda % 11 olmuştur. Plasebo ile karşılaştırıldığında melisa grubundaki olumlu aktivitelerde artış olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ) (50).

Randomize kontrollü bir çalışmada, hafif ve orta şiddette Alzheimer semptomlarına sahip 42 hasta dört ay boyunca *M. officinalis* veya plasebo ile tedavi edilmiştir. *M. officinalis* kullanan hastalarda bilişsel fonksiyonların plaseboya göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca melisa kullanan hastalarda ajitasyon belirgin bir

şekilde azalmıştır. Bu sonuç bitkinin halk arasında kaygı durumlarının tedavisindeki kullanılışı ile de paralellik gösterdiği belirtilmiştir (51).

### **2.3.8. Antioksidan Aktivite**

Melisa yaprak ekstresinin, ayçiçeği yağında ve ayçiçeği yağının sudaki emülsiyonunda oksidasyonu önlediği görülmüştür (18).

Yugoslavya 'da yapılan bir çalışmada, *M. officinalis*'in uçucu yağının DPPH' ve OH' radikallerine karşı radikal süpürücü kapasitesi araştırılmıştır. Etkiden sorumlu bileşiklerin tanımlanması için İTK ve GK-KS analizleri kullanılmıştır. Buna göre, DPPH' radikallerinin nötralizasyonunda en etkin bileşikler monoterpen aldehit ve ketonlar (sitral, sitronellal, izomenton ve menton) ile mono- ve seskiterpen hidrokarbonların ( $\beta$ -karyofillen) karışımı olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, uçucu yağın lipit peroksidasyonu sürecinde, özellikle de Fenton reaksiyonunda ( $Fe^{+2}/H_2O_2$ ) oluşan OH' radikallerine karşı çok güçlü koruyucu aktivitesi de kaydedilmiştir. Uçucu yağın koruyucu etkileri pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'e (% 18.7) karşı denendiğinde 2.13  $\mu$ g/ml (% 60) konsantrasyonu ile daha yüksek aktivite göstermiştir (5).

Bir başka çalışmada ise *M. officinalis*'in petrol eteri, kloroform, etil asetat, *n*-bütanol ve sulu ekstreslerinin radikal süpürücü etkileri karşılaştırılmıştır. Buna göre, en yüksek DPPH' (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve OH' radikal süpürücü etki sırasıyla 0.4 mg/ml ve 0.5 mg/ml konsantrasyonlarında *n*-bütanol ekstresinde görülmüştür. En yüksek lipit peroksil süpürücü etki (% 93.2) ise, *n*-bütanol ekstresinin daha yüksek konsantrasyonlarında (5 mg/ml) elde edilmiştir (11).

*M. officinalis* yapraklarından hareketle süper kritik gaz ( $CO_2$ ) yöntemi ile ekstre hazırlanmıştır. Kalan posa daha sonra su ile ekstre edilmiştir. Diğer taraftan yapraklardan hareketle ham su ekstresi de hazırlanmıştır. Ekstrelerin antioksidan etkileri karşılaştırılmış ve en yüksek aktivite, süperkritik ekstraksiyon sonucunda kalan ve çok yüksek oranda polifenolik bileşikler (kafeik asit, rozmarinik asit) içeren katı posanın sulu ekstraktında tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin  $\alpha$ -tokoferolden daha fazla ve BHA

(bütillenmiş hidroksi anisol) ile kıyaslanacak oranda antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur (52).

### **2.3.9. Sedatif Aktivite**

*M. officinalis*'in liyofilize sulu etanol ekstresi (% 30) intraperitoneal olarak farelere verilmiş ve ekstrenin sedatif etkisi bir takım deneylerle ispatlanmıştır. Etki doza bağımlı olup 25 mg/kg dozda en yüksek etki görülmüştür. Ekstrenin düşük dozu (3-6 mg/kg), pentobarbital verilen farelerde uykuya dalma süresini kısaltmıştır. Yüksek dozlarda (400 mg/kg) ekstrenin periferik analjezik etkisi saptanırken, santral analjezik etkisi görülmemiştir. *M. officinalis*'in uçucu yağı ise farelerde intraperitoneal olarak hiçbir etki göstermezken, oral olarak uygulandığında 3.16 mg/kg ve üzeri dozlarda sedatif ve narkotik etkiler göstermiştir (53).

Ortalama yaşları 19 olan 20 sağlıklı gönüllü üzerinde yapılan randomize, çift-körlü, plasebo - kontrollü çapraz bir çalışmada gönüllüler 4 günlük tedavi programında plasebo ya da 300, 600 veya 900 mg standardize melisa yaprak ekstresi (% 30 metanol) almışlar. En düşük dozdan 1-2.5 saat sonra kişisel sakinlik belirgin oranda hissedilmiştir ( $p = 0.001-0.05$ ). Aynı zamanda sürekli tetikte olma halinin ölçüm yapılan tüm zamanlarda azaldığı görülmüştür ( $p = 0.001-0.05$ ) (13).

6.2 g kurutulmuş melisa bitkisi plaseboya karşı gönüllülere uygulanarak basit bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda gönüllülerin kendi kendilerini değerlendirmeleri sonucunda uyanıklılık, tetikte olma durumu plaseboya kıyasla farklılık göstermemiştir. Buna göre akut sedatif etki tanımlanamazken uygulamaya devam edildiği takdirde sedatif etkilerin ortaya çıktığı görülmüştür (12).

Çift körlü, kontrollü, randomize bir çalışmada, uykusuzluk problemi olan 20 yetişkin gönüllü üzerinde valeryan kökü/ melisa kombinasyonunun (160 mg valeryan kökü ve 80 mg melisa) objektif uyku parametreleri üzerine etkileri sedatif bir ilaçla (0.125 mg triazolam) ve plasebo ile karşılaştırılmıştır. Şiddetli uykusuzluk çeken grupta valeryan/melisa kombinasyonu kullanımının uyku kalitesini ve derin uyku miktarını arttırdığı görülmüştür. Uyku süresinde kısalma ve uykuya dalmada gecikme olmadığı gibi uyanık kalındığı süre içinde uyku hali görülmemiştir. Triazolam kullanan grupla

kıyaslandığında gün içinde sedasyona ve azalmış zihinsel işlevlere çok daha az rastlanmıştır. Ayrıca konsantrasyon-performans testinde bitkisel karışımı kullanan grubun plasebo kullanan gruptan daha iyi dikkatini toplayabildiği ortaya çıkmıştır (7, 18).

Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan randomize, plasebo kontrollü, çift körlü, çok merkezli bir çalışmada hafif uyku bozukluklarının tedavisi için valeriyana/melisa kombinasyonu veya plasebo kullanılmıştır. Valeriyana/melisa kombinasyonu kullanan grup plasebo grubuna göre anlamlı oranda yüksek uyku kalitesine ulaştığı görülmüştür. Preparata çok iyi tolerans gösterilmiş olup ciddi bir advers etki görülmemiştir (54).

Çift körlü, plasebo kontrollü, randomize, çapraz bir çalışmada 18 sağlıklı gönüllüye iki ayrı tek doz standart *M. officinalis* ekstresi (300 mg, 600 mg) ile plasebo ayrı günlerde verilmiştir. Duygu durumundaki değişim doz öncesi ve doz verildikten 1 saat sonra ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 600 mg *M. officinalis* ekstresinin dozu anlamlı oranda negatif duygu durumunu düzeltmiştir (sakinlik hali artmış, tetikte olma hali azalmış). Bununla birlikte 300 mg doz uygulamasından sonra duygu durum bozukluklarında hiçbir azalma görülmemiştir (13).

### **2.3.10. Antitiroit Aktivite**

*In vitro* ortamda yapılan bir çalışmada, liyofilize melisa ekstresi TSH hormonunun bağlanmasını ve tiroid hormonu T<sub>4</sub>' ün T<sub>3</sub>' e deiyodinasyonunu inhibe etmiştir. Melisa aynı zamanda tiroid-uyarıcı antikorların TSH hormon reseptörlerine bağlanmasını inhibe etmiştir. Normal tiroid modelinde melisanın liyofilize sulu etanol ekstresinin enjekte edilmesi, serum TSH konsantrasyonunu azaltırken, tiroid hormon seviyesini değiştirmemiştir. Hipotiroid modelde ise daha yüksek doz uygulanmasına rağmen TSH seviyesi düşmemiştir (12).

Tiroid hormonu seviyesi normal olan tavşanlarda kuru melisa ekstresi uygulaması, hipofiz salgısını azaltarak serum TSH konsantrasyonunun düşmesine sebep olmuştur (18).

### **2.3.11. Diğer Etkiler**

40 mg/100 g dozda tavşanlara uygulanan kuru melisa ekstresi serum prolaktin seviyesini azaltmıştır (18).

Yemeklerine % 2 kolesterol, % 20 ayçiçek yağı ve % 0.5 kolik asit katılarak hiperlipidemi oluşturulmuş tavşanlara *M. officinalis*'in sulu ekstresi verilmiştir. Bu uygulama sonucunda, serumdaki total kolesterol, total lipit, ALT, AST ve ALP seviyeleri ve karaciğer dokusundaki LPO seviyeleri azalırken dokudaki glutatyon seviyesi de artmıştır. Bu bulgular, *M. officinalis*'in hipolipidemik etkisini ortaya koyarken hiperlipidemik tavşanların karaciğerinde koruyucu etki gösterdiği kanıtlanmıştır (15).

Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 50 ve 100 mg/kg dozlarda uygulanan rozmarinik asitin venöz trombozisi yaklaşık % 50 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Aynı zamanda kan platelet agregasyonunu 100 ve 150 mg/kg dozlarda sırasıyla % 30 ve % 40 oranında baskıladığı da kaydedilmiştir (18).

Rozmarinik asit 1 mg/kg (intravenöz) ve 10 mg/kg (intramuskular) dozda uygulandığında sıçanlardaki pasif kutanöz anafilaksiyi inhibe etmiştir (48).



## 2.4. KULLANILIŞ

Drog, sinirsel uyku bozuklukları ve ajitasyon hallerinde, fonksiyonel gastrointestinal şikayetlerde tedaviye yardımcı olarak kullanılmaktadır (55).

Aynı zamanda aromatik bir bitki olan *M. officinalis* soğuk algınlığı ve fonksiyonel dolaşım bozukluklarında kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hafif depresyon tedavisinde ve spazm giderici olarak da kullanımı mevcuttur. Uçucu yağın antibakteriyel ve antifungal etkileri iyi bilinmektedir (6).

### 2.4.1. Yaprakların Uygulama Şekli

#### İnfüzyon hazırlama:

Bir fincan sıcak suda 1.5 – 4.5 g drog (kurutulmuş ve parçalanmış *Melisa officinalis* yaprakları) 10 dk bekletildikten sonra süzülerek infüzyonu hazırlanır ve gün içinde defalarca tüketilebilir (19).

#### Dekoksiyon hazırlama:

Bitkinin yaprakları iyice parçalandıktan sonra 1.5 g drog alınarak soğuk suya konur. Kaynayınca kadar ısıtılır. 10 dk. bekletildikten sonra süzülür. Günde bir kaç defa içilir.

#### Uygulama biçimi:

Parçalanmış bitki, toz edilmiş bitki, sıvı veya kuru ekstresi ve diğer galenik preparatları; dahili ve harici kullanım için sıvı ve katı formları; diğer sedatif ve/veya karminatif bitkilerle kombinasyonu yararlı olabilmektedir.

### 2.4.2. Dozaj

Kapsülleri: 395 mg

Kuru ekstresi: 4:1 – 6:1 etanolla veya saf suyla

Depolama: Sıkı kapalı, plastik olmayan muhafaza kaplarında, ışıktan ve nemden korunarak 1 yıla kadar depolanabilir (19).

### Yetişkin dozu

#### Oral kullanım

- Kurutulmuş herba: günlük 1.5 - 4.5 g drog infüzyon şeklinde günde birkaç kez (55)
- İnfüzyon: 2-3 g drogdan hazırlanan infüzyon günde 2-3 kez.
- Tentür: % 45 alkolde 1:5 oranında, günde 3 kez 2-6 ml (8)

#### Topikal kullanım

- Aktif viral herpes alevlenmelerinin tedavisinde: % 1 standart 70:1 ekstre içeren krem günde 4 defa.
- Aktif viral herpes alevlenmelerinin profilaksisinde: % 1 oranında liyofilize su ekstresi (70:1) içeren krem günde 2 kez (8).

### Pediyatrik doz

Uykusuzluk veya fonksiyonel gastrointestinal bozukluklar için infüzyon: 1 çorba kaşığı parçalanmış melisa yaprağı 150 ml kaynamış suda 10 dakika bekletilir, soğutulur ve süzülür. Veya her fincan çay için 1.5 - 4.5 g (2-3 çay kaşığı) herba, gün içinde birkaç kez içilebilir.

Standardize preparatlar: Lomaherpan<sup>®</sup> (Avrupa)

Herpilyn<sup>®</sup> (US)

Bitkisel kombinasyonlardaki doz: Değişkendir (17).

### **2.4.3. Halk İlacı Olarak Kullanılışı**

*M. officinalis* geleneksel olarak iki bin yıldan fazla zamandır hafıza zayıflıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (13). *M. officinalis*'in ilk kullanımı Eski Yunan ve Roma devirlerine dayanır. Bu zamanlarda yatıştırıcı, terletici, adet söktürücü ve gaz giderici özelliklerinden dolayı uyku bozuklukları, huzursuzluk, depresyon, nevralsi, migren,

mide bulantısı, iştahsızlık, öksürük, menstrual düzensizlik, baş ağrısı, sinirsel mide rahatsızlıkları, kalp hastalıkları, sinirsel çarpıntı ve yüksek tansiyon tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca haricen yaralar, deri tahrişleri ve böcek ısırıklarının tedavisinde faydalanılmıştır (18).

*M. officinalis* bitkisinin ülkemizin değişik şehir ve yörelerindeki halk ilacı olarak kullanılışları aşağıda tablo şeklinde verilmiştir.

**Tablo 5. *Melissa officinalis* bitkisinin halk arasındaki kullanımı**

<b>Kullanılış</b>	<b>Kullanılan kısım</b>	<b>Hazırlanma şekli</b>	<b>Şehir/Yöre</b>	<b>Yöresel ismi</b>	<b>Kaynak</b>
Kalp hastalıkları, Diyabet	Toprak üstü	Dekoksiyon 2x1 çay fincanı	Kırklareli/Vize	Oğul otu Arı otu	4
Kanser, Astım	Toprak üstü	İnfüzyon 2x1 çay fincanı	Kırklareli/Merkez	Oğul otu Arı otu	4
Nefes darlığı	Toprak üstü	İnfüzyon	Tekirdağ/Malkara/ Kozyörük	Oğul otu	4
Sedatif etki	Yaprak	İnfüzyon (çay olarak)	Yalova	limon otu, oğul otu	56
Kalp hastalıkları	Toprak üstü	İnfüzyon 2x1 çay fincanı	Kırklareli, Demirköy	Oğul otu Arı otu	4
Böbrek iltihabı, mide, kalp ve bağırsak hastalıkları	Toprak üstü	Dekoksiyon 2x1 çay fincanı	Kırklareli, Demirköy	Oğul otu Arı otu	4
Bağırsak hastalıkları (enteritis)	Toprak üstü	Dekoksiyon 2x1 çay fincanı	Kırklareli, Kofçaz	Oğul otu Arı otu	4
Hafıza kuvvetlendirici, Soğuk algınlığı, Nezle, Grip, Akciğer hastalığı	Toprak üstü	Dekoksiyon 2x1 çay fincanı	Kırklareli, Pınarhisar	Oğul otu Arı otu	4
Şeker düşürücü ve damar açıcı	Çiçekli herba	İnfüzyon	Gediz (Kütahya)	Oğul otu (Muz çiçeği)	57

**Tablo 6. *Melissa officinalis* bitkisinin halk arasındaki kullanımı (devam)**

<b>Kullanılış</b>	<b>Kullanılan kısım</b>	<b>Hazırlanma şekli</b>	<b>Şehir/Yöre</b>	<b>Yöresel ismi</b>	<b>Kaynak</b>
Kalp hastalığı, Böbrek (nefrit), mide	Toprak üstü	Dekoksasyon 2x1 çay fincanı	Kırklareli, Demirköy	Oğul otu Arı otu	4
Öksürük	Toprak üstü	Kurutulup balla karıştırılıp yenir.	Tekirdağ, Malkara	Oğul otu	4
Mide rahatsızlığı	Toprak üstü	İnfüzyon (papatya, <i>Anthemis chia</i> , ile hazırlanan)	Tekirdağ, Malkara	Oğul otu	4
Astım, damar tıkanıklığı	Toprak üstü	İnfüzyon+ şeker	İstanbul, Şile	Oğul otu, Yalancı ısırgan	58
Damar sertliği	Toprak üstü	Dekoksasyon+ limon suyu+aspirin	İstanbul, Şile	Oğul otu, Yalancı ısırgan	58
Astım	Yaprak	Ezilip balla karıştırılarak yenir	Balıkesir, Gönen	Oğul otu, Beyaz çiçekli oğul otu	59

Adana ve Mersin yöresindeki aktarlarda yapılan bir araştırmada *M. officinalis* bitkisinin yapraklarının limon otu, oğul otu, turuncu bila gibi isimlerle dekoksasyonu veya infüzyonu hazırlanarak iltihap söktürücü, terletici, gaz giderici, gevşetici, yatıştırıcı, hazmı kolaylaştırıcı, alerjiye karşı olarak veya kalp-damar hastalıkları ile sara rahatsızlığının tedavisinde kullanımının önerildiği tespit edilmiştir (60).

Tekirdağ ve çevresindeki aktarlarda satılan *M. officinalis* bitkisinin oğul otu, melisa otu, limon nanesi, kovan otu gibi yöresel isimlerle kalp hastalıkları, astım ve nefes darlığı hastalıklarında dahilen kullanımı önerilmektedir. Ayrıca balgam söktürücü, gaz giderici, hazmı kolaylaştırıcı, hıçkırık kesici ve uykusuzluklarda yatıştırıcı etkileri nedeniyle dahilen, romatizmaya karşı ise haricen taze ve kurutulmuş yaprakları aktarlarda satılmaktadır (61).

*M. officinalis*'in ülkemizin dışındaki halk arasındaki kullanımına baktığımızda aşağıda adı geçen ülkelerde kullanım alanı kısaca özetlenmiştir:

Avrupa'da *M. officinalis* subsp. *officinalis* yaprakları aromatik, dijestif ve antispazmodik özellikleri sayesinde sinirsel uyku bozukluklarında ve işlevsel mide-bağırsak rahatsızlıklarında bitkisel çay olarak yaygın bir kullanılışa sahiptir (14). Aromatik bir bitki olan *M. officinalis*, Yunanistan'da halk ilacı olarak soğuk algınlığına karşı ve dolaşımdaki fonksiyonel bozukluklarda kullanılmaktadır (6).

Lübnan'daki aktarlar, *M. officinalis* yapraklarını migren ve mide hastalıklarının tedavisinde, kalbi güçlendirmek ve hafızayı kuvvetlendirmek amacıyla önermektedirler (62).

Danimarka'da sinirsel gerginlik ve üzüntünün neden olduğu uykusuzluğun tedavisinde halk arasında kullanılmaktadır (63).

## **2.5. YPİTK (Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi)**

Karmaşık yapıdaki bitkisel drogların ve bitkisel ürünlerin taşıdığı kimyasal bileşiklerin yapıları tam olarak bilinmemektedir. Çeşitli nedenlerden dolayı drogların içermiş oldukları bileşikler kalitatif ve kantitatif olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Drogların bilinen aktif bileşiklerinin veya işaretleyici maddelerinin kantitatif analizi kalite açısından yeterli olmayıp bazen diğer bileşenlerin de belirlenmiş olması gerekebilmektedir. Birçok bitkisel drogun kimyasal bileşenleri ayrıntılı olarak araştırılmadığı için bu drogların kalite analizlerinde kullanılacak referans bileşik veya bileşiklere ulaşılamamaktadır. Bu gibi durumlarda kromatografik parmak izine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeplerden dolayı, bileşikleri ayrıntılı tanımlamayı sağlayan yüksek çözünürlüğe sahip kromatografik sistemler ile kombine edilmiş teşhis sistemleri (GK-KS, YPSK/NMR, YPSK/DAD/MS ve YPİTK) oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu tekniklerden YPİTK çeşitli avantajlarından dolayı son yıllarda birçok araştırma laboratuvarında yerini almaya başlamıştır (64).

### **YPİTK Avantajları:**

- Analiz süresi kısadır. Birden fazla örnek aynı plak üzerinde kolay bir şekilde karşılaştırılabilir.
- Ekstrelerin parmak izi analizinde sıkça kullanılır. Bazı bileşiklerin hareketli faz ile bitiş noktasına sürüklenmesi veya bazı bileşiklerin uygulama noktasında kalması herhangi bir soruna neden olmaz.
- Teşhis esnekliği, kromatografiyi tekrarlamadan farklı teşhislerin yapılabilmesi, uygun reaktiflerle renklendirmeye olanak sağlanabilmesi, özellikle parmak izi analizlerinde önem taşımaktadır. Diğer taraftan YPİTK sonuçları sadece pikler ile ifade edilmeyip aynı zamanda kromatogramın renkli görüntüsüne de olanak sağlamaktadır.
- Diğer kromatografik yöntemlerle kıyaslandığında YPİTK tanımlama deneyleri arasında hızlı, kolay ve esnek olması nedeniyle ideal bir yöntemdir. Örneklerin ve referans materyal aynı plak üzerine uygulanabilir. Karmaşık örneklerin birçok bilinmeyen bileşikleri paralel olarak araştırılabilir ve aynı plakta karakteristik lekelerle çoklu belirleme yöntemi uygulanabilir. KS ve YPSK yöntemlerine kıyasla YPİTK daha düşük çözünürlük göstermesine rağmen örnekler arasındaki farklılığı belirlemek için yeterince hassas bir yöntemdir.

Başarılı bir YPİTK analizi için ilk ve en önemli basamak, karışımdaki bileşiklerin ayrımının sağlandığı uygun bir yöntem geliştirmedir. Daha sonra bu yöntem, doğal değişkenliğin değerlendirilmesi için yapılan çok sayıda analizlere de uygulanabilir (64).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

Araştırmamızda kullanmış olduğumuz bitkisel materyal (D), Temmuz 2007’de Kocaeli, Yuvacık barajı çevresinden toplanmıştır. Bitkisel materyale ait herbaryum örneği Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Herbaryumunda saklanmaktadır (Akaydın, 9369).

Çalışmamızda kullanılan diğer materyal (K) ise Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği’nden temin edilmiştir. *Melissa officinalis* L. var. *officinalis*’e ait bitki tohumları Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tıbbi ve Aromatik Çiftliği’nde önce seralarda fide yapılmış ve daha sonra “İyi Tarım Teknikleri”ne uygun olarak çiftlik alanı içinde kontrollü koşullarda kültürü yapılmıştır. Tohumlar, nisan ayında 60 x 30 cm aralıkta tarlaya ekilmiştir. Bitkinin yetiştirme döneminde (mart-ekim) Konya bölgesine düşen yağış miktarı yeterli olmadığından yağmur suyundan suni sulama yapılmıştır. Verimi arttırmak için tam yanmış organik gübre (sığır gübresi) besin maddesi olarak kullanılmıştır. Bitki yetiştirilirken sentetik kökenli bitki besin elementi (kimyasal gübre) ve bitki koruma ilacı kullanılmamıştır. Bitkinin yetiştirilmesi dönemi boyunca organik kökenli gübreler kullanılmış ve bitkinin ihtiyaç duyduğu dönemlerde sulama yapılmıştır. Bitkiler haziran ayı içerisinde bitki çiçeklenme döneminde herba hasadı yapılmış ve gölge bir alanda oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan bitkiler, analizler yapıncaya kadar oda sıcaklığında, kağıt ambalaj içinde materyal depolarında saklanmıştır. Bitki herbaryum örnekleri Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hayri Duman tarafından teşhis edilmiş olup, S.Ü. Ziraat Fakültesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Herbaryumu’nda saklanmaktadır (TAB-11).

Avrupa Farmakopesi 6.0 Monografi analizlerinde kullanılan cihazlar ve solvanlar yapılan analizlere göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir.

##### 3.1.1. Makroskobik İnceleme

Binoküler lup: Stemi DV4/DR Carl Zeiss

### **3.1.2. Mikroskopik İnceleme**

Mikroskop: Nikon E200

İnceleme ortamı: Kloral hidrat çözeltisi

### **3.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi**

Kromatografi plakları: Merck, 20x20, No.616613 Silika jel 60 ile kaplı DC TLC alüminyum tabakalar

UV lambası (366 nm ve 254 nm )

Kromatografi tankı: 20x20x9

Pasteur pipeti

Sitral R Lot.456490/1

Sitronellal R Lot.0001427092

### **3.1.4. Kurutmada Kayıp**

Tartım kapları: 45 mm çapında 30 ml hacminde porselen kapsüller

100-105<sup>0</sup>C'e ayarlanmış etüv

### **3.1.5. Bütün Kül Tayini**

Krozeler: Haldenwanger, porselen, 30 ml hacimli krozeler

Etüv

Kül fırını

### **3.1.6. Spektrofotometrik Analiz**

Agilent 8453 UV Spektrofotometre



### 3.1.7. YPİTK

Materyal D ve K örnekleridir. Referans bileşik olarak kullanılan rozmarinik asit laboratuvarlarımızda bir başka Lamiaceae bitkisi olan *Lavandula stoechas*'tan izole edilmiş ve yapısı spektroskopik teknikler (NMR ve KS) kullanılarak tayin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar ve çözücüler YPSK kalitesindedir.

#### CAMAG HPTLC SİSTEMİ

Linomat 5: Referans ve örneklerin tatbiki

Automated Multiple Development AMD 2: Plakaların sürüklenmesi için

TLC Scanner 3: Belirlenen lekelerin değerlendirilmesi

HABAŞ Yüksek saflıkta azot gazı (% 99.9 saflıkta, 15 kg)

Yazılım: winCATS

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Avrupa Farmakopesi (cilt 2) 6. Baskı Monografi (65)

MELİSA YAPRAĞI (Melissae folium)

#### TANIM

Melisa yaprağı, *Melissa officinalis* L. türünün kurutulmuş yapraklarından oluşur. Kurutulmuş drog, rozmarinik asit (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>; MA<sub>360.3</sub>) üzerinden hesaplanmış en az % 4 total hidroksisinnamik türevleri içerir.

#### KARAKTERLERİ

Melisa yaprağının limonu andıran kokusu vardır.

Makroskobik ve mikroskobik karakterleri A ve B teşhis testleri adı altında tarif edilir.

#### TEŞHİS

A. Melisa yaprağı değişen uzunluklarda yaprak sapına sahip, oval, kordat ve yaklaşık 8 cm'e kadar uzunluğunda ve 5 cm genişliğindedir. Lamina ince ve alt yüzeyde bariz bir şekilde yükselmiş, ağsı damarlanma; kenarları aşağı yukarı dentat veya krenat. Üst yüzey parlak yeşil ve alt yüzey daha açık renkte.

B. Toz haline getirilir (355). Toz yeşilimsi renktedir. Mikroskop altında *kloral hidrat solusyonu R* ile incelendiğinde şu karakteristik özellikleri gösterir: Sinuat duvarlı yaprak epidermasına ait parçalar; ince damarlı kutikulalı kısa, düz, tek hücreli, konik şeklinde örtü tüyleri; uçları sivri ve kalın, çok hücreli, bir sıralı örtü tüyleri, kabarcıklı kütiküller; Lamiaceae tipi sekiz hücreli salgı tüyleri; tek hücreliden üç hücreliye kadar saplı ve tek hücreli veya nadiren iki hücreli başlı salgı tüyleri; sadece alt yüzeyde diasitik stoma.

C. İnce Tabaka Kromatografisi (2.2.27)

*Test çözeltisi.* 2 g toz drog (355) 250 ml balona alınır ve üzerine 100 ml *su R* eklenir. 1 saat boyunca bitkisel droglardaki uçucu yağların tayini için hazırlanan alette (2.8.12) distile edilir. Aletin dereceli tüp kısmına 0.5 ml *ksilen R* ilave edilir. Distilasyondan sonra organik faz, aletin dereceli tüp kısmından az miktar *ksilen R* yardımıyla 1 ml'lik balona alınır ve aynı solvanla 1 ml'ye seyreltilir.

*Referans çözeltisi.* 1 µl *sitronellal R* ve 10 µl *sitral R* 25 ml *ksilen R* de çözülür.

Plak: *İTK silika jel plak R*

Uygulama: 10 µl referans çözeltisinden ve 20 µl test çözeltisinden bantlar halinde.

Mobil faz: Etil asetat-hekzan (10:90)

Sürüklenme: 15 cm.

Kurutma: Havada.

Renklendirme çözeltisi: *Anisaldehit çözeltisi R*

Bulgular: 100 °C – 105 °C de 10-15 dk. ısıtılır. Gün ışığında lekeler incelenir.

Sonuçlar: Referans çözeltisine ait kromatogramda üç leke görülür. En altta sitrale ait grimsi-mordan mavimsi-mora çift leke, bunların üstünde sitronellale ait gri ve grimsi-mor arası leke bulunur. Test çözeltisine ait kromatogramda referans çözeltisine benzer (aynı pozisyonda ve aynı renkte) lekeler görülür. Ayrıca iki lekenin arasında bir de kırmızımsı mor renkte (epoksikaryofillen) leke yer alır. Bundan başka lekeler de görülebilir.

Plağın üst kısmı	
Sitronellal: Gri ve grimsi-mor Sitral: Grimsi-mor ve mavimsi-mor (iki leke)	Gri ve grimsi-mor (sitronellal) Kırmızımsı-mor (epoksikaryofillen) Grimsi-mor ve mavimsi-mor (sitral)
Referans çözelti	Test çözeltisi

## DENEYLER

**Yabancı Madde (2.8.2):** 20 g drogda en fazla % 10 gövde (1 mm'den fazla çapı olan) ve en fazla % 2 diğer yabancı madde.

**Kurutmada Kayıp (2.2.32):** 1.000 g toz edilmiş droğun (355) 100 °C – 105 °C etüvde 2 saat kurutulması sonucu en fazla % 10 kayıp.

**Bütün Kül (2.4.16):** En fazla % 12

## ANALİZ

*Stok çözeltisi.* 0.2 g toz edilmiş drog (355) üzerine 190 ml alkol (% 50 h/h) R eklenir. Su banyosunda geri çevirici soğutucu altında 30 dk. kaynatılır. Soğumaya bırakılır ve süzülür. Süzüntü 10 ml alkol (% 50 h/h) R ile çalkalanır. Süzüntüler birleştirilir ve 200 ml'lik balon jöjeye alınarak aynı solvan ile 200 ml'ye seyreltilir.

*Test çözeltisi.* Test tübüne alınan 1 ml stok çözeltisine 2 ml 0.5 M hidroklorik asit, 2 ml 10 g sodyum nitrit R ve 10 g sodyum molibdat R 100 ml su R da çözülerek hazırlanan çözeltiden ve 2 ml dilüe sodyum hidroksit çözeltisi R eklenerek 10 ml'ye su R ile seyreltilir ve karıştırılır.

*Denkleştirme çözeltisi.* Başka bir test tübüne 1 ml stok çözeltisinden, 2 ml 0.5 M hidroklorik asit, 2 ml dilüe sodyum hidroksit çözeltisi R alınarak 10 ml'ye su R ile seyreltilir.

Test çözeltisinin absorbanı (2.2.25) 505 nm de denkleştirme çözeltisine karşı hemen ölçülür.

Rozmarinik asit olarak belirtilen toplam hidroksisinnamik türevlerinin yüzde içeriği aşağıdaki formül ile hesaplanır: 505 nm de rosmarinik asitin kendine özgü absorbanı 400 olmalıdır.

$$\frac{Ax5}{m}$$

A = test çözeltisinin 505 nm deki absorbanası

m = deneyde kullanılan maddenin gram cinsinden ağırlığı

## DEPOLAMA

Işıktan korunarak saklanmalıdır.

D ve K örneklerine ait analizler, Avrupa Farmakopesi 6.0 daki 'MELISSA LEAF' monografi esas alınarak yapılmış olup bu analizlerin ayrıntıları aşağıda sunulmuştur.

### **3.2.1.1. Makroskobik İnceleme**

Binoküler lup altında *M. officinalis*'e ait örnekler incelendi.

### **3.2.1.2. Mikroskobik İnceleme**

355 numaralı eleğin delik büyüklüğünden geçecek oranda toz edilmiş örnekler kloral hidrat çözeltisi kullanılarak 10x10 ve 10x40 lık büyütmelemlerde incelendi.

### **3.2.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi**

D ve K toz edilmiş örneklerden ikişer g tartılarak 250 ml'lik balona alındı ve üzerlerine 100 ml distile su eklendi. 1 saat boyunca uçucu yağların tayini için hazırlanan alette distile edildi. Dereceli tüp kısmında 0.5 ml ksilen kullanıldı. Distilasyondan sonra organik faz, aletin dereceli tüp kısmından az miktar ksilen yardımıyla 1 ml'lik balona alındı ve aynı solvanla 1 ml'ye seyreltildi.

Referans çözelti olarak 1 µl sitronellal ve 10 µl sitral 25 ml ksilen içinde çözüldü.

Kromatografi tankının dibinde yaklaşık 1 cm yükseklik olacak şekilde hareketli faz (etil asetat:hekzan 10:90) konuldu. Tankın ağzı kapatılarak 15 dk. doygunluğa ulaşması için beklendi.

Silika jel plağının alt kenarından 1.5 cm uzaklıkta alt kenara paralel 1 cm'lik bantlar halinde tatbik noktaları çizildi. Tatbik noktalarından 15 cm yukarıya paralel bir çizgi çizilerek sürüklenme mesafesi belirlendi. Aralarında 1 cm boşluk olacak şekilde tatbik noktalarına D ve K örneklerinden 10 µl ve standart çözeltisinden 20 µl mikropipet yardımıyla sırasıyla tatbik edildi. İlk tatbik noktası ile plağın sol kenarı ve en son tatbik noktası ile plağın sağ kenarı arasında yaklaşık birer cm boşluk bırakıldı.

Tatbik işlemi bittikten sonra plak kurumaya bırakıldı. Plak tamamen kuruduktan sonra tatbik noktaları hareketli faza değmeyecek şekilde tankın içine dik bir şekilde yerleştirildi. Tankın kapağı kapatılarak oda sıcaklığında hareketli fazın sürüklenme mesafesine kadar ilerlemesi beklendi.

Plak tanktan alındıktan sonra oda ısısında kurutuldu. Çeker ocak altında vanilin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (% 1) çözeltisi R püskürtüldü ve 100 °C'lik etüvde 5 dk. bekletildi. Lekeler çıplak gözle, 254 nm ve 366 nm dalga boyunda UV ışık altında incelendi.

#### **3.2.1.4. Kurutmada Kayıp (2.2.32)**

Tartım kapları 100 °C – 105 °C etüvde 2 saat bekletilerek desikatörde sabit vezne gelmesi için soğutuldu. Darası alınan cam kaplara toz edilmiş *M. officinalis* kültür ve doğal formlarının her birinden üçer örnek olacak şekilde 1.000 g tartıldı. 100 °C – 105 °C etüvde 2 saat kurutulması sonucu desikatöre alınarak sabit vezne getirilerek tekrar hassas terazide tartım alındı. Tartım değerlerinin ortalamaları alınarak yüzde değerleri hesaplandı. Monografta yer alan; 1.000 g toz edilmiş droğun (355) 100 °C – 105 °C etüvde 2 saat kurutulması sonucu en fazla % 10 kayıp şartına uygunluğu değerlendirildi.

#### **3.2.1.5. Bütün Kül (2.4.16)**

Krozeler 600 °C'lik kül fırınında yarım saat kırmızılığa gelinceye kadar bekletildikten sonra desikatöre alınarak sabit vezne gelmesi sağlandı. Sabit vezne getirilen krozelerin darası alınarak toz edilmiş *M. officinalis* kültür ve doğal formlarının her birinden üçer örnek olacak şekilde 1.000 g tartıldı. 600 °C'lik kül fırınında tamamen kül oluncaya kadar yakıldı. Yakma işlemi bittikten sonra krozeler desikatöre alınarak sabit vezne getirildi ve tekrar tartılarak yüzde değerleri hesaplandı. Farmakopeye göre,

yakma işlemi sırasında kül olarak kalan inorganik kirliliklerin en fazla % 12 olması gerekmektedir.

### 3.2.1.6. Spektrofotometrik Analiz (2.2.25)

Stok çözeltisi: *M.officinalis* bitkisinin kültür ve doğal formlarından 0.2 g tartılarak 250 ml lik balonlara aktarıldı. Üzerlerine 190 ml alkol (% 50 h/h) ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 30 dk. ısıtıldı ve sonra soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra her iki örnek pileli filtre kâğıdından ayrı ayrı süzüldü. 200 ml lik balon jöjelere alınan süzüntüler 200 ml'e alkol (% 50 h/h) ile tamamlandı.

Test çözeltisi: Deney tübüne alınan 1 ml stok çözeltisine 2 ml 0.5 M hidroklorik asit, 2 ml 10 g sodyum nitrit R ve 10 g sodyum molibdat R 100 ml su R da çözülerek hazırlanan çözeltiden ve 2 ml dilüe sodyum hidroksit çözeltisi R eklenerek 10 ml'ye su R ile seyreltildi ve karıştırıldı.

Denkleştirme çözeltisi: Başka bir deney tübüne 1 ml stok çözeltisinden, 2 ml 0.5 M hidroklorik asit, 2 ml dilüe sodyum hidroksit çözeltisi R alınarak 10 ml'ye su R ile seyreltildi.

Test çözeltisinin absorbansı 505 nm de denkleştirme çözeltisi ile karşılaştırılarak hemen ölçüldü.

Rozmarinik asit üzerinden belirtilen toplam hidroksisinnamik türevlerinin yüzde değeri (% 4 ten az olmamalı) hesaplandı.

### 3.2.2. YPİTK

#### Ekstraksiyon

Açık havada, gölgede kurutulmuş ve toz edilmiş doğadan toplanmış (D) ve kültüre alınmış (K) *Melissa officinalis* yaprakları (her bir örnek 1 gram) MeOH (10 ml) ile 45 °C de 2 saat boyunca rotavaporda ekstre edilmiş ve süzülmüştür. MeOH ekstreleri düşük basınç altında rotavaporda kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. Ekstreler su içinde çözülerek liyofilize edilmiştir (D: 0.297 g, verim % 29.6; K: 0.268 g, verim % 26.7).

### **Standart Çözeltinin Hazırlanması**

Stok standart çözelti, 3 mg referans bileşiğin (rozmarinik asit) 3 ml metanolde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Stok çözeltinin 50 µl'si 1 ml'ye metanol ile seyreltilerek 50 µl/ml konsantrasyonunda çözelti elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi hazırlamak için referans bileşik 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 12 µl, 15 µl olmak üzere altı ayrı hacimde YPİTK plağına tatbik edilmiştir.

### **Örneklerin Hazırlanması**

Liyofilize ekstrelerden (D ve K) hassas terazide beşer mg tam tartım alınarak 10'ar ml metanol içinde çözeltileri (1 mg/2ml) hazırlanmıştır. Örneklerin herbirinden üçer kez olmak üzere sırasıyla 8 µl ve 5 µl tatbik yapılmıştır.

Standart ve örnek çözeltiler 8 mm band uzunluğunda plağına tatbik yapılmıştır.

### **YPİTK Enstrümantasyonu**

Referans ve örnekler HPTLC silika jel 60 F<sub>254</sub> (0,2 mm kalınlığında) alüminyum kaplı plaklar (20x10 cm) üzerine, band şeklinde, Camag mikrolitre şırınga (100 µL) yardımı ile yarı-otomatik Camag Linomat 5 aplikatör kullanılarak ekim yapılmıştır. Lekelerin dansitometrik analizi Camag TLC Scanner 3 cihazında 330 nm'de gerçekleştirilmiştir.

### **Rozmarinik Asitin Belirlenmesi**

YPİTK plakları, hareketli faz çözeltisi, toluen-etil asetat-formik asit (5:4:1), ile doygunluğa ulaşmış CAMAG çift tabanlı cam tanklarda sürüklenmeye bırakılmıştır. Sürüklenme tamamlandıktan sonra kurutulmuş ve lekeler UV ışık altında incelenmiştir. Plakların kantitatif analizi, 330 nm absorbans değerinde, 6.00 x 0.30 mm aralığında, 20 mm/s görüntüleme hızında ve 100 µm/step veri çözünürlüğünde yapılmıştır.

### **Rozmarinik Asit Analizi İçin YPİTK Tekniğı**

YPİTK analizleri süresince değışkenliklerden sakınmak için sabit sıcaklık, doymuş tank, taze hazırlanmış mobil faz ve plaklar gibi birçok önlemler alınmıştır.



Örnekler taze olarak hazırlanmış ve analizler mümkün olduğunca kısa süre içinde tamamlanmıştır. Tatbik işlemlerinden sonra plaklar doygunluğa ulaştırılmış tanka yerleştirilmiş ve sürüklenme bittikten sonra açık havada ve çeker ocak altında kurumaya bırakılmıştır. Kromatogramın danstitometrik analizi 330 nm’de yapılmıştır. Rozmarinik asit konsantrasyonunun pik alanına ait veriler linear regresyon analizine göre ele alınmıştır. Kullanmış olduğumuz yöntem daha önce Ebrahimi ve arkadaşları tarafından bazı *Satureja* türlerinde YPİTK yöntemiyle rozmarinik asit miktar tayini için geliştirilmiş bir yöntem (66) olduğu için validasyon çalışmasına gerek duyulmamıştır. Bununla birlikte, örneklere rozmarinik asit ekleyerek düzeltme çalışması yapılmıştır.

### **Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması**

Rozmarinik asitin kalibrasyon eğrisi 200 – 750 ng konsantrasyon aralığında, rozmarinik asitin stok çözeltisi (50 µg/ml) kullanılarak hazırlanmıştır.

### **Düzeltilme Çalışmaları**

Yöntemin kesinlik kazanması ve hassasiyetinin belirlenmesi için ilave bir kontrol olarak düzeltme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Düzeltme çalışmaları, doğal formdan hazırlanmış olan ekstreye üç farklı konsantrasyonda rozmarinik asit çözeltisi ilave edilerek ve her analiz üç kez tekrarlanarak yapılmıştır.

### **Rozmarinik Asite Ait Kalibrasyon Eğrisi**

Tüm kalibrasyon eğrileri 200 – 750 ng konsantrasyon aralığında doğrusaldır. Aynı eğimde doğru için tekrarlanabilir değerler, tekniğin valide olduğunu göstermiştir. Doğal ve kültür formlarına ait yapraklarda sırasıyla % 3.4 ve % 7.2 oranında rozmarinik asit tespit edilmiştir.

### **Rozmarinik Asit Analizleri ve Düzeltme Çalışmalarının Sonuçları**

Bu çalışma, *M. officinalis*’in kültür formunun doğal forma göre iki kat daha fazla rozmarinik asit taşıdığını göstermiştir.

## 4. BULGULAR

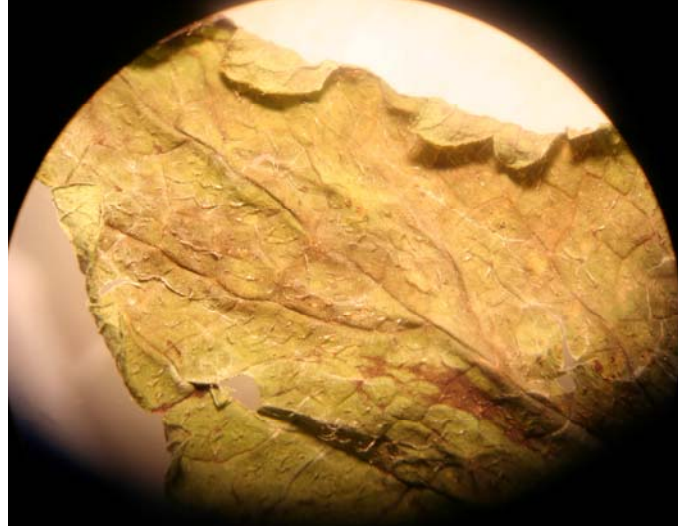
### 4.1.Farmakope Analizleri

#### 4.1.1.Makroskobik incelemeler

Karşılaştırmalı çalıştığımız iki örneğe ait lup altındaki görüntüler aşağıdaki gibidir:



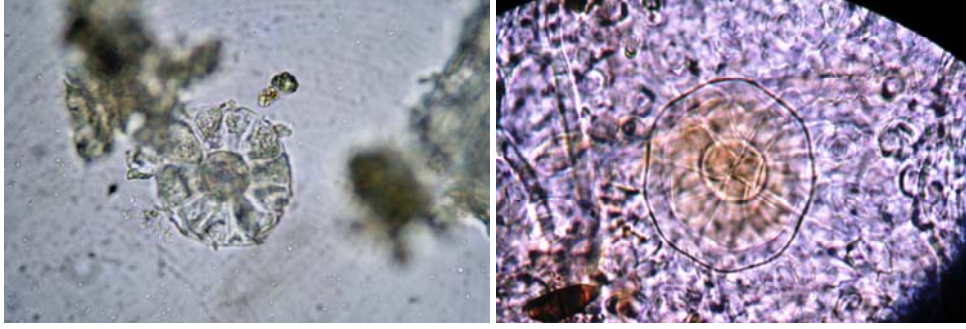
Şekil 2. Binoküler lup altında görünüm (D)



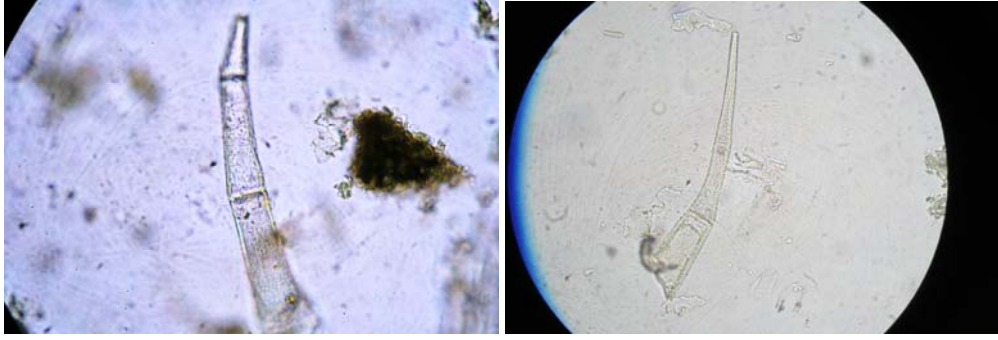
Şekil 3. Binoküler lup altında görünüm (K)

#### 4.1.2. Mikroskopik incelemeler

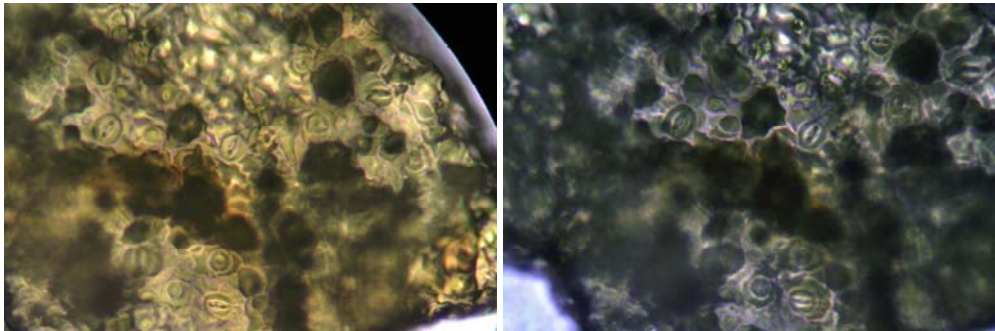
Mikroskop altında yapılmış olan incelemelere ait bulguların fotoğrafları (sırasıyla D ve K örneklerine ait mikroskop görüntüleri) aşağıda verilmiştir.



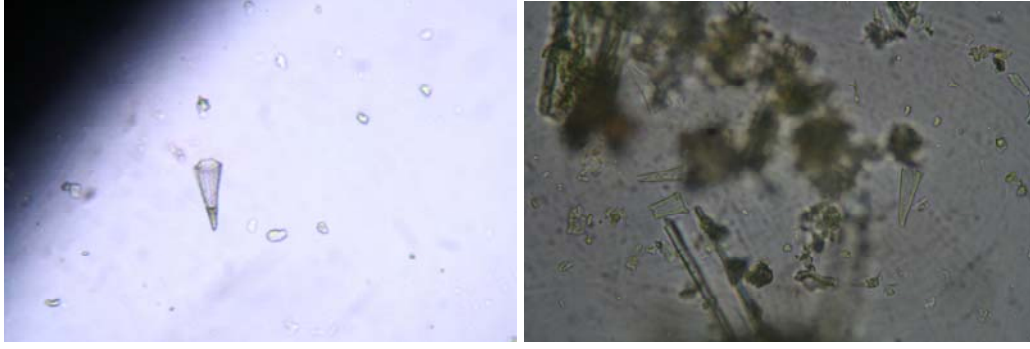
Şekil 4. Lamiaceae tipi salgı tüyü (D) ve (K)



Şekil 5. Çok hücreli örtü tüyü (D) ve (K)



Şekil 6. Epidermada stoma ve komşu hücreleri (D) ve (K)



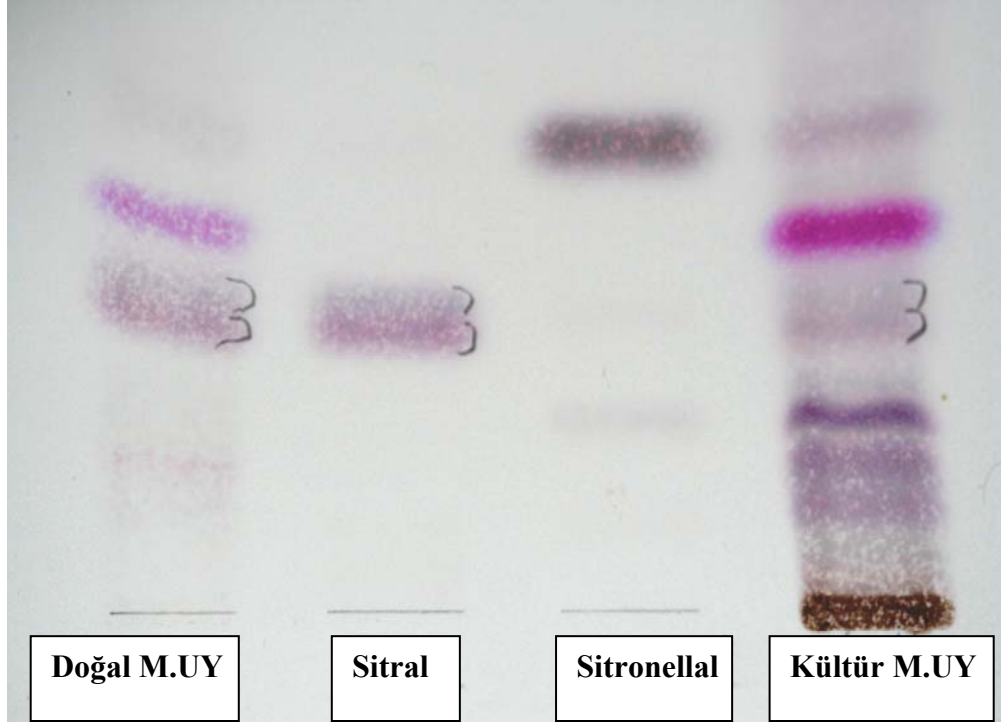
Şekil 7. Boydan görünüşte diş tüyler (D) ve (K)

#### 4.1.3. İnce Tabaka Kromatografisi

Sonuçlar Avrupa Farmakopesi 6.0 da belirtildiği gibi aşağıda tablo halinde verilmiştir.

Tablo 7. Uçucu yağların İTK kromatogramının şematik olarak gösterilmesi

Plâğın üst kısmı		
<b>Gri ve grimsi-mor (Sitronellal)</b>	Gri ve grimsi-mor (çok belirgin değil)	Gri ve grimsi-mor (daha belirgin)
	Kırmızımsı-mor (epoksikaryofillen, belirgin)	Kırmızımsı-mor (epoksikaryofillen, belirgin)
<b>Grimsi-mor ve mavimsi-mor (Sital)</b>	Grimsi-mor ve mavimsi-mor (Belirgin 2 leke)	Grimsi-mor ve mavimsi-mor (Belirgin 2 leke)
<b>Referans çözelti</b>	<b>Doğal Melisa</b>	<b>Kültür Melisa</b>



Şekil 8. Görünür ışıktaki uçucu yağların ve standartların İTK kromatogramı (Revelatör: Vanilin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (M.UY: *Melissa officinalis* uçucu yağı)

#### 4.1.4. Deneyler

Tablo 8. Farmakope Analizine ait deney sonuçları

	İstenen	Doğal Melisa	Kültür Melisa
<b>Kurutmada kayıp</b>	< % 10	% 8.1	% 8
<b>Bütün kül</b>	< % 12	% 10	% 12
<b>Yabancı madde</b>	-	-	-
<b>UV Spektroskopisi (% hidroksisinnamik asit)</b>	> % 4	% 10.12	% 8.45

## 4.2. YPİTK

Referans bileşik: Rozmarinik asit

R<sub>f</sub>: 0.41

Regresyon denklemi:  $y = 233,6 + 12,87x$

r<sup>2</sup>: 0.9945

Standart sapma (%): 4.76

### Analiz sonuçları

Örneklerdeki rozmarinik asit teşhisleri, referans bileşik ile ekstrelerde bu bileşik ile aynı R<sub>f</sub> değerine sahip olan lekenin UV spektrumlarının üst üste çakıştırılması suretiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 9). Kromatogramlara ait iki boyutlu (Şekil 11) ve üç boyutlu (Şekil 12) şekiller aşağıda verilmiştir. D ve K örneklerine ait rozmarinik asit oranları sırasıyla % 3.4 ve 7.2 olarak hesaplanmıştır.

### Rozmarinik Asite Ait Kalibrasyon Eğrisi

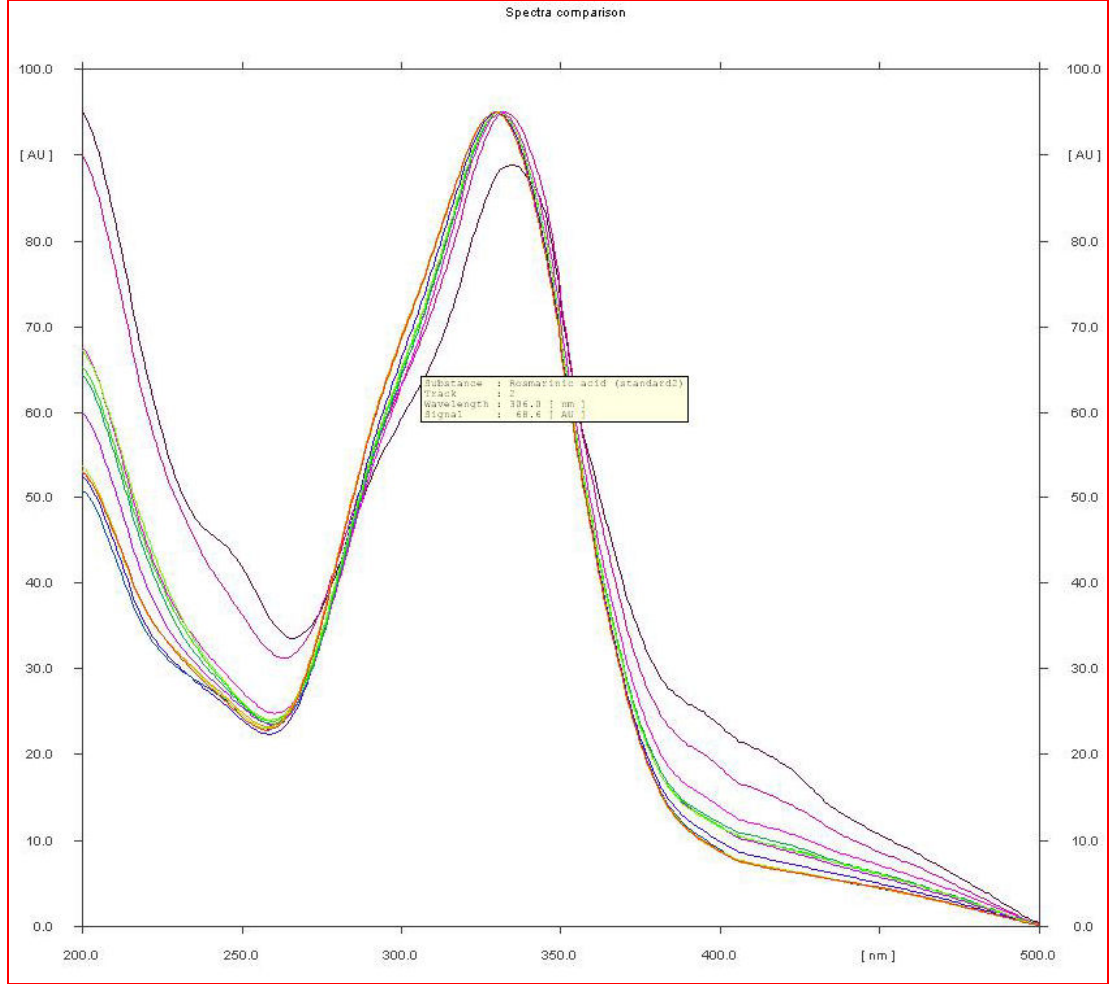
Rozmarinik asite ait kalibrasyon eğrisi 200 – 750 ng konsantrasyon aralığında doğrusaldır (Şekil 10). Aynı eğimde doğru için tekrarlanabilir değerler, tekniğin valide olduğunu göstermiştir.

### Düzeltilme çalışmaları

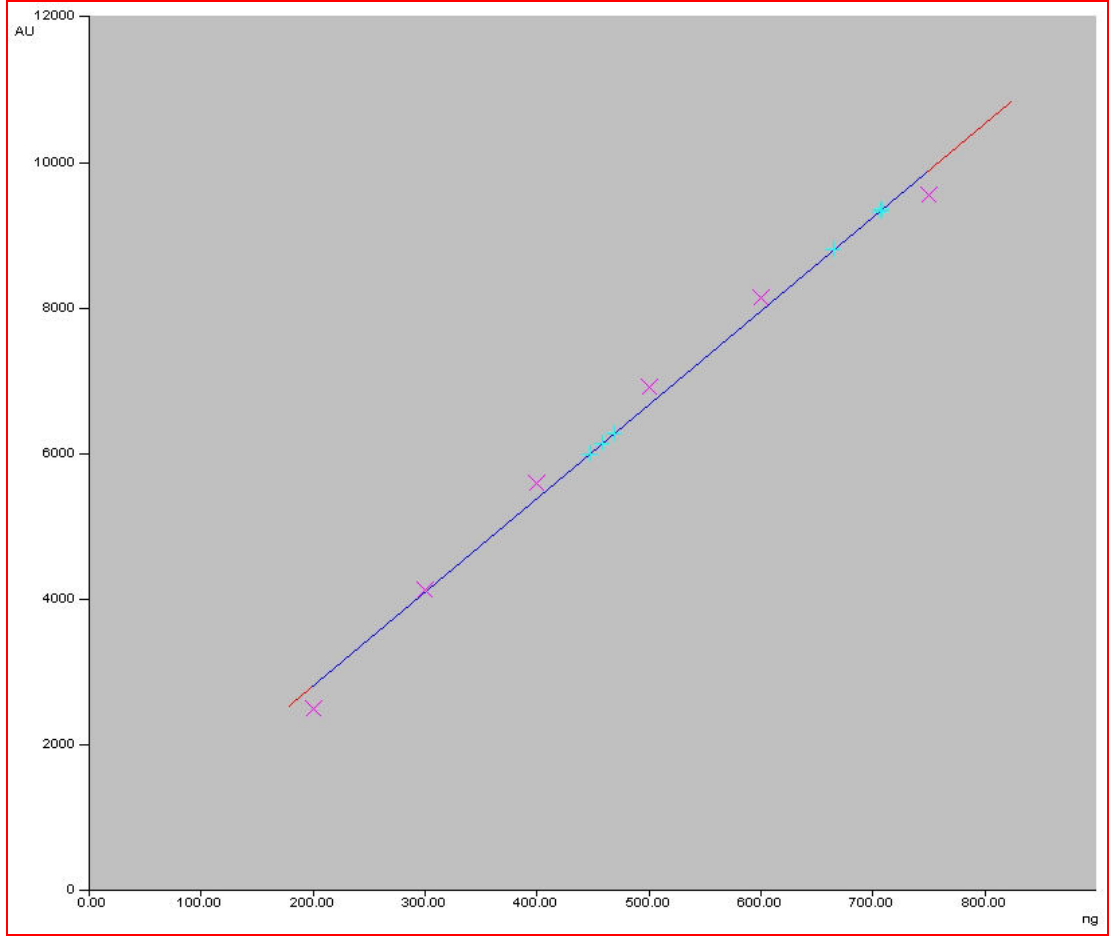
Tablo 9. Düzeltilme çalışmalarına ait bulgular

Ekstredeki RA (ng)	Eklenen RA (ng)	Bulunan RA (ng)	Düzeltilme (%)
323.8	125	438.6	97.59
323.8	62.5	378.6	98.00
323.8	31.2	379.3	106.8

RA: Rozmarinik asit

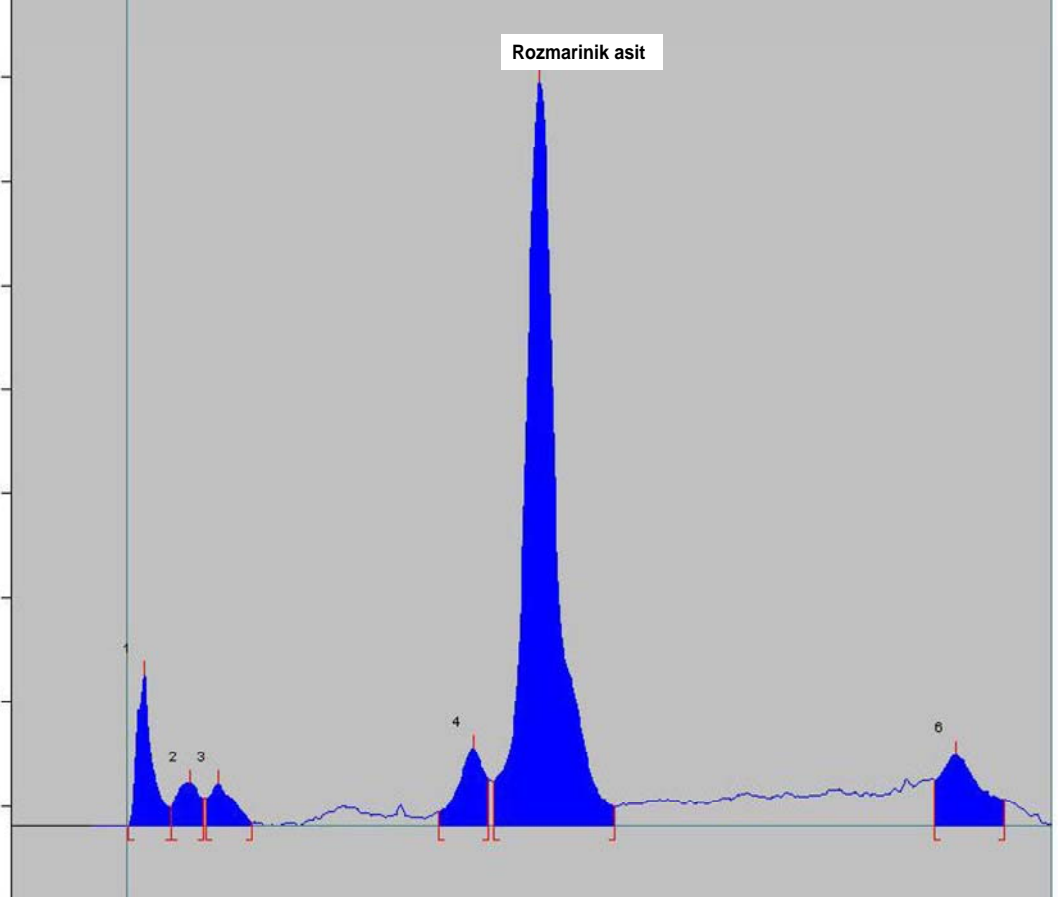


**Şekil 9. Referans rozmarinik asit ve örneklerdeki rozmarinik asitlerin UV spektrumlarının karşılaştırılması (CAMAG Scanner)**

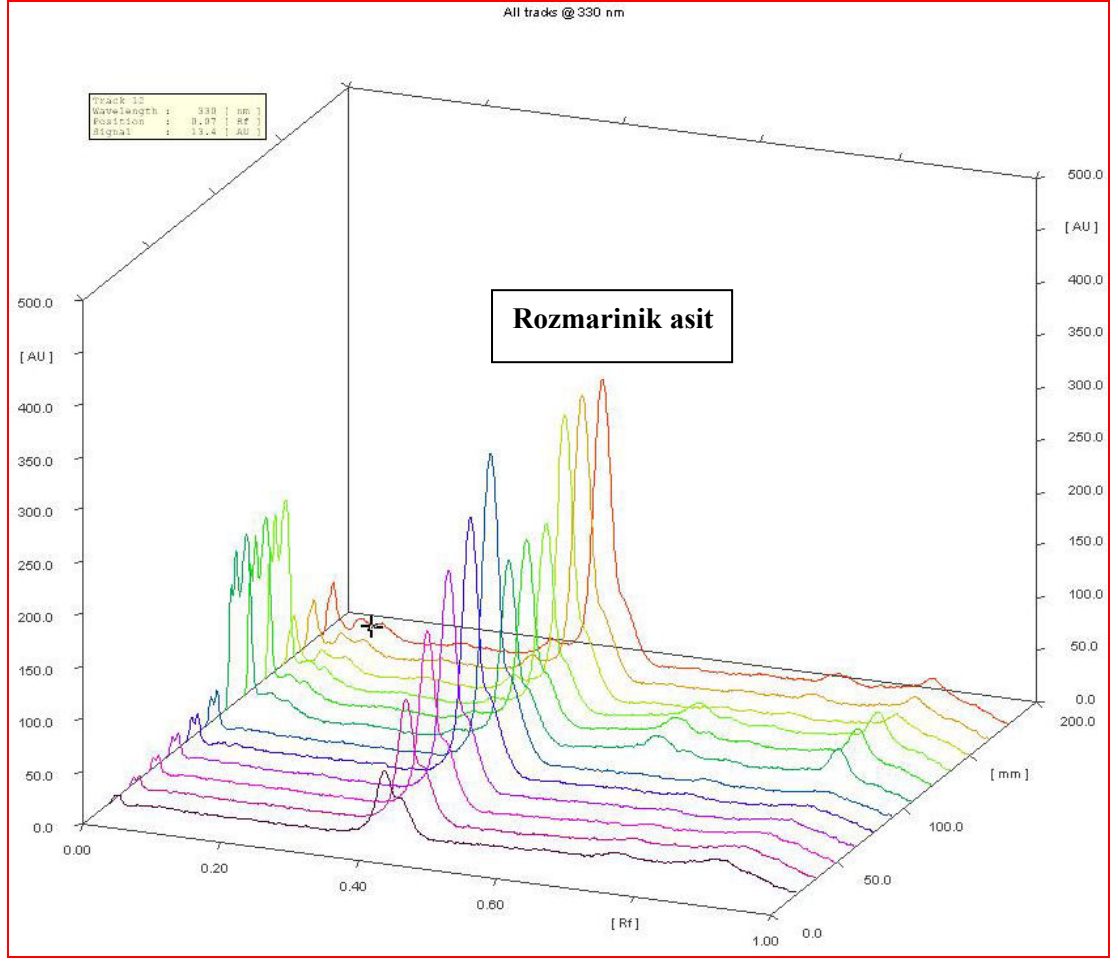


**Şekil 10. Rozmarinik asitin kalibrasyon eğrisi**





**Şekil 11. K örneğine ait iki boyutlu YPİTK kromatogramı (330 nm)**



Şekil 12. Referans ve örneklere ait üç boyutlu YPİTK kromatogramı (330 nm)

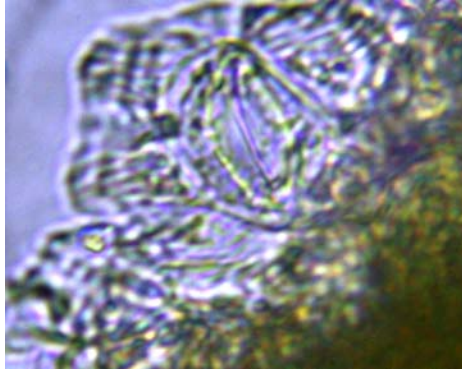
### 4.3. *Verbena officinalis*'e (aktar örneği) Ait Bulgular

#### 4.3.1. Makroskobik İncelemeler

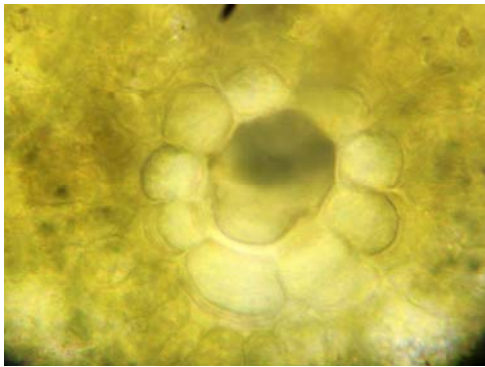


Şekil 13. *Verbena officinalis*'e ait makroskobik inceleme

#### 4.3.2. Mikroskobik İncelemeler



Şekil 14. Anomastik stoma

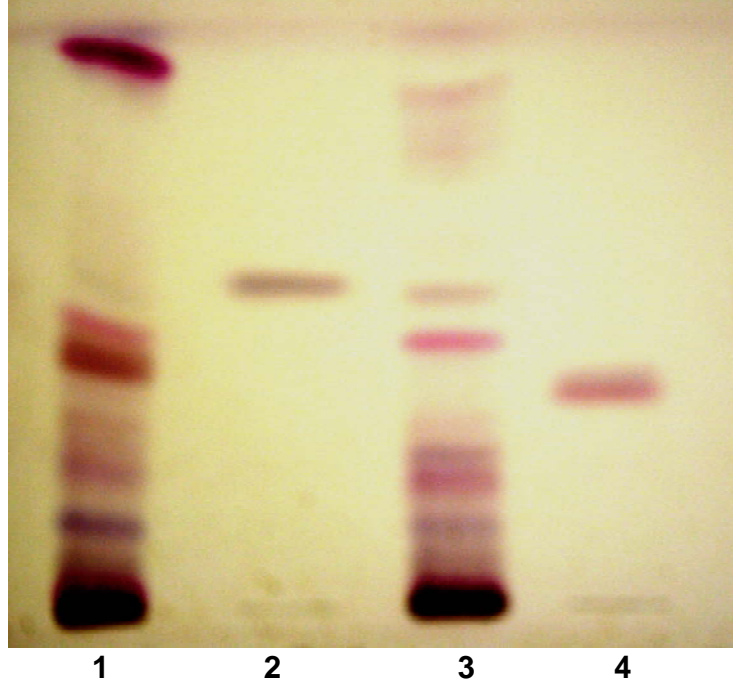


Şekil 15. Salgı tüyü

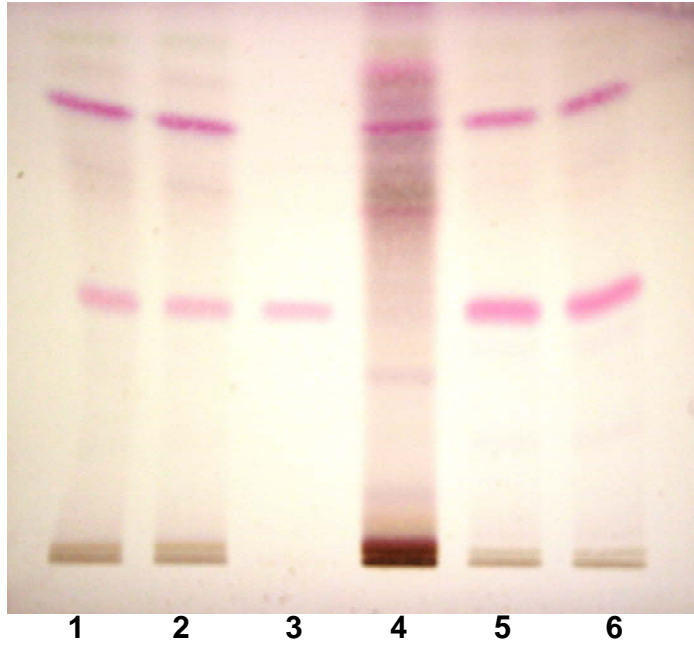


Şekil 16. Tek hücreli örtü tüyü

### 4.3.3. İnce Tabaka Kromatografisi



Şekil 177. Referans madde olarak sitral (4) ve sitronellalin (2) uygulandığı İTK plağında doğal *M. officinalis* (1) ile aktar örneğinin (3) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstrelerinin karşılaştırılması. Revelatör: Vanilin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Şekil 188. Referans madde olarak rozmarinik asitin (3) uygulandığı İTK plağında doğal (1, 2) ve kültür (5, 6) *M. officinalis* örneklerinin aktar örneği (4) ile karşılaştırılması. Revelatör: Vanilin/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmamızda, *Melissa officinalis* bitkisinin botanik özellikleri, yaprakların kimyasal bileşimi, biyolojik aktivite çalışmaları ve kullanılışı ile ilgili bilgiler ayrıntılı olarak derlenmiştir. Halk hekimliğinde *M. officinalis*'in en çok gaz giderici, ateş düşürücü, sinirleri yatıştırıcı, kalbi kuvvetlendirici, yorgunluk giderici, uyku getirici, tansiyon düşürücü, damar açıcı, şeker düşürücü ve nefes açıcı olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (4, 56, 57).

*M. officinalis* bitkisinin halk arasındaki tüm bu kullanılışlarının, deneysel çalışmalarla doğruluğu araştırıldığında, tedavi edici etkisi ispatlanan kullanım alanları şunlar olmuştur: Kalp ve damar hastalıkları, mide ve bağırsak sistemi rahatsızlıkları, sinirsel gerginliğe bağlı uykusuzluk, zihinsel işlev yetersizliği (5-8, 11-13, 18, 35, 51, 54) .

*M. officinalis*'in fitoterapide başlıca sedatif amaçla kullanıldığı görülmektedir (7, 8, 12, 13, 18, 54). Gerek *in vitro* gerekse de *in vivo* deneylerle antioksidan ve antienflamatuvar etkileri de ortaya konmuştur (5, 8, 11, 12, 18, 52). Antiviral aktivitesi de son yıllarda önem kazanmış olup, özellikle HIV ve HSV virüs tiplerine karşı *in vivo* ve *in vitro* ortamda gösterdiği etki klinik çalışmalarla da desteklenmiştir (8-10, 12, 18, 42-46). Ayrıca, uçucu yağının antimikrobiyal ve antispazmodik özelliklerinden dolayı haricen solunum sistemi rahatsızlıklarında kullanılabilceği belirtilmiştir (36).

Yapraklar üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar incelendiğinde bitkinin uçucu yağ, flavonoidler, terpenik bileşikler ve hidroksisinnamik asit türevlerini taşıdığı görülmüştür (6, 14-16).

Rozmarinik asit için birçok biyolojik aktivite tanımlanmıştır. Astrenjan, antioksidan, antienflamatuvar, antibakteriyel ve antiviral aktiviteleri bunlardan temel olanlardır. Rozmarinik asit içeren *Melissa officinalis* ekstreleri *Herpes simplex* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Antienflamatuvar etkisinin lipooksigenaz ve siklooksigenaz inhibisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Fenolik bir bileşik olan rozmarinik asit, kozmetik endüstrisinde kullanılan *Rosmarinus officinalis* ve *Sanicula europaea* gibi bitkilerin antioksidan aktivitesine katkıda

bulunmaktadır. Vücuttan atılımı da hızlı ve kolay olan rozmarinik asitin toksisitesi minimum düzeydedir (17).

Deneysel çalışmamızda, doğadan toplanan ve kültüre alınan *M. officinalis* örneklerinin Farmakope analizleri, Avrupa Farmakopesi ‘Melissae folium’ monografında belirtildiği gibi yapılmıştır. Ayrıca, YPİTK yöntemi ile her iki örnekte rozmarinik asit teşhisi ve miktar tayini yapılmıştır. Böylelikle doğadan toplanan materyal ile kültüre alınan materyalin karşılaştırılması mümkün olmuştur. Bu analizlerin sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 10. Doğal ve kültür formlarına ait Farmakope analiz sonuçları**

	<b>Doğal</b>	<b>Kültür</b>
Makroskobik inceleme	Uygun	Uygun
Mikroskobik inceleme	Uygun	Uygun
İTK	Uygun	Uygun
Kurutmada kayıp (en fazla % 10)	% 8.1	% 8
Bütün kül (en fazla % 12)	% 10	% 12
Yabancı Madde (en fazla % 10)	–	–
Rozmarinik asit üzerinden toplam hidrokisisinnamik asit yüzdesi (en az % 4, spektrofotometrik )	% 10.12	% 8.45

Çalışılan örnekler ticari ürünler olmadığı için yabancı madde tayini yapılmamıştır. Her iki örneğe ait makroskobik ve mikroskobik incelemelerde istenen elementler görülmüştür. Kurutmada kayıp deneyindeki örneklerin nem miktarı ve bütün kül tayinindeki kül miktarı istenen değerler arasında bulunmuştur. İTK analizinde K örneğine ait sitral ve sitronellal lekeleri daha belirgin görülmüştür. Elde edilen sitral lekeleri her iki örneğimizin de *M. officinalis* subsp. *officinalis* olduğunu doğrulamıştır.

Sitral tipi aldehitlerin bulunmadığı alt türün ise *M. officinalis* subsp. *altissima* olduğu Dawson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada belirtilmiştir (24). UV spektrometrisinde kültür formunun rozmarinik asit üzerinden toplam hidroksisinnamik asit yüzdesi, doğal forma göre daha yüksek çıkmıştır. Kültür forma ait İTK analiz bulguları ve toplam hidroksisinnamik asit türevi bileşiklerin yüzde değerinin daha iyi olması kültürün başarılı olduğunun bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Farmakope analizlerine ek olarak, çalışmamızda YPİTK yöntemi ile örneklerde rozmarinik asit teşhisi ve miktar tayini de yapılmıştır. YPİTK, hızlı, kıyaslanabilir ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak son yıllarda bitkisel drogların analizinde araştırma laboratuvarlarında yerini almaya başlamıştır (64). Bu amaçla daha önceden bazı Lamiaceae türlerinde rozmarinik asit miktar tayini için kullanılmış olan bir yöntem seçilmiştir (66). Bu yöntemde kullanmış olduğumuz mobil faz olan toluen-etil asetat-formik asit (5:4:1) karışımında rozmarinik asit rezolüsyonu oldukça iyi olmuştur. Bu yöntemde rozmarinik asitin densitometrik olarak tayini 330 nm de yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 200-750 ng aralığında beş farklı konsantrasyonda tatbik yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, doğadan toplanan ve kültüre alınan örneklerde rozmarinik asit yüzdesi sırasıyla % 3.4 ve % 7.2 olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, doğadan toplanan ve kültüre alınmış *M.officinalis* örnekleri Avrupa Farmakopesi 6.0 Monografına uygun bulunmuştur. YPİTK analizi sonucunda kültür formunda *M. officinalis* için belirleyici bir bileşik olan rozmarinik asit miktarı doğal forma göre daha yüksek çıkmıştır. Kültür formunda daha yüksek rozmarinik asit varlığının saptanmış olması, bitki ıslahının önemini bir kez daha ortaya koymuştur. Tıbbi ve aromatik bitkilerde birim alandan elde edilecek etken madde verimi ön plana çıkmaktadır. Çünkü bu bitkilerde asıl kullanılan ve etkili olan kısım o bitkinin bileşimindeki maddeler ve maddelerin kompozisyonlarıdır. Bu bitkilerden daha etkin yararlanılmasını sağlamak için kaliteye önem vermek gerekir. Kalite parametreleri de en iyi şekilde o bitkiyi kültüre alarak sağlanmaktadır. Ülke getirisini arttırmak ve doğal tahribatı azaltmak için özellikle endüstriyel boyutta üretim açısından tıbbi ve aromatik bitkilerin kültüre alınması mutlaka desteklenmelidir.

Çalışmamızda İstanbuldaki bir aktardan ‘Melissa’ adıyla satın alınan bir örneğin morfolojik, mikroskopik ve kromatografik analizler sonucunda *Verbena officinalis*



(Verbenaceae) olduğu saptanmıştır. Bu bitki halk arasında da Melisa olarak bilinmekte olup Melisa yerine yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Verbena officinalis* güçlü limon kokusu nedeniyle *M. officinalis* ile benzerlik göstermektedir. Fakat yaprakların morfolojik ve mikroskopik özelliklerinin *M. officinalis*'ten tamamen farklı olduğu görülmüştür (Tablo 10). *M. officinalis* ile *Verbena officinalis*'in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ve MeOH ekstreleri İTK analizinde standartlar ile karşılaştırıldığında iki bitki arasındaki benzerlikler ve farklar daha açık bir şekilde ortaya koyulmuştur (Şekil 17 ve 18; Tablo 10). Farklardan en belirgin olanı, *Verbena officinalis*'te *M. officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* gibi diğer bazı Lamiaceae türlerinde de görülen rozmarinik asitin varlığına rastlanmamış olmasıdır (Şekil 18).

**Tablo 11. *Verbena officinalis* ile *M. officinalis* morfolojik, mikroskopik ve kromatografik farkları**

		<i>Verbena officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>
Makroskopik özellikler		Yapraklar 4-9 cm, petiolat, damarlı, sert kıllarla kaplı	Yapraklar 2-4 cm, ovat, kuneat, seyrek tüylü
Mikroskopik özellikler		Çok hücreli salgı tüyü, anomositik stoma, tek hücreli örtü tüyü	Lamiaceae tipi salgı tüyü, diasitik stoma, çok hücreli örtü tüyü, dış tüyü
İTK analizi	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ekstresi	Sitronellal (+)	Sitronellal ve sitral (+)
	MeOH ekstresi	Rozmarinik asit (-)	Rozmarinik asit (+)

Bilinmeyen bir örnekte taşış olup olmadığını kolaylıkla tespit edebilmek için laboratuvar ortamında morfolojik, mikroskopik ve kromatografik analizler yapılmıştır. Buna göre, aktardan 'Melisa' diye aldığımız örneğin tamamen farklı bir bitki olduğu tespit edilmiş olup yapılan analizler, bu aktar örneğinin *Verbena officinalis* (Verbenaceae) bitkisine ait olduğunu ortaya koymuştur.

## 6. KAYNAKLAR

1. Mill RR, Melissa L. Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Vol. 7 (Ed. Davis PH)'de University Press, Edingburg, 36 - 264, 1982.
2. Bařer HC. Oğulotu Yapradı (*Melissa officinalis* L.). Bađbahçe (alıntı), 2009. [http://www.ngbb.gen.tr/bagbahce/files/uploads/Bagbahce\\_22-15.pdf](http://www.ngbb.gen.tr/bagbahce/files/uploads/Bagbahce_22-15.pdf)
3. Baytop T. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmiřte ve Bugün). Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, Ankara, s. 307-308,1999.
4. Kùltür ř. Medicinal Plants Used in Kırklareli Province (Turkey). J Ethnopharmacol 111: 341-364, 2007.
5. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. J Agr Food Chem 52: 2485-2489, 2004.
6. Basta A, Tzakou O, Couladis M. Composition of the Leaves Essential Oil of *Melissa officinalis* s.l. from Greece. Flavour Frag J 20: 642-644, 2005.
7. Abuhamdah S, Chazot PL. Lemon Balm and Lavender Herbal Essential Oils: Old and New Ways to Treat. Curr Anaesth Crit Care 19: 221-226, 2008.
8. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
9. Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, Ueba N, Oishi I, Inami R, Yamane M, Nakamura M, Murata H, Nakanishi T. Anti-HIV-1 Activity of Herbs in Labiatae. Biol. Pharm. Bull. 21: 829-833, 1998.
10. Schnitzer P, Schuhmacher A, Astani A, Reichling J. *Melissa officinalis* Oil Infectivity of Enveloped Herpesviruses. Phytomedicine 15: 734-740, 2008.
11. Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G, Djilas S, Tumbas V, Bogdanovic G, Mandic A, Markov S, Cvetkovic D, Canadanovic V. Radical Scavenging, Antibacterial and Antiproliferative Activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. J Med Food 11: 133-143, 2008.
12. Bone K. A Clinical Guide to Blending Liquid Herbs: Herbal Formulations for the Individual Patient. Elsevier. Australia, s. 308-311, 2003.
13. Kennedy DO, Little W, Scholey AB. Attenuation of Laboratory-Induced Stress in Humans After Acute Administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). Psychosom Med 66: 607-613, 2004.

14. Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The Aromatic and Polyphenolic Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) Tea. *Pharmaceutica Actia Helvetiae* 72: 301-305, 1998.
15. Mencherini T, Picerno P, Scesa C, Aquino. Triterpene, Antioxidant and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *J Nat Prod* 70 (12): 1889-1894, 2007.
16. Dastmalchi K, Damien Dorman HJ, Oinonen PP, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. Chemical Composition and In Vitro Antioxidative Activity of a Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Extract. *LWT* 41: 391-400, 2008.
17. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62: 121-125, 2003.
18. Gardiner P. Lemon Balm (*Melissa officinalis*). The Longwood Herbal Task Force (<http://www.mcp.edu/herbal/default.htm>), 2000.
19. Gruenward J, Brendler T, Jaenicke C, Fleming T, editörler. PDR for Herbal Medicines.( 4. baskı) Montvale: Thomsan Medical, syf 514-515, 2007.
20. Kan Y, Kartal M, Arslan S, Altun L, Endes Z. Farklı Dozlarda Uygulanan Organik Gübrenin Oğulotu (*Melissa officinalis* L.) nun Verim ve Kalitesi Üzerine Etkisi. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, Araştırma Sunusu 1: 501-504, 2005.
21. Axtell BL. Minor Oil Crops. Food and Agricultural Services Bulletin No.94, Rome, 1994. (<http://www.fao.org/docrep/x5043E/x5043EOi.htm#Melissa%20officinalis>)
22. Sağlam C, Atakisi I, Turhan H, Kaba S, Arslanoglu F, Onemli F. Effect of Propagation Method, Plant Density and Age on Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Herb and Oil Yield. *New Zeal J Crop Hort* 32: 419-423, 2004.
23. Bağdat RB, Coşge B. The Essential Oil of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Its Components and Using Fields. *J of Fac of Agric OMU* 21 (1): 116-121, 2006.
24. Dawson BSW, Franich RA & Meder R. Essential Oil of *Melissa officinalis* L. subsp. *altissima* (Sibth. et Smith) Arcang. *Flavour Frag J* 3: 167-170, 1988.
25. Sarı AO, Ceylan A. Yield Characteristics and Essential Oil Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Grown in the Aegean Region of Turkey. *Turk J Agric For* 26: 217-224, 2002.
26. Patora J, Majda T, Gora J, Klimek B. Variability in the Content and Composition of Essential Oil from Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Cultivated in Poland. *J. Endocrinol Invest.* Oct. 26 (10): 950-955, 2003.

27. Patora J, Klimek B. Flavonoids From Lemon Balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). **Acta Pol Pharm- Drug Res** 59: 139-143, 2002.
28. Caniova A, Brandsteterova E. HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa officinalis*. *J Liq Chromatogr R T* 24 (17): 2647-2659, 2001.
29. Karasova G, Lehotay J. Chromatographic Determination of Derivatives of p-Hydroxybenzoic Acid in *Melissa officinalis* by HPLC. *J Liq Chromatogr R T* 28: 2421-2431, 2005.
30. Dastmalchi K, Ollilainen V, Lackman P, Gennas GB, Damien HJ, Jarvinen PP, Yli-Kauhahuoma J, Hiltunen R. Acetylcholinesterase Inhibitory Guided Fractionation of *Melissa officinalis* L. *Bioorgan Med Chem* 17: 867-871, 2009.
31. Awad R, Muhammed A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT. Bioassay-guided Fractionation of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Using an In Vitro Measure of GABA Transaminase Activity. *Phytotherapy Res* 23: 1075-1081, 2009.
32. Khayyal MT, El-Ghazaly MA, Kenawy SA, Seif-El-Nasr M, Mahran LG, Kafafi YAH, Okpanyi SN. Anti-ulcerogenic Effect of Some Gastrointestinally Acting Plant Extracts and their Combination. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 51: 545-53, 2001.
33. Reiter M, Brandt W. Relaxant Effects on Tracheal and Ileal Smooth Muscles of the Guinea Pig. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 35: 408-14, 1985. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
34. Anonym. Overview of Comments Received on 'Community Herbal Monograph on *Melissa officinalis* L., Folium'. European Medicines Agency, 2008.
35. Sadrei H, Ghannadi A, Malekshahi K. Relaxant Effect of Essential Oil of *Melissa officinalis* and citral on Rat Ileum Contractions. *Fitoterapia* 74: 445-452, 2003.
36. Suschke U, Sporer F, Schnee J, Geiss HK, Reichling J. Antibacterial and Cytotoxic Activity of *Nepeta cataria* L., *N. cataria* var. *citriodora* (Beck.) Balb. and *Melissa officinalis* L. Essential Oils. *Nat Prod Commun* 2 (12): 1277-1286, 2007.
37. Van Dyke TE, Braswell L, Offenbacher S. Inhibition of Gingivitis by Topical Application of Ebselen and Rosmarinic Acid. **Agents Actions** 19: 376-7, 1986. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
38. Vanden Berghe DA, Vlietinck AJ, Van Hoof L. Present Status and Prospects of Plant Products as Antiviral Agents. In: Vlietinck AJ, Dommissie RA, editors.

- Advances in Medicinal Plant Research. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 47-99, 1985. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
39. König B, Dustmann JH. The Caffeyolics as a New Family of Natural Antiviral Compounds. *Naturwissenschaften* 72: 659-61, 1985. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
  40. Kucera LS, Herrmann EC Jr. Antiviral Substances in Plants of the Mint Family (Labiatae). I. Tannin of *Melissa officinalis*. *Proc Soc Exp Biol Med* 124: 865-9, 1967. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
  41. May G, Willuhn G. Antivirale Wirkung wäßriger Pflanzenextrakte in Gewebekulturen. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 28: 1-7, 1978. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
  42. Mazzanti G, Battinelli L, Pompeo C, Serrilli AM, Rossi R, Sauzullo I, Mengoni F, Vullo V. Inhibitory Activity of *Melissa officinalis* L. Extract on *Herpes simplex* Virus Type-2 Replication. *Nat Prod Commun* 22: 1433-1440, 2008.
  43. Allahverdiyev A, Duran N, Ozguven M, Koltas S. Antiviral Activity of the Volatile Oils of *Melissa officinalis* L. against *Herpes simplex* Virus Type-2. *Phytomedicine* 11: 657-661, 2004.
  44. Wölbling RH, Leonhardt K. Local Therapy of *Herpes simplex* with Dried Extract from *Melissa officinalis*. *Phytomedicine* 1: 25-31, 1994. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
  45. Koytchev R, Alken RG, Dundarov S. Balm Mint Extract (Lo-701) for Topical Treatment of Recurring Herpes Labialis. *Phytomedicine* 6(4): 225-30, 1999.
  46. Brown DJ, Dattner AM. Phytotherapeutic Approaches to Common Dermatologic Conditions. *Arch Dermatol* 134:1401, 1998.
  47. Rampart M, Beetens JR, Bult H, Herman AG, Parnham MJ, Winkelmann J. Complement-dependent Stimulation of Prostacyclin Biosynthesis; Inhibition by Rosmarinic Acid. *Biochem Pharmacol* 35: 1397-1400, 1986. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
  48. Parnham MJ, Kesselring K. Rosmarinic acid. *Drugs Future* 10: 756-757, 1985.

49. Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS Acetylcholine Receptor Activity in European Medicinal Plants Traditionally Used to Improve Failing Memory. *J Ethnopharmacol* 69: 105-14, 2000.
50. Ballard CG, O'Brien JT, Reichelt K, Perry EK. Aromatherapy as a Safe and Effective Treatment for the Management of Agitation in Severe Dementia: The Results of a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial with *Melissa*. *J Clin Psychiatry* 63: 553-8, 2002.
51. Izzo AA, Capasso F. Herbal Medicines to Treat Alzheimer's Disease. *Pharmacol Sci* 28, 2007.
52. Riberio MA, Bernardo-Gil MG, Esquivel MM. *Melissa officinalis* L.: Study of Antioxidant Activity in Supercritical Residues. *J Supercrit Fluid* 21: 51-60, 2001.
53. Soulimani R, Fleurentin J, Mortier F, Misslin R, Derrieu G, Pelt JM. Neurotropic Action of the Hydroalcoholic Extract of *Melissa officinalis* in the Mouse. *Planta Med* 57: 105-9, 1991. Ref. Anonym. ESCOP Monographs. (2. baskı) Guildford. Thieme ve ESCOP, syf 324-328, 2003.
54. Cerny A, Schmid K. Tolerability and Efficacy of Valerian/ Lemon Balm in Healthy Volunteers (a Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Study. *Fitoterapia* 70: 221-228, 1999.
55. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T, Riggins CW, Riister RS, editörler. The Complete German Commission E Monographs. Austin. The American Botanical Council, s. 160, 1998.
56. Koçyiğit M, Özhayat N. Wild Plants Used As Medicinal Purpose İn Yalova (Northwest Turkey). *Turkish J. Pharm. Sci.* 3(2), 91-103, 2006.
57. Yücel E, Tülükoğlu A. Gediz (Kütahya) Çevresinde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler. *Çev. Kor.* 9 (36): 12-14, 2000.
58. Tuzlacı E, Tolon E. Turkish Folk Medicinal Plants, Part III: Şile (İstanbul). *Fitoterapia* 71: 673-685, 2000.
59. Tuzlacı E, Eryaşar Aymaz P. Turkish Folk Medicinal Plants, Part IV: Gönen (Balıkesir). *Fitoterapia* 72: 323-343, 2001.
60. Everest A, Ozturk E. Focusing on the Ethnobotanical Uses of Plants in Mersin and Adana Provinces (Turkey). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 1-6, 2005.

61. Malyer H, Öz Aydın S, Tümen G, Er S. Tekirdağ ve Çevresindeki Aktarlarda Satılan Bazı Bitkiler ve Tıbbi Kullanım Özellikleri. **Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi** 7: 103-111, 2004.
62. Salah SM, Jager AK. Screening of Traditionally Used Lebanese Herbs for Neurological Activities. *J Ethnopharmacol* 97: 145-149, 2005. Ref. Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The Aromatic and Polyphenolic Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) Tea. **Pharmaceutica Actia Helvetiae** 72: 301-305, 1998.
63. Jager AK, Gauguin B, Adersen A, Gudiksen L. Screening of Plants Used in Danish Folk Medicine to Treat Epilepsy and Convulsions. *J Ethnopharmacol* 105: 294-300, 2006. Ref. Carnat AP, Carnat A, Fraisse D, Lamaison JL. The Aromatic and Polyphenolic Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) Tea. **Pharmaceutica Actia Helvetiae** 72: 301-305, 1998.
64. Reich E, Schibli A. High Performance Thin Layer Chromatography for the Analysis of Medical Plants. (1. baskı) Switzerland, syf 129-137, 2007.
65. European Pharmacopeia 6<sup>th</sup> Edition. 16 July 2007. 5.6 Supplement; 1989-1990.
66. Ebrahimi SN, Kiyandpour V, Hadian J, Salehi P, Asghari B. Determination of Rosmarinic Acid Content in Some Iranian *Satureja* Species by HPTLC. *Planta Med* 74: 895-1227, 2008.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

15 Mart 1982’de Antalya’da doğdu. İlkokulu Gazipaşa Cumhuriyet İlköğretim Okulu’nda, orta ve lise eğitimimi ise Alanya Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi’nde okudu. 2000 yılında eğitim görmeye başladığı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 2004 yılında mezun oldu. 2004-2007 yılları arasında Alanya’da sahibi ve mesul müdürü olduğu Öznur Eczanesi’nde serbest eczacılık yaptı. 2007 yılında Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi ve Fitoterapi Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimime başladı. Halen aynı fakültede çalışmaktadır. Evli.