



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



PİYASADAN TEMİN EDİLEN HYSSOPI HERBA DROĞU ÜZERİNDE KALİTE KONTROL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Gülhan ZEYBEK

Farmakognozi Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PİYASADAN TEMİN EDİLEN HYSSOPI HERBA DROĞU ÜZERİNDE
KALİTE KONTROL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Ecz. Gülhan ZEYBEK

Danışman
Prof. Dr. Gülen İrem KAYA

Farmakognozi Anabilim Dalı
Fitoterapi Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildięi tarih:

Önsöz

2004 Yılı Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi mezunuyum. Mesleğimin çeşitli alanlarında çalıştım. Doğanın şifa edici gücüne olan inancımla bu yolda bilgi edinmek istedim. 40. yaşında yıllar sonra bu koridorlara geri dönmek yine aynı laboratuvar kokusunu teneffüs etmek değerli hocalarımı tekrar görmek çok mutluluk vericiydi. İlk bir yıl teorik eğitim sonrası kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Gülen İrem Kaya benim renkli ve aromatik bitkilere olan ilgimi göz önünde bulundurarak Herba Hyssopi (Zufa / Çördük otu) droğunu tez konusu olarak önerdi. Öncelikle bulunduğum bölgede daha sonra halk arasında kullanımından yola çıkarak Erzurum ve Gümüşhane civarında bulunan aktarlarla iletişime geçsem de droğu bulamadım. Sonrasında İstanbul ve farklı bölgelerle iletişime geçtim. Bir meslektaşımın önerisiyle droğun bir örneğini BAÇEM'den temin ettim. Karşılaştırmalı olarak çalışabilmek için bir örnek de online bir alışveriş sitesinden satın aldım. Drog bilinmemekle beraber ismi nedeni ile çörek otu, çörtük otu ve görüntü olarak da farklı bitkilerle karıştırılmaktaydı. İstedığımız genişlikte çalışma yapabilmek adına finansal anlamda destek için BAP projesine başvurduk ve çalışmamız kabul edildi. Çalışmalarına Kalite Kontrol Çalışmaları ile başladım. Aynı zamanda Urla Devlet Hastanesi eczacısı olarak çalıştığım ve iznimin kısıtlı olması nedeniyle ancak haftada bir gün laboratuvar çalışmalarımı yürütebildim. Tez yazım aşamasında da iki çocuğumun olması ve evde anne rolüne geçtiğim için hastanede kalarak konsantre olup yazmaya çalıştım. Çocuklarımdan zamanı esirgesem de onlar için iyi bir rol model olmaya çalıştım. Öğrenmenin yaşı yoktur yaşayarak elimden gelenin en iyisini yapmaya çalıştım. Umarım iyi bir iz bırakmış ve iyi bir katkı sağlamış olurum.

İzmir, 12.09.2024

Ecz.Gülhan ZEYBEK

Özet

Piyasadan Temin Edilen Hyssopi Herba Droğu Üzerinde Kalite Kontrol ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Ülkemizde "zulfa otu, zufa otu, çördük ve cürdük otu" adları ile bilinmekte olan *Hyssopus officinalis* L. bir çok tıbbi ve aromatik bitkiye ev sahipliği yapan Lamiaceae familyasında yer alır. Gümüşhane (Köse), Erzurum, Konya, Ermenek bölgelerinde yayılış göstermektedir. Drog olarak taze veya kurutulmuş toprak üstü kısmı kullanılmaktadır. Drog yemek, kozmetik, ilaç sektörü ve veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında iki farklı örnek ile karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır.

Türk ve Avrupa Farmakopesi, EMA, ESCOP, WHO ve FFD gibi çeşitli kaynaklar incelendiğinde, bitki ile ilgili bir monografa rastlanmamıştır. Tez çalışmamızda drog üzerinde Avrupa Farmakopesi ve Türk Farmakopesi'nde yer alan kalite kontrol testleri yapılmıştır. Bu çalışma ileride bu bitki ile ilgili hazırlanacak bir monograf için kaynak olabilecektir.

Bu tez çalışması kapsamında daha önce yapılan literatür araştırmaları ve droğun geleneksel kullanımı göz önüne alınarak drog üzerinde çeşitli miktar tayini çalışmaları, biyolojik aktivite testleri ve uçucu yağ analizi yapılmıştır. Herba Hyssopi metanol ekstresi ile hazırlanan G1 ve G2 kodlu örneklerin, ekstre verimleri hesaplanmış olup Folin-Ciocalteu yöntemi ile total fenolik bileşik miktarı mg GAE /g ekstre , Aliminyum klorür yöntemi ile total flavonoit miktarı mg kersetin/g ekstre olarak ve HPLC-DAD yöntemi ile apigenin ve rutin miktarı µg/g ekstre bulunmuştur. Biyolojik aktivite çalışmaları olarak, Ellman yöntemi ile antikolinesteraz (asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitör) aktivite ve hücre kültür yöntemi ile antioksidan aktivite çalışmaları yapılmıştır. Makroskobik inceleme sonucunda aromatik kokusu daha belirgin olan G1 droğunun uçucu yağı elde edilmiş olup, uçucu yağ verimi hesaplanmış ve GC-MS yöntemiyle bileşenleri analiz edilmiştir. Major bileşenleri belirlenen uçucu yağının ISO 9841-2013 standartlarına uygun olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler; Hyssopi herba; antioksidan aktivite; antikolinesteraz aktivite; HPLC-DAD; kalite kontrol

Abstract

Quality Control and Biological Activity Studies on Commercially Available Hyssopi Herba Drug

Hyssopus officinalis L., known in our country as "zulfa otu, zufa otu, çördük ve cürdük otu", is in the Lamiaceae family, which hosts many medicinal and aromatic plants. It is widespread in Gümüşhane (Köse), Erzurum, Konya, Ermenek regions. Fresh or dried above-ground parts are used as drugs. The drug is used in food, cosmetics, pharmaceutical sector and veterinary medicine. Within the scope of the study, a comparative study was conducted with two different samples.

When various sources such as Turkish and European Pharmacopoeia, EMA, ESCOP, WHO and FFD were examined, a monograph was not found on the plant. In our thesis study, quality control tests in the European Pharmacopoeia and Turkish Pharmacopoeia were performed on the drug. This study may be a source for a monograph to be prepared on this plant in the future.

Within the scope of this thesis study, various quantity determination studies, biological activity tests and essential oil analysis were performed on the drug, considering the previous literature research and traditional use of the drug. Extract yields of samples coded G1 and G2 prepared with Herba Hyssopi methanol extract were calculated and the amount of total phenolic compounds was calculated as mg GAE/g extract by Folin-Ciocalteu method, total flavonoid content was calculated as mg quercetin/g extract by aluminum chloride method and apigenin and rutin amounts were calculated as µg/g extract by HPLC-DAD method. As biological activity studies, anticholinesterase (acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitor) activity studies were carried out by Ellman method and antioxidant activity studies were carried out by cell culture method. As a result of macroscopic examination the essential oil of the G1 drug, with a more pronounced aromatic odor, was obtained. The essential oil yield was calculated and the components were analyzed by GC-MS method. It was found that the essential oil, the major components of which were determined, complied with ISO 9841-2013 standards.

Keywords; Hyssopi herba; antioxidant activity; anticholinesterase activity; HPLC-DAD; quality control

İçindekiler

Özet.....	I
Abstract.....	II
İçindekiler	III
Tablolar Dizini.....	VII
Şekiller Dizini	IX
Grafikler Dizini	X
Kısaltma Listesi	XI
Giriş.....	1
Genel Bilgiler	4
2.1. Botanik Bilgiler ve Genel Özellikleri	4
2.2. Fitokimyasal Bileşenler ve Miktar Tayini Çalışmaları.....	8
2.3. Biyolojik Aktiviteleri.....	19
2.3.1. Asetilkolinesteraz ve Bütürlkolinesteraz İnhibitör Aktivite ve Alzheimer Hastalığı	19
2.3.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Aktivite	20
2.3.3. Diğer Aktiviteleri.....	23
Gereç ve Yöntem	28
3.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Kimyasalların Listesi	28
3.2. Bitkisel Materyal	32
3.3. Makroskobik İnceleme.....	33
3.4. Yöntem	33
3.4.1. Kalite Kontrol Testleri.....	34
3.4.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini	34
3.4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayini.....	34
3.4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini	35
3.4.1.4. HCL de Çözünmeyen Kül Miktar Tayini.....	35
3.4.2. Ekstre Hazırlama (% Ekstre Verimi).....	36
3.4.3. Miktar Tayini Çalışmaları.....	37
3.4.3.1. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini	37
3.4.3.1.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	37
3.4.3.1.2. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Hazırlama.....	37
3.4.3.1.3. Bitki Ekstrelerinde Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini	38

3.4.3.2.	Total Flavonoit Miktar Tayini.....	38
3.4.3.2.1.	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	38
3.4.3.2.2.	Kersetin Standart Eğri Grafiği Hazırlama.....	39
3.4.3.2.3.	Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini	40
3.4.3.3.	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Apigenin ve Rutin Miktar Tayini ve Miktar Tayini için yapılan Validasyon Çalışmaları.....	40
3.4.3.3.1.	Bitki Ekstrelerinin hazırlanması	40
3.4.3.3.2.	Örnek Çözeltilerin Hazırlanması	41
3.4.3.3.3.	Standart Apigenin ve Rutin Çözeltilisinin Hazırlanması	41
3.4.3.3.4.	Standart Apigenin ve Rutin Çözeltilerine Ait Kalibrasyon Eğrisi Hazırlanması.....	41
3.4.3.3.5.	Deneyin Yapılışı.....	41
3.4.3.3.6.	Validasyon Yöntemleri	42
3.4.3.3.6.1.	Doğrusallık (Linearity)	42
3.4.3.3.6.2.	Özgünlük (Seçicilik,Selectivity)	43
3.4.3.3.6.3.	Keskinlik (Precision), tekrarlanabilirlik (Repeatability).....	43
3.4.3.3.6.4.	Teşhis Limiti (Limit of detection, LOD), Miktar Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)	43
3.4.3.3.6.5.	Doğruluk (Accuracy), Geri Kazanım (Recovery)	43
3.4.4.	Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	44
3.4.4.1.	Asetilkolinesteraz ve Bütürlkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmaları.....	44
3.4.4.1.1.	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	44
3.4.4.1.2.	Enzim İnhibisyon Tayini	45
3.4.4.2.	Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi	46
3.4.4.2.1.	Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	46
3.4.4.2.2.	Hücelere Ekstre Uygulaması.....	46
3.4.4.2.3.	Hücre canlılığı analizi	47
3.4.4.2.4.	Hücrelerin Toplanması ve Protein Miktar Tayini	47
3.4.4.2.5.	Total Antioksidan Durum Ölçümü	47
3.4.4.2.6.	Total Oksidan Durum Ölçümü	48
3.4.4.2.7.	İstatistiksel Değerlendirme.....	49
3.4.5.	Uçucu Yağ Eldesi ve Analizi.....	49

3.4.5.1. GC-MS Metot.....	49
Bulgular.....	50
4.1. Kalite Kontrol Testlerine Ait Bulgular	50
4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayinine ait Bulgular	51
4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayinine Ait Bulgular	52
4.1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayinine Ait Bulgular	53
4.2. Ekstre Hazırlama (Drog Verimi)'ne Ait Bulgular	54
4.3. Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular	54
4.3.1. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayinine Ait Bulgular.....	54
4.3.1.1. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Bulguları	54
4.3.1.2. Bitki Ekstrelerinde Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini Bulguları	56
4.3.2. Total Flavonoit Miktar Tayinine Ait Bulgular	57
4.3.2.1. Kersetin Standart Eğri Grafiği Bulguları	57
4.3.2.2. Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini Bulguları.....	58
4.3.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Apigenin ve Rutin Teşhis ve Miktar Tayinine Ait Bulgular	59
4.3.3.1. Bitki Ekstre Verimine Ait Bulgular	59
4.3.3.2. Standart Apigenin Kalibrasyon Eğrisine Ait Bulgular	60
4.3.3.3. Standart Rutin Kalibrasyon Eğrisine Ait Bulgular.....	61
4.3.3.4. Validasyona Ait Bulgular.....	63
4.3.3.4.1. Doğrusallık , Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması	63
4.3.3.4.2. Özgünlük (Seçicilik, Selectivity) Ait bulgular	63
4.3.3.4.3. Kesinlik(Tekrarlanabilirlik)'a Ait Bulgular.....	64
4.3.3.4.4. Tanımlama Limiti (LOD) ve Ölçüm (Rapor) Limiti (LOQ)'ne Ait Bulgular	64
4.3.3.4.5. Doğruluk (Geri Kazanım)'a Ait Bulgular.....	65
4.3.3.5. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Bulguları	65
4.3.3.6. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Kromatogram Bulguları	69
4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	71
4.4.1. Asetilkolinesteraz ve Bütürlkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	71
4.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesine Ait Bulgular.....	73

4.4.2.1. Hücre Canlılığı Analizine Ait Bulgular	73
4.4.2.2. Total Antioksidan ve Oksidan Durumuna Ait Bulgular.....	73
4.5. Uçucu Yağ Analizine Ait Bulgular.....	74
Tartışma.....	77
Sonuç ve Öneriler.....	87
Kaynaklar	90
Teşekkür	98
Özgeçmiş	99



Tablolar Dizini

Tablo 1. <i>Hyssopus officinalis</i> L. üzerinde kimyasal bileşenlerine yönelik yapılan çalışmalar ve sonuçları.....	13
Tablo 2. <i>Hyssopus officinalis</i> L. uçucu yağlarının kimyasal analizleri.....	18
Tablo 3. <i>Hyssopus officinalis</i> L. bitkisine ait biyolojik aktivite çalışmaları	27
Tablo 4. Kalite Kontrol Testlerinde kullanılan kimyasallar ve çözücüler.....	28
Tablo 5. Total fenolik bileşik miktar tayini çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler	28
Tablo 6. Total flavonoit yapıda bileşik miktar tayini çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler.....	28
Tablo 7. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile apigenin ve rutin miktar tayini çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	29
Tablo 8. Asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim inhibitör aktivite çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler	29
Tablo 9. Hücre kültürü çalışmaları ve antioksidan enzim aktivitesi çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler.....	30
Tablo 10. Kullanılan alet ve cihazlar.....	31
Tablo 11. HPLC-DAD Gradient elüsyon oranları.....	42
Tablo 12. G1 ekstre örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları.....	50
Tablo 13. G2 ekstre örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları.....	50
Tablo 14. G1 örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları	51
Tablo 15. G2 örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları	51
Tablo 16. G1 örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları	52
Tablo 17. G2 örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları	52
Tablo 18. G1 örneklerine ait HCl'de çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları.....	53
Tablo 19. G2 örneklerine ait HCl'de çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları.....	53
Tablo 20. G1 ve G2 örneklerinden hazırlanan metanol ekstreleri için % verim değerleri	54
Tablo 21. Gallik asit çözeltilerine ait absorbans değerleri	55
Tablo 22. G1 ekstre örneklerine ait total fenolik bileşik miktar tayini sonuçları.....	56
Tablo 23. G2 ekstre örneklerine ait total fenolik bileşik miktar tayini sonuçları.....	56
Tablo 24. Kersetin Çözeltilerine Ait Absorbans Değerleri	57
Tablo 25. G1 ekstre örneklerine ait total flavonoit miktar tayini sonuçları	58

Tablo 26. G2 ekstre örneklerine ait total flavonoit miktar tayini sonuçları	58
Tablo 27. G1 örneklerine ait % verim sonuçları	59
Tablo 28. G2 örneklerine ait % verim sonuçları	59
Tablo 29. Apigenin çözelti konsatrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD 'da okunan ortalama alan değerleri.....	60
Tablo 30. Rutin çözelti konsantrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD'da okunan ortalama alan değerleri.....	62
Tablo 31. Rutin tekrarlanabilirlik sonuçları	64
Tablo 32. Apigenin tekrarlanabilirlik sonuçları	64
Tablo 33. Apigenin ve rutin için tanımlama ve ölçüm limit verileri.....	64
Tablo 34. Rutin için geri kazanım sonuçları	65
Tablo 35. Apigenin için geri kazanım sonuçları	65
Tablo 36. G1 ekstre örneklerine ait apigenin alan değerleri	66
Tablo 37. G1 ekstre örneklerine ait rutin alan değerleri.....	66
Tablo 38. G2 ekstre örneklerine ait apigenin alan değerleri	67
Tablo 39. G2 ekstre örneklerine ait rutin alan değerleri.....	67
Tablo 40. G1 ekstre örneklerine ait apigenin miktar değerleri.....	68
Tablo 41. G1 ekstre örneklerine ait rutin miktar değerleri.....	68
Tablo 42. G2 ekstre örneklerine ait apigenin miktar değerleri.....	69
Tablo 43. G2 ekstre örneklerine ait rutin miktar değerleri.....	69
Tablo 44. G1 ekstresine ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları.....	71
Tablo 45. G1 ekstresine ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları	72
Tablo 46. G2 ekstresine ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları.....	72
Tablo 47. G2 ekstresine ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları	72
Tablo 48. G1 Örneğine Ait Uçucu Yağ GC-MS Analiz Sonucu	76
Tablo 49. G1 ve G2 kodlu örneklerin kalite kontrol test sonuçlarına ait ortalama değerler.....	77
Tablo 50. G1 ve G2 kodlu örneklerin ortalama miktar tayini sonuçları	79
Tablo 51. <i>Hyssopus officinalis</i> L. uçucu yağ bileşenlerinin ISO 9841-2013 standartları ile karşılaştırması	85

Şekiller Dizini

Şekil 1. <i>Hyssopus officinalis</i> L.(Zufa otu) doğadaki görünüşü.....	4
Şekil 2. <i>Hyssopus officinalis</i> L.(Zufa otu) bitkisine ait herbaryum görseli	5
Şekil 3. <i>Hyssopus officinalis</i> L.'nin Türkiye'de yayılımı.....	6
Şekil 4. <i>H. officinalis</i> subsp. <i>aristatus</i> 'un morfolojik yapısı	7
Şekil 5. <i>H. officinalis</i> subsp. <i>aristatus</i> 'un mikroskopik incelenmesi.....	7
Şekil 6. Oksidatif denge	22
Şekil 7. BAÇEM-Balıkesir'den temin edilen paketin görseli.....	32
Şekil 8. Online alışveriş sitesinden temin edilen paketin görseli.....	33
Şekil 9. Standart apigenin HPLC kromatogramı	61
Şekil 10. Standart rutin HPLC kromatogramı.....	63
Şekil 11. Apigenin ve rutin standartlarına ait HPLC kromatogramı	63
Şekil 12. G1- 1 ekstre örneği HPLC kromatogramı	70
Şekil 13. G1- 2 ekstre örneği HPLC kromatogramı	70
Şekil 14. G1- 3 ekstre örneği HPLC kromatogramı	70
Şekil 15. G2- 1 ekstre örneği HPLC kromatogramı	70
Şekil 16. G2- 2 ekstre örneği HPLC kromatogramı	71
Şekil 17. G2- 3 ekstre örneği HPLC kromatogramı	71
Şekil 18. G1 Örneğine Ait Uçucu Yağ GK kromatogram	76

Grafikler Dizini

Grafik 1. Gallik asit standart eğrisi	55
Grafik 2. Kersetin Standart Eğrisi.....	57
Grafik 3. Standart apigenin kalibrasyon eğrisi.....	61
Grafik 4. Standart rutin kalibrasyon eğrisi.....	62
Grafik 5. Hidrojen peroksitle indüklenmiş oksidatif stres koşullarında G1ve G2 ekstrelerinin (1, 10, 100 µg/mL) SH-SY5Y hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi .	73
Grafik 6. G1 ve G2 ekstrelerinin (1 µg/mL) H ₂ O ₂ (200 µM) indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerindeki a) total antioksidan durum (TAS) b) total oksidan durum (TOS) üzerindeki etkisi	74

Kısaltma Listesi

μL	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
CMC	: Karboksi metilselüloz
ABTS	: 2,2'-Azino-Bis (3-Etilbenzotiyazolin-6-Sülfonik Asit)
AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Alzheimer hastalığı
Anti-HIV	: Anti-Human Immunodeficiency Virus
Anti-HSV-1	: Anti-Herpes Simplex Virüsü
BAÇEM	: Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi
BAE	: Ultrason destekli ekstraksiyon
BCA	: Bikinkoninik asit
BChE	: Bütürlkolinesteraz
CAE	: Kafeik asit
DMEM	: Dulbecco Modifiye Eagle Solüsyonu
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5.5'-Ditiyobis-(2- nitro benzoik asit)
EEHO	: Ethanolic extract of Hyssopus officinalis L
EMA	: European Medicines Agency's
ESCOP	: European Scientific Cooperative on Phytotherapy
FBS	: Fetal sığır serumu

FDA	: Food and Drug Administration
g	: Gram
GAE	: Gallik asit
GC-MS	: Gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi
GSH	: Glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₃ PO ₄	: Trihidrojen Fosfat
HCL	: Hidrojen Klorür
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HPLC-DAD	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPLC-MS	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPTLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum Hidrojenfosfat
MAE	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MATAL	: Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi
MC	: Maserasyon
mL	: Mililitre
N	: Gürültü
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat

NaCl	: Sodyumklorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Nm	: Nanometre
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
O ₂	: Singlet oksijen
OH [·]	: Hidroksil radikali
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PTZ	: Pentilentetrazol
RE	: Rutin eşdeğeri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
S	: Sinyal
SE	: Soxhlet ekstraksiyonu
SH-SY5Y	: İnsan nöroblastoma hücre serisi
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAS	: Total Antioxidant Status
TBARS	: Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
TOS	: Total Oxidant Status
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

Giriş

Biyolojik evrime göre canlılar hayatta kalabilmek için savaşmak zorundadır. Doğal koşullarda oluşan her hastalık yapıcı etmene karşı canlılar arası savunma mekanizması geliştirilmiştir. Dolayısıyla hastalık yapıcı etmen de tedavi edici etmen de doğada gizlidir. İnsanların hastalıklar karşısında deneyim ve gözlemleri sonucunda oluşan davranışları kültürel evrimlerinin bir sonucudur (Menev, 1999). İnsanlar buldukları ve tecrübe ettikleri yöntemleri yaşadıkları dönemlere göre bazen bir taşta bazen bir kağıda resim etmişler bazen de yazıya dökmüşlerdir. Deneyimler geleceğe ışık tutmuştur. İnsanoğluna düşen ise bunu keşfetmektir. Keşfedilmeyi bekleyen bitkiler arasında Willie Southall'ın 1993 yılında "*Hyssop Superior Healing Power*" "Zufa otunun üstün iyileştirici gücü" adlı kitabında ve Kitabı-I Mukaddes'in Mezmurlar 51:7 'de "*Beni zufa otu ile temizle de pak olurum ; beni yıka da kardan ak olurum*"(Uluda et al., 2023) diye bahsettiği *Hyssopus officinalis* L. 'dir.

İngilizce'de "Hyssop", Almanca'da "Ysop", Yunanca'da "Hyssoopos" olarak adlandırılan bitki "kutsal ot" anlamına gelen İbranice'de "esob", Arapça'da "azzof", Fransızca'da "herbe sacré", (Bährle-Rapp, 2007) ve Türkçede 'zulfa otu, zufa otu, çördük ve cürdük otu" (Kara, Baydar, Kayaalp, Boyar, & Bayhan, 2014) isimleriyle bilinmektedir. .Unani tıp sisteminde yaygın kullanılan bitkiler arasında yer alır (Nile, Nile, & Keum, 2017) .

Kökeni Batı Asya olan bitki Hazar Denizi'nden Karadeniz'e kadar doğal yayılış göstermekte olup bitkiye özellikle Avrupa, Cezayir, Fas, İran bölgelerinde daha yoğun rastlanır. *Hyssopus officinalis* L. lavanta kekik gibi bir çok uçucu yağ bakımından zengin Lamiaeceae (Labiatae) familyasına ait çok yıllık yarı odunsu çalimsı aromatik kokulu bir bitkidir. Beyazdan mavi-mora doğru farklı renkte çiçeklere ve yağ bezleri ve çok kısa kıvrılmış tüylerle kaplı neredeyse sapsız yapraklara sahiptir. Toprak yönünden özel besisi ortamı istemeyen, kuru kireçli kumlu toprakları seven, magmatik kayalarda sekilerde yetişebilen, yabani bir bitkidir. Bitki hafif acımsı tatlı hoş kokuludur. Kültürü tohumları, çelik ve ayırma yöntemleri ile yapılabilir. Renkli ilgi gören çiçekleri ile döllenmesi arılar tarafından yapılmaktadır (Bährle-Rapp, 2007; Savill, 2019; Sharifi-Rad et al., 2022)

Drog olarak toprak üstü kısmı herbası kullanılmaktadır. Kimyasal yapısında bulunan polifenolik bileşiklerden flavonoitler apigenin, kersetin, diosmin, luteolin ve bunların

glikozitleri, klorojenik, protokatekuik, ferulik, siringik, p-hidroksibenzoik ve kafeik asit ve uçucu yağ içeriğinde bulunan terpenoid yapıdaki bileşikler biyolojik aktivitelerinden sorumludur (Fathiazad, Mazandarani, & Hamedeyazdan, 2011a).

Drog yemek, kozmetik, ilaç sektörü ve veteriner hekimlikte kullanılmaktadır. Geleneksel kullanımı yüzyıllar öncesine dayanır. Bitkinin toprak üstü kısımlarının sıcak sulu ekstresi veya infüzyonu şeklinde gaz giderici, tonik, antiseptik, balgam söktürücü ve öksürük kesici, romatizmal hastalıklarda, terlemeyi sağlayıcı, diyare tedavisinde, antihelmintik ve yara bakımında kullanılmıştır (Fathiazad et al., 2011a)(KATAR, KATAR, & YILDIZ, 2021). Türkiye’de Erzurum ve Gümüşhane yörelerinde taze yaprakları aroma ve koku vermek için hamur işlerinde kullanılmasının yanı sıra halk arasında uyarıcı, gaz söktürücü ve midevi olarak da kullanılmaktadır (Baytop, 1984) (Bährle-Rapp, 2007).

Herba Hyssopi ekstresi ve uçucu yağ içeriğinin zengin içeriklerinin sonucu bitki; antimikrobiyal aktivitesine bağlı (antibakteriyel, antiviral, antifungal) solunum yolu hastalıkları, idrar yolu hastalıkları, mide bağırsak sistemi hastalıkları, deri enfeksiyonları ve HIV virüsüne karşı, antioksidan aktivitesine bağlı enfeksiyon hastalıklarından kansere, metabolik hastalıklardan Alzheimer’a kadar pek çok hastalıkta, kolinesteraz aktivitesine bağlı böcek öldürücü ve alzheimer hastalığında, miyorelaxan aktivitesine bağlı epilepsi gibi nörolojik hastalıklarda etkilidir (Fathiazad & Hamedeyazdan, 2011; Sharifi-Rad et al., 2022).

Uçucu yağ içeriğinde bulunan monoterpen ketonların (pinokamfon, kamfor, thujon vb.) etkisiyle konvülsif etki gösterir. Uçucu yağ bileşeni olan marrubin etkisiyle solunum yollarını tahriş edebilir. Terapötik dozlarda herhangi bir yan etkisi olmasa da sıçanlarla yapılan deneylerde yüksek dozda verildiğinde nöbet oluşturup öldürücü konvülsif etkisiyle sonuçlanmıştır. İnsanlar üzerinde yapılan herhangi bir çalışma yoktur. Hastanelerden elde edilen klinik veriler doğrultusunda astım semptomları, erken adet görme, aritmi ve oligüri, alerjik reaksiyon ve solunum yolu tahrişi gibi yan etkileri vardır. Gebelikte kullanılması önerilmez. Kan beyin bariyerini geçemez (Marty, 1999; Sharifi-Rad et al., 2022).

Kitaplara konu olan, kutsal kitapta yer alan, halk arasında kullanımı bulunan zufa otu ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Türk ve Avrupa Farmakopesi, EMA, ESCOP, WHO

ve FFD gibi çeşitli kaynaklar incelendiğinde, bitki ile ilgili bir monografa rastlanmamıştır.

Tez çalışmamızda drog üzerinde Avrupa Farmakopesi ve Türk Farmakopesi'nde yer alan kalite kontrol testleri (kurutmada kayıp miktar tayini, total kül miktar tayini, HCL'de çözünmeyen kül miktar tayini, sülfat külü miktar tayini) yapılması planlanmıştır. Bu çalışma ileride bu bitki ile ilgili hazırlanacak bir monograf için kaynak olabilecektir.

Tez çalışmamız kapsamında yine Folin-Ciocalteu yöntemi ile total fenolik bileşik miktar tayini, Aliminyum klorür yöntemi ile total flavonoit miktar tayini, HPLC-DAD yöntemi ile apigenin ve rutin miktar tayini, Ellman yöntemi ile anti kolinesteraz (asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitör) aktivite ve hücre kültür yöntemi ile antioksidan aktivite tayini çalışmaları planlanmıştır.

Yapılan literatür araştırmalarının sonucu bitki ile ilgili uçucu yağ içeriği ve buna bağlı aktiviteleri üzerine çalışmalara da sıkça rastlanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda proje imkanları dışında kendi imkanlarımızla kokusu oldukça yoğun olan G1 kodlu Herba Hyssopi örneğinin uçucu yağı elde edilerek, GC-MS yöntemi ile uçucu yağ bileşenleri tayin edilmiştir.

Genel Bilgiler

2.1. Botanik Bilgiler ve Genel Özellikleri

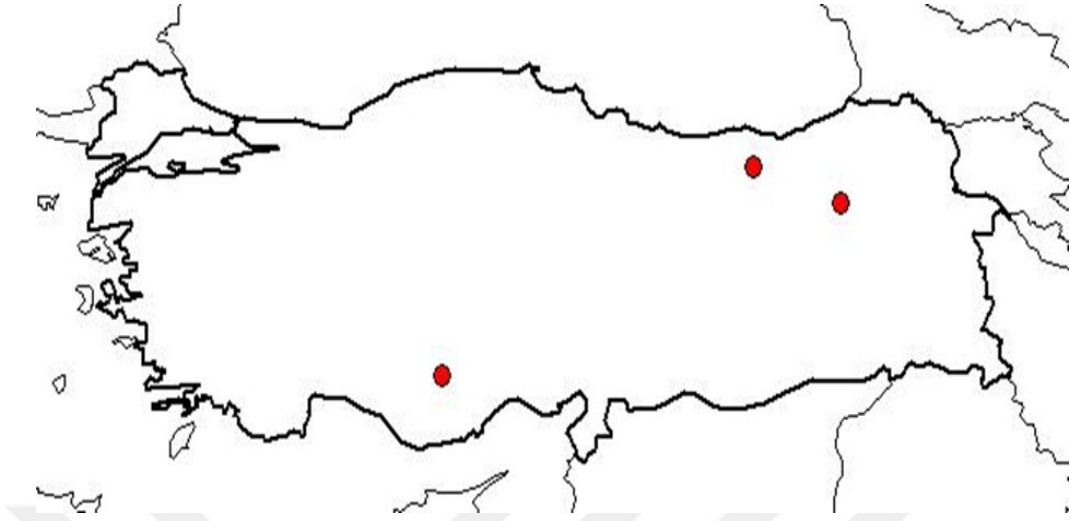


Şekil 1. *Hyssopus officinalis* L.(Zufa otu) doğadaki görünüşü
(BAÇEM/Balıkesir)



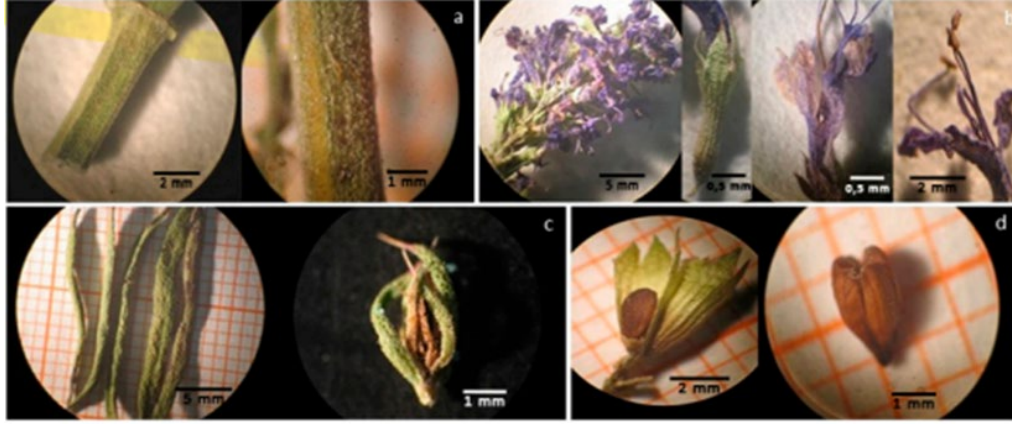
Şekil 2. *Hyssopus officinalis* L.(Züfa otu) bitkisine ait herbaryum görseli

Bir çok tıbbi ve aromatik bitkiye ev sahipliği yapan Lamiaceae familyasında bulunan *Hyssopus officinalis* L. Hazar denizi'nden Karadeniz'e kadar ve Güney Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika bölgesinde doğal yayılış göstermektedir (Guerrini et al., 2021; Zawislak, 2016). Endemik İran bitkisi olan Züfa otu 70 türle temsil edilse de bunlardan sadece 10 tür doğrulanmıştır (Fathiazad et al., 2011a; Guerrini et al., 2021). Birçok Avrupa ülkesinde kültürü yapılmakta olan bitkinin Türkiye'de *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* türü Kuzey Doğu ve Güney Anadolu'da doğal olarak yetişmektedir. Gümüşhane (Köse), Erzurum, Konya, Ermenek bölgelerinde de *Hyssopus officinalis* L. bitkisi doğal yayılış göstermektedir (Savill, 2019)



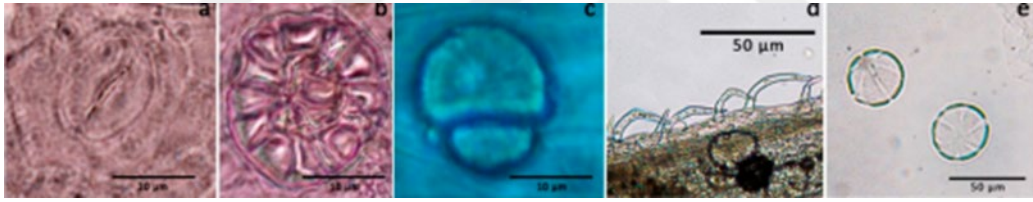
Şekil 3. *Hyssopus officinalis* L.'nin Türkiye'de yayılımı
(Gümüşhane,Erzurum Karaman (Tubives, 2023))

Kayalık kumlu kuru kireçli toprakları seven çalı şeklinde 0.2-0.6 m'ye kadar büyüeyebilen gövdeleri düz bazen odunsu, kazık köklü çok yıllık otsu veya yarı odunsu bir bitkidir. Yaprakları neredeyse sapsız mızrak şeklinde ve yüzeylerinde glandular trikomlar ve çökmüş yağ bezleri bulunur. Aromatik kokuya sahip, arı ve kelebekler tarafından ilgi çeken dudak biçimli pembe, beyaz, ya da mor çiçekleri yaz döneminden sonbahar başlangıcına kadar açar (shari&11)(Savill, 2019)



Şekil 4. *H. officinalis* subsp.*aristatus*'un morfolojik yapısı

a) Küçük trikumlu odunsu dörtgen gövde, (b) başak salkımlı tek taraflı çiçek kümeleri mavi-mor renkli iki loblu üst dudak ve üç loblu alt dudak ve 4 uzun çıkıntılı stamen (c) 20-30 mm uzunluğundaki döner yapraklar, (d) kaliks içinde yaklaşık 1-2 mm boyutunda dört tek tohumlu fındık içeren meyveler (Guerrini et al., 2021).



Şekil 5. *H. officinalis* subsp.*aristatus*'un mikroskopik incelenmesi.

(a) Diasitik stoma (b) sekiz hücreli başlı salgı kılları (c) iki hücreli başlı salgı kılları; (d) kısa, kanca şeklinde tek hücreli örtücü kıllar; (e) hafif granüler altı yarıklı ekzin içeren polen taneleri (Guerrini et al., 2021)

Su stresi altında sitrulin verilmesi (Ahmadi, Babalar, Sarcheshmeh, Morshedloo, & Shokrpour, 2020), tuz stresine maruz bırakılması (Soheilikhah, Modarresi, Karimi, & Movafeghi, 2021), çemen otu ile birlikte ekimi (Gharakhani-Beni, Ghasemi Pirbalouti, Javanmard, Soleymani, & Golparvar, 2023) ile ilgili bu işlemlerin aktivitelerini olumlu yönde etkilediği ve daha iyi verim alındığı yönünde çalışmalar mevcuttur.

2.2. Fitokimyasal Bileşenler ve Miktar Tayini Çalışmaları

Bitkiler yaşamsal faaliyetlerini direkt olarak etkileyen primer metabolik bileşikler (aminoasitler ve organik asitler gibi) ve yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek bulunduğu coğrafyaya ve bu coğrafyadaki kendisi için olası tehditlere karşı kendisini korumak ve adapte olmak adına ürettikleri sekonder metabolik bileşikler (terpenler ve fenolik bileşikler gibi) içerirler (Tiring, Satar, & Özkaya, 2021).

Hyssopus officinalis L. (zufa otu) bitkisinin toprak üstü kısmı olan Herba Hyssopi drog olarak kullanılmaktadır. Zufa otu % 0.1-2 oranında uçucu yağ ve fenolik bileşikler içermektedir (Bährle-Rapp, 2007).

Yapısında yer alan fenolik bileşikler; flavonoitlerden apigenin, kersetin, diosmin, luteolin, bunların glikozitleri rutin, kersitrin, izokersitrin, ve diğer fenolik asitlerden klorojenik, protokatekuik, ferulik, siringik, p-hidroksibenzoik, rosmarinik ve kafeik asitlerdir. Uçucu yağın içerisinde terpen yapısında bileşiklerden monoterpen ketonlardan pinokarvon, pinokamfon, izopinokamfon ve ayrıca β -pinen, karvakrol, mirtenol, terpinen-4-ol, ökaliptol gibi bileşikler major olarak bulunmaktadır (Tahir, Khushtar, Fahad, & Rahman, 2018)(Guerrini et al., 2021)(Fathiazad et al., 2011a).

Vlase ve arkadaşları tarafından Romanya’da kültürü yapılan Zufa otunun toprak üstü kısımlarının etanol ekstresi ile total fenolik bileşik içeriği, total flavonoit bileşik içeriği ve kafeik asit türevleri kütle spektrometresine bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-MS) ile analiz edilmiş, total fenolik bileşik içeriği (mg GAE/g) 77.72 ± 1.83 ; total flavonoit bileşik içeriği (mg RE/g) 1.30 ± 0.10 ve kafeik asit türevleri (mg CAE/g) 9.25 ± 0.75 olarak bulunmuştur. Zufa otunda fenolik asitlerden ferulik asit ($36.92 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$), flavonoid glikozit, izokersitrin, rutin ve kersitrin ve iki flavonoit aglikon, kersetin ve luteolin bulunmuştur. İzokersitrin en fazla miktarda bulunan flavonoid ($32.78 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$), rutin $21.93 \pm 0.72 \mu\text{g/g}$, kersitrin $4.02 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$, kersetin $1.79 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$, luteolin $2.25 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiştir (Vlase et al., 2014)

Nile ve arkadaşları tarafından (2017) Hindistan’da yetiştirilen Zufa otunun farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstraktları (mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), ultrason destekli ekstraksiyon (BAE), Soxhlet ekstraksiyonu (SE) ve Maserasyon (MC) ile elde edilen ekstraktlar üzerinde, verim, toplam fenolik bileşik içeriği tayini, antioksidan aktivite testleri yapılmıştır. Toplam fenolik bileşik

içeriğinin (mg GAE/g) farklı ekstrelerdeki miktarları ; MAE (60.35 ± 1.12), BAE (53.75 ± 1.98), SE (47.44 ± 2.01), MC (42.80 ± 1.34) şeklinde bulunmuştur (Nile et al., 2017)

Guerrini ve arkadaşları İtalya'nın üç farklı bölgesinden toplanan zufa otunun uçucu yağ içeriği ve etanol ekstresinin HPLC-DAD ile analizlerini yapmışlar, farklı bölgelere ait farklı oranda fenolik asitlerden kaftarik asit, klorojenik asit, rosmarinik asit bileşiklerini tespit etmişlerdir (Guerrini et al., 2021)

Wang ve arkadaşları tarafından Çin'in Sincan Uygur Özerk Bölgesi'nde yetiştirilen *Hyssopus officinalis* L. bitkisinin kurutulmuş toprak üstü kısmının etanol ekstresinden spektroskopik yöntemlerle daha önce bilinen dokuz flavonoid ile birlikte iki yeni flavonoid glikozit, kersetin 7-O-β-D-apiofuranosil-(1→2)-β-D-ksilopiranosid (1) ve kersetin 7-O-β-D-apiofuranosil-(1→2)-β-D-ksilopiranosid 30-O-β-D-glukopiranosid (2), izole edilmiştir. Diğer dokuz flavonoit de apigenin, apigenin 7-O-β-D-glukopiranosid, apigenin 7-O-β-D-glukuronopiranosid metil ester, luteolin, apigenin 7-O-β-D-glukuronid, apigenin 7-O-b-D-glukuronopiranosid butil ester, luteolin 7-O-β-D-glukopiranosid, diosmin ve akasetin 7-O-a-L-rhamnopiranosil-(1 - 6)-β D-glukopiranosid şeklindedir (Wang & Yang, 2010)

Srivastava ve arkadaşlarının Hindistan'da Himalaya'lardan toplanıp kurutulan Zufa otunun toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi ile fizikokimyasal ve fitokimyasal analiz, HPTLC miktar tayini, in vitro antioksidan ve antidiyabetik aktivite üzerine testler yapmışlardır. Yaptıkları ön taramalar ile alkaloit (% 0.99), tanen (%1.75), şeker (%1.96) ve nişasta (%0.68) gibi fito moleküllerin varlığını ortaya çıkarmışlardır. HPTLC ile yaptıkları miktar tayini çalışmalarında ise ferulik asit içeriğini % 0.034, kafeik asit % 0.0064 kuru ağırlık bazında bulmuşlardır (Srivastava, Awasthi, Kumar, Misra, & Srivastava, 2018).

Arsenijević ve arkadaşları Makedonya'nın Kuzey Galičica Dağı'nda çiçeklenme döneminde toplanıp kurutulan Zufa otunun toprak üstü kısımlarının metanol ekstresi üzerinde HPLC analizi yapmışlar ve baskın bileşen olarak klorojenik asit tespit etmişlerdir (Arsenijević, Slavkovska, & Milenković, 2022).

Blazewicz ve ark. Polonya'da yaptıkları bir başka araştırmada Herba Hyssopi' nin metanol ekstresinden HPLC – DAD yöntemi ile fenolik asit analizi yapmış gallik,

protokatekuik, gentisik, klorojenik, kafeik, ferulik, rosmarinik asitleri ve miktarlarını tespit etmişlerdir. (Redakcyjny, n.d.) (Baj et al., 2011)

Benea ve arkadaşlarının Moldova’da yaptıkları bir başka çalışmada *H. officinalis* L.'nin pembe, beyaz ve mavi çiçekli toprak üstü kısımlarından maserasyon yöntemi ile etanol ekstresi hazırlanmış, ince tabaka kromatografisi yöntemiyle kafeik ve klorojenik asit tespit edilmiştir (Benea, Ciobanu, Ciobanu, Pompus, & Cojocaru-Toma, 2022)

Babich ve arkadaşlarının Rusya’da yaptıkları çalışmada *Hyssopus officinalis*'in kallus kültürleri seçilmiş olup zufa otunun toprak üstü kısımları etanolik bileşikler olan ferulik asit, izokersitrin, rutin, kersetin, kersetin-7-O-glukozit ve luteolin verimlerini hesaplamışlardır (Babich et al., 2021).

Fathiazad ve arkadaşlarının İran’da çiçeklenme döneminde toplanıp kurutulan zufa otunun toprak üstü kısmının hidrometanolik ekstresi üzerinde yaptığı analizde majör bileşen olarak apigenin 7-O- β -D-glukuronid’ i tespit etmişlerdir (Fathiazad, Mazandarani, & Hamedeyazdan, 2011b).

Bitki Adı	Kullanılan Kısım	Ekstre	Tayin Yöntemi	Bileşik	Miktar	TPC(Total Fenolik bileşik Miktarı)	TFC(Total Flavonoit Bileşik Miktarı)	Yetiştigi Ülke	Litaratür
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Etanol	HPLC-MS Folin-Ciocalteu	Ferulik asit İzokersitrin Rutin Kersitrin Kersetin Luteolin	36.92 ± 1.0 32.78 ± 0.23 21.93±0.72 4.02 ± 0.07 1.79 ± 0.03 2.25 ± 0.03 (µg/g ekstre)	77.72 ± 1.83 mg GAE/g ekstre	1.30 ± 0.10 mg RE/g ekstre	Romanya	(Vlase et al., 2014)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	MAE BAE SE MC	Folin-Ciocalteu			60.35 ± 1.12 53.75 ± 1.98 47.44 ± 2.01 42.80 ± 1.34 (mg GAE/g)		Hindistan	(Nile et al., 2017)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Etanol	HPLC-DAD	Kaftarik asit, Klorojenik asit, Rosmarinik asit	307.53 ± 46.24 7397.38 ± 231.99 59.50 ± 26.14 (µg/g ekstre)			italya (Civitarenga)	(Guerrini et al., 2021)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Etanol	HPLC-DAD	Kaftarik asit, Klorojenik asit, Rosmarinik asit	285.79 ± 6.29 3684.78 ± 9.04 278.01 ± 8.45 (µg/g ekstre)			İtalya (Navelli)	(Guerrini et al., 2021)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Etanol	HPLC-DAD	Kaftarik asit, Klorojenik asit, Rosmarinik asit	212.59 ± 0.39 3300.20 ± 42.22 523.96 ± 2.50 (µg/g ekstre)			İtalya (Campo di Giove)	(Guerrini et al., 2021)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Etanol	Spektrofotometrik	Kersetin 7-O-β-D-apiofuranosil-				Çin (Uygur)	(Wang & Yang,

				(1 - 2))-β-Dksilopiranosid kersetin 7-O-β-D-apiofuranosil-(1-2)-β-D-ksilopiranosid 30 -O-β-D-glukopiranosid (2)					2010)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Metanol	Fizikokimyasal ve Fitokimyasal analiz HPTLC miktar tayini	Alkaloit Tanen Şeker Nişasta Ferulik asit Kafeik asit	% 0.99 %1.75 %1.96 %0.68 % 0.034 % 0.0064			Hindistan	(Srivastava et al., 2018)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Etanol	HPLC	Ferulik asit, İzokersitrin Rutin Kersetin, kersetin-7-O-Glukozit Luteolin	31.15 27.62 19.75 1.14 0.67 1.98 (µg/g ekstre)			Rusya	(Babich et al., 2021)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Hidrometanol	Folin-Ciocalteu	Apigenin 7-O-β-D-glukuronid				İran	(Fathiazad et al., 2011a)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	Metanol	LC-DAD-MS			64.1 ± 1.3 ^a - 112.0 ± 1.6 ^c (mg GAE/g)		Karadağ	(Mićović et al., 2021)
<i>H.officinalis L.</i>	Herba(Beyaz çiçekli) Herba(pembe çiçek)	Etanol	Folin-Ciocalteu			36.111±0.314 33.078±0.620		Moldova	(Benea et al., 2022)

	Herba (mavi çiçek)					39.056±0.894 mg GAE/g)			
<i>H.officinalis L.</i>	Herba	CE WE MWE	Folin–Ciocalteu Aliminyum klorür HPLC (metanol ekstre)	Klorojenik asit Kafeik asit p-kumarik asit Protokatekuik asit	166.21 µg g ⁻¹ 111.09 µg g ⁻¹ 6.95 µg g ⁻¹ 5.67 µg g ⁻¹	4.19 ± 0.03 4.70 ± 0.04 4.26 ± 0.06 (%)	1.15 ± 0.005 1.30 ± 0.001 1.25 ± 0.002 (%)	Türkiye (Rize)	(Hatipoğlu et al., 2013)

Tablo 1. *Hyssopus officinalis* L. üzerinde kimyasal bileşenlerine yönelik yapılan çalışmalar ve sonuçları

RE :Rutin eşdeğer

QE :Kersetin eşdeğer

HPTLC :High performance thin layer chromatography

LC-DAD-MS :liquid chromatography with diode array and mass spectrometry analizi

Hekzan ekstresi (HE), kloroform ekstresi(CE), su ekstresi (WE), Metanol–su ekstresi (MWE)

Uçucu yağ içeriği;

Gümüşhane’de toplanıp kurutulan zufa otunun toprak üstü kısımları klevenger tip aparat kullanılarak 4 saat boyunca hidrodistilasyon yöntemine tabi tutarak elde edilen uçucu yağ GC-MS yöntemiyle analiz edilmiş 24 bileşenden oluşan uçucu yağ içerikleri belirlenmiş bunlardan pinokarvon (%29.2), trans-pine kamfon (% 27.2), β -pinen (% 17.6), cis-pinokamfon (% 4.7) ve mirsen (% 2.92) major olarak tespit edilmiştir (Figueredo, Musa Özcan, Chalchat, Bagci, & Chalard, 2012).

Kızıl ve arkadaşları Diyarbakır’da yetiştirilen çiçeklenme döneminde toplanıp gölgede kurutulan Zufa otundan hidrodistilasyon ile elde ettikleri uçucu yağ GC-MS ile analiz etmişler 34 bileşenden oluşan % 99.83 oranında tespit edilen ve % 86.54 ünü oluşturan izopinokamfon (% 57.27), β -pinen (% 7.23), terpinen-4-ol (% 7.13), pinokarvon (% 6.49), karvakrol (% 3.02), p-simen (% 2.81) ve pinokamfon (% 2.59) bileşenlerini major bileşen olarak bulmuşlardır (Kızıl, Haşimi, Tolan, Kiliç, & Karataş, 2010).

Özer ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada Gümüşhane Köse’den çiçeklenme döneminde toplanıp kurutulan Zufa otunun toprak üstü kısımlarını klevenger tip aparat ile 3 saat süre hidro distilasyona tabi tutmuş ve % 1.13 verimle uçucu yağını elde etmişlerdir. GC-MS ile analiz ettikleri uçucu yağın % 91’i tanımlanmış ve toplamda 34 bileşenden oluşan içeriğinin ana bileşenlerini pinokarvon (% 36.3), pinokamfon (% 19.6), β -pinen (% 10.6), 1,8-sineol (% 7.2) ve izopinokamfon (% 5.3) olarak tanımlamışlardır (Hakan Özer, Şahin, Kiliç, & Güllüce, 2005).

Guerrini ve arkadaşları 2017 yılında İtalya’nın Civitaretenga bölgesinden toplanan ve 2019 yılında İtalya’nın Campo di Giove ve Navelli bölgelerinden toplanan Zufa otunun makroskobik ve mikroskobik özellikleri, uçucu yağ verim ve içerikleri ve antioksidan aktivitelerini karşılaştırmıştır. Kurutulmuş toprak üstü kısımlarından hidrodistilasyon yöntemiyle uçucu yağ elde edilmiş ve verimleri sırası ile % 0.70, % 0.40 ve % 0.28 olarak bulmuş ve GC-MS analizi ile tespit edilen majör bileşenleri de sırası ile (-)-limonen-10-il-asetat (% 67.9), metil öjenol (% 41.5), ve izo-pinokamfon (% 43.2)’dur. GC-MS analizinde toplamda 44 bileşen belirlenmiştir

Civitaretenga bölgesinden toplanan bitki uçucu yağ majör bileşenleri (-)-limonen-10-il-asetat (% 67.9), 1,8-sineol (% 15.5), limonen (% 5.8), limonen-10-ol (% 2.8), limonen-10-ol metil eter (% 1.9), β -pinen (% 1.7) ve germakren D (% 1.2)'dir

Navelli bölgesinin uçucu yağ majör bileşenleri cis-pinokamfon (%43,2), metil öjenol (% 15.8), trans-pinokamfon (% 11.0) ve 1,8-sineol (% 4.4); Campo di Giove bölgesinin uçucu yağ majör bileşenleri ise metil öjenol (% 41.5), 1,8-sineol (% 39.7) 'dir (Guerrini et al., 2021)

Diyarbakır Dicle üniversitesinde yetiştirilip hasat edilen Zufa otunun bitki gelişiminin farklı dönemlerinde taze ve kuru herba verimi, yine farklı dönemlerdeki uçucu yağ verimleri ve bileşenleri GC-MS ile tespit edilmiştir. Uçucu yağ verimi % 0.70-1.22, major bileşikler ise en çok iso-pinokamfon (% 26.88-53.61) olmakla beraber β -pinen, simol, 1.8-sineol, cis-ocimen, mirsenol, homomirsenol, elemol ve sabinen 'dir (Bährle-Rapp, 2007) .

Bitki Adı	Kullanılan Kısım	Uçucu Yağ Elde Yöntemi	Uçucu yağ verimi %	Tayin Yöntemi	Toplam Tanımlanan Bileşenlerin Oranı	Tanımlanan Bileşenlerin Sayısı	Ana Bileşikler %	Yetiştigi Ülke	Literatür
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Herba	Hidrodistilasyon	% 2.29	GC-MS	% 93.69	24	Pinokarvon (%29.2), trans-pine kamfon (% 27.2), β -pinen (% 17.6), cis-Pinokamfon (% 4.7	Türkiye (Gümüşhane)	(Figueredo et al., 2012)
	Herba	Hidrodistilasyon	-	GC-MS	% 99.83	34	İzo pinokamfon (% 57.27), β -pinen (% 7.23), terpinen-4-ol (% 7.13), pinokarvon (% 6.49)	Türkiye (Diyarbakır)	(Kızıl et al., 2010)
<i>L. subsp. angustifolius</i> (Bieb.)	Herba	Hidrodistilasyon	% 1.13	GC-MS	% 91	34	Pinokarvon (% 36.3), Pinokamfon (% 19.6), β -pinen (% 10.6), 1,8-sineol (% 7.2) ve izopinokamfon (% 5.3)	Türkiye (Gümüşhane)	(Hakan Özer et al., 2005)
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Herba	Hidrodistilasyon	-	GC-MS	% 94.3	32	Cis-pinokamfon (%28.1) ve pinokarvon (%20.3), β -Pinen (%15.1),ökoliptol (%8.5)	Türkiye (Rize)	(Hatipoğlu et al., 2013)
	Herba	Hidrodistilasyon	% 0.70-1.22	GC-MS	%90.90-99.98	55	İso pinokamfon (% 26.88-53.61) β -pinen (% 15.29-16.33)	Türkiye (Diyarbakır)	(Bährle-Rapp, 2007)

<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Herba	Hidrodistilasyon	%0.30-0.54	GC-MS		26	1,8-sineol (%51,89) veβ-mirsen (%8,84) germakren D (%6.27), γ-elemen (%6.10)	Türkiye (Isparta)	(Kara et al., 2014)
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Herba	Hidrodistilasyon	%2.2	GC/GC-MS	%98.6	51	Pinokarvon (27.1%) β-pinen (19.0%), izopinokamfon (13.6%),	Türkiye (Kastamonu)	(Kürkçüoğlu, Eser, & Başer, 2016)
	Herba	Hidrodistilasyon	% 0.70, % 0.40 ve % 0.28	GC-MS	%99.3-98.9-99.6	44	(-)-limonen-10-il-asetat (% 67.9), metil öjenol (% 41.5), ve izo-pinokamfon (% 43.2) ‘	İtalya Civitaretenga, (Navelli , Campo di Giove)	(Guerrini et al., 2021)
	Herba	Hidrodistilasyon	%0.8	GC-MS	%91.73	36	Cis-pinokamfon (%45.45)elemol(%13.16)	Polonya	(Wesołowska et al., 2010)
	Herba	Hidrodistilasyon	%1.3	GC-MS	%99.97	20	Mirtenilastat(%74.08), Kafur(6.76)	İran	(Fathiazad et al., 2011a)
	Herba	Hidrodistilasyon		GC-MS	%99.99	33	Cis-pinokamfon (26.85 %), β-pinene (20.43 %), trans-pinokamfon (15.97%), α- elemol (7.96 %),	Mısır	(Zawislak, 2016)
	Herba	Buhar distilasyonu		GC-MS	%98	46	Cis-pinokamfon (48.98–50.77%), β-pinene (13.38–13.54%), pinokamfon(5.78–5.94%)	Bulgaristan	(Hristova et al., 2015)
	Herba (Fransa)	Distilasyon		GC/GC-MS		14	1-8 sineol(%12.3) Linalol(%51.7) Limonen %5.1 İzopinokamfon (%43.3)	Fransa/ İtalya	(Mazzanti, Battinelli, & Salvatore, 1998)

	Herba (italya)					13	Limonen (%12.2) β -pinene %11.1		
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Herba	Buhar distilasyonu	%0.66	GC/GC- MS		57	Metilöjonol (38.3%), limonen (37.4%) β -pinene(9.6%).	Karadağ	(Gorunovic, Bogavac, Chalchat, & Chabard, 1995)
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	Herba	Hidro distilasyon	%1.14	GC/GC- MS		33	1,8-sineol (52.89%) P-pinene (16.82%)	İspanya	(Vallejo, Herraiz, Pérez- Alonso, & Velasco- Negueruela, 1995)

Tablo 2. *Hyssopus officinalis* L. uçucu yağlarının kimyasal analizleri

2.3. Biyolojik Aktiviteleri

2.3.1. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite ve Alzheimer Hastalığı

İlk olarak 1907 yılında Alman psikiyatr ve nöropatolog olan Alois Alzheimer tarafından tanımlanan geri dönüşümü olmayan ölümcül serebral bir hastalık Alzheimer hastalığı (AH), yakın zaman hafıza kaybı ile başlayan (günlük hayat sırasında anlık unutmalar) davranışsal ve işlevsel bozukluklarla karakterize demansın en yıkıcı türüdür (DEMİR & TÜRKAN, 2022; Perry, Court, Bidet, Court, & Perry, 1996). Yakın bellek kaybı ile başlayan hastalığın ilk evreleri günlük rutinlerde yaşanan unutkanlıklar ile başlayıp ilerleyen evrelerde yeni bilgilerin öğrenilememesi, unutkanlığa bağlı sorunları çözememe, hastalığı kabullenmeme, davranışsal ve psikolojik sorunların da eşlik ederek temel ihtiyaçlarını yerine getiremez duruma gelir. Başkasına bağımlı yaşamaya başlamak yatağa bağımlı yaşamla devam eder. Temel yaşamsal faaliyetlerin de unutulmaya başlaması ile beraber idrar yolu enfeksiyonu, akciğer enfeksiyonu gibi hastalıklarının da eşlik etmesi sonucu kaçınılmaz bir son olan ölümle sonuçlanır (DEMİR & TÜRKAN, 2022). 65 yaş üzerinde sıklıkla görülen hastalık yaş ilerledikçe görülme olasılığı katlanarak artmaktadır. Genetik faktörler, ileri anne yaşı, alkol kullanımı ve depresyon, miyokard infarktüsü, atriyal fibrilasyon, Down sendromu ve kafa travması olası risk faktörleri arasındadır. Akdeniz diyeti ile beslenmek, egzersiz yapmak ve bilişsel aktivite AH'nı önlemede yardımcı olabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (Özkay, Öztürk, & Can, 2011).

Alzheimer hastalığı yapısal bozukluklar (D-amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklar) ve nörokimyasal bozukluklar (serebral kortekste asetilkolin aktivitesinin azalması) ile karakterizedir (Perry et al., 1996). Nörofibril yumakları ve amiloid plaklarının artmasına bağlı olarak nöro inflamasyon oluşması, oksidatif strese bağlı hücre ölümünün hastalığın oluşmasında rolleri vardır (DEMİR & TÜRKAN, 2022).

Asetilkolin nikotinik ve muskarinik reseptörleri uyaran nörotransmitter maddedir. Asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) asetilkolini asetat ve koline parçalayan enzimlerdir. Asetilkolin (Ach) bilişsel yeteneklerle ilişkilendirilen bir nörotransmitter madde olduğu için AChE ve BChE enzimlerinin fazla aktivasyonuna

bağlı ortamdan uzaklaştırıldığında AH'lığının oluşumunda etkili olmaktadır. Bu nedenle günümüzde kullanılan çoğu ilacın etki mekanizması kolinerjik hipoteze dayandırılır (DEMİR & TÜRKAN, 2022). Normal sağlıklı bir insan beyinde Ach üzerinde AChE, BChE' ye göre daha fazla aktivite göstermekte iken AH olan kişide BChE aktivitesinin AChE'ye göre daha fazla aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. O nedenle AH tedavisinde her iki enzim üzerinde inhibisyon etkinin sağlanması hastalığın gelişmesi ve ilerlemesinde daha etkili olacaktır. (Greig et al., 2001) AH'nın tedavisinde FDA onaylı bitkisel kaynaklı (rivastigmin, galantamin) ve sentetik üretilen (takrinin, donepezil) ilaçlar kullanılmaktadır. İlaçların yan etkilerinin fazla olması ve beklenen tedaviyi gerçekleştiremedikleri için bitkisel kaynaklı ilaçlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Antioksidan, antiinflamatuvar, bilişsel güçlendirici, yaşlanma karşıtı, kolinerjik aktiviteye sahip bitkilerin yer aldığı Lamiaceae familyası önemli bir yere sahiptir (TOPCU & KUSMAN, 2014).

Wszelaki, Kuciun ve Kiss'in Herba Hyssopi droğunun metanol ve hekzan ekstraktlarının ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemi ile AChE ve BChE üzerindeki inhibitör aktiviteyi değerlendirmiş hekzan ekstresinde daha anlamlı bir bulguya rastlamıştır (Wszelaki, Kuciun, & Kiss, 2010)

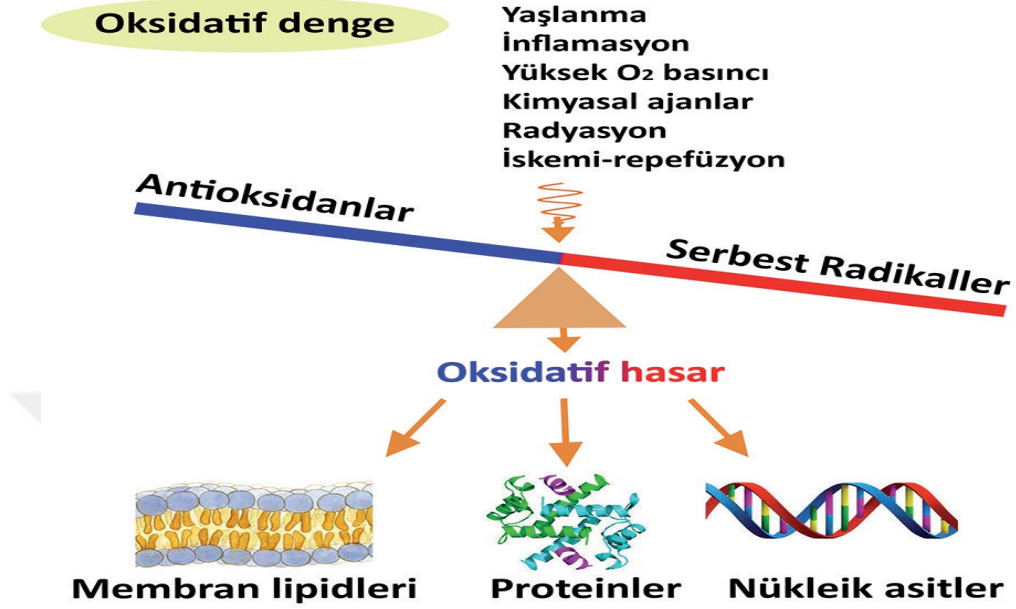
Hafıza ve damansın kolinerjik aktivite ile olan bağlantısından dolayı kolinerjik aktiviteye bağlı insektisit (Ortiz de Elguea-Culebras et al., 2018) ve antihelmintik (Filip, Rinaldi, & Castagna, n.d.) özelliklere sahip *Hssopus officinalis* L ' in uçucu yağı ve Herba Hyssopi'nin etanol ekstresi alzheimer üzerine etkinliği spektrofotometrik olarak değerlendirilmiş asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek etkin olduğu görülmüştür.(Perry et al., 1996)

2.3.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Aktivite

Atomlar pozitif yüklü proton ve yüksüz nötrondan oluşan bir çekirdek ile çekirdek etrafında negatif yüklü elektron bulutundan oluşurlar. Elektronların yoğun şekilde bulundukları yörüngeye orbital adı verilir. Elektron çiftleri birbirine zıt hareketli dengeli şekilde bu orbitallerde hareket halindedirler. Herhangi bir elektron alışverişinde bu denge bozulur ve dengeyi oluşturmak için farklı ortam ve moleküllere ilgileri artar. Eşleşmemiş elektronu olan bu molekül yapılarına radikal adı verilir. Dış orbitallerdeki bu ilgi kimyasal ve biyokimyasal tepkimelere ortam

sağlar (Cheeseman ve Slater, 1993). Aerobik canlılar hayatta kalabilmek için havadaki moleküler oksijenden (O_2) faydalanırlar. Moleküler oksijen dış orbitalinde iki eşleşmemiş (ortaklanmamış) elektrona sahiptir. Ortaklanmamış elektrona sahip atom, atom grupları veya molekül serbest radikal olarak adlandırılır. Moleküler oksijen biradikal yapısından kaynaklı güçlü reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türlerine (ROT) radikal yapıda olan süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\cdot$) ve radikal yapıda olmayan Hidrojen peroksit (H_2O_2), Singlet oksijen (O_2) örnek olarak verilebilir. Serbest radikaller endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler. Endojen kaynaklı serbest radikalleri ; mitokondride oksijenli solunum sırasında, vücutta inflamasyon oluşması sırasında, enzimlerin katalitik döngüsü sırasında (Örnek; ksantin oksidaz) oluşabilir, düz kas hücreleri tarafından üretebilir, endoplazmik retikulumda üretilir, stres ve yorgunluk oluşturabilir ve immun sistem hücreleri oluşturabilir. Eksojen kaynaklı olanlar ise, UV ışınları, X-rays, ve mikrodalga ışını, organik maddelerin yakılması kaynaklı, orman yangınları sonucu, asbest ozon gibi hava kirletici ajanlar tarafından üretilir. Temizlik ürünleri, tutkal, boya maddeleri, parfümler ve insektisitler, su kirletici ajanlar, alkol, sigara, egzoz ve sigara dumanları tarım ilaçları da eksojen kaynaklı serbest radikal üretebilirler. Endojen ve eksojen olarak sürekli üretilirler (Karabulut & Gülay, 2016)

Reaktif oksijen türleri düşük yoğunluklarda bulunduklarında yararlarından söz edilebilir. Gösterdikleri yararları arasında; enfeksiyonlara karşı koruma, kanser hücrelerini öldürme, mitokondride ATP üretimi, intrasellüler depolardan Ca'un salınması, büyüme faktörleri sinyalleri üretimi üzerindeki rollerinden bahsedilebilir. Birikmesi ve yüksek yoğunluklara çıktıklarında ise zararlarından söz edilebilir (Fang, Yang, & Wu, 2002) ((Valko et al., 2007)(Devasagayam et al., 2004). Endojen veya eksojen kaynaklı aşırı miktarda üretildiklerinde karbonhidratlar, proteinler, lipidler ve genetik şifreye sahip DNA gibi ana hücre yapılarının zarar görmelerine neden olurlar (Valko et al., 2007). Zarar gören yapıları bozulan hücreler işlevlerini yerine getiremez hale gelir ve bunun sonucunda hızla yaşlanma ile beraber kanser, kalp ve damar hastalıkları, diyabet, obezite, nörodejeneratif hastalıklar (parkinson, alzheimer), akciğer ve immun sistemin zayıflamasına bağlı hastalıklar oluşabilir (Cross et al., 1987) .



Şekil 6. Oksidatif denge
(Özcan, Erdal, Çakırca, & Yönden, 2015)

Alinezhad ve arkadaşları (2013) Zufa otunun çiçek yaprak ve köklerinin etanol ekstresi üzerinden DPPH deneyi ile antioksidan aktivitesini test etmiş ve tüm ekstraktların standart maddelerle karşılaştırıldığında iyi bir antioksidan aktivite sergilediği ve buna bağlı olarak iyi bir antihemolitik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Alinezhad et al., 2013).

27 farklı tıbbi ve aromatik bitkiyle yapılan bir çalışmada bitkilerin kurutulmuş droglarından metanol ekstresi hazırlanmış toplam fenolik ve flavonoid bileşik içerikleri ölçülmüş, HPLC analizi ile içeriklerindeki bileşikler tespit edilmiş antioksidan aktivite testi (Rancimat test) ve antimikrobiyal ve antibakteriyel özellikleri ölçülmüştür. Zufa otunda fenolik asitlerden, gentisik asit, kafeik asit, syringik asit, ferulik asit, p- hidroksibenzoik asit flavonoid bileşiklerden apigenin, (+)-kateşin ve (-)-epikateşin tespit edilmiştir. İçeriklerine istinaden iyi bir antioksidan

aktivite ile düşük antibakteriyel ve antimikrobiyal aktivite özellikleri gösterdiği bulunmuştur (Proestos, Chorianopoulos, Nychas, & Komaitis, 2005).

Farklı renkteki çiçeklerdeki Herba Hyssopi'nin maserasyon yöntemiyle etanol ekstraktları hazırlanmış, kimyasal içerikleri karşılaştırılmış ve antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemi ile ölçülmüştür. IC₅₀ değerleri tespit edilmiş iyi bir antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmiştir (Benea et al., 2022).

Unani tıp sisteminde yaygın kullanılan 10 şifalı bitki ile yapılan çalışmada Herba Hyssopi droğu ile de çalışılmış 3 farklı ekstraksiyon yöntemiyle ekstraktları hazırlanmış kimyasal içeriği, antioksidan aktivitesi, sitotoksik aktivitesi, enzim inhibitör aktivite testleri yapılmıştır. Antioksidan aktivitesi $\mu\text{mol Trolox/g}$ ekstre olarak iyi bir veri elde edilmiştir (Nile et al., 2017).

2.3.3. Diğer Aktiviteleri

Zufa otunun kurutulmuş toprak sütü kısmının hidroalkolik ekstresi ile sıçanlar üzerinde yapılan deneyde pentilentetrazol (PTZ) kaynaklı nöbetlere karşı etkisi değerlendirilmiştir. Üç farklı dozda 14 günlük ekstre enjeksiyonu uygulaması sonucu *H. officinalis* özütünün tonik nöbet eşiğini arttırdığı ve PTZ'ye bağlı ölüm oranını azalttığı, öğrenmeyi ve hafızayı iyileştirdiği antiepileptik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Fatahinezhad et al., 2022).

Kurutulmuş zufa otunun yapraklarının hidroalkolik ekstresinin deney sıçanlarında indometasin kaynaklı mide ülserinde gastroprotektif aktivitesinin değerlendirilmesi yapılmış, deney sıçanları her grup beş sıçandan oluşacak şekilde rastgele altı gruba ayrılmıştır. Gruplardaki dişi Sprague Dawley sıçanlarına 10 gün boyunca oral olarak 1.gruba 1 mL/kg/gün %1 CMC (karboksi metil selüloz), 2.gruba 1 mL/kg/gün %1 CMC, 3. Gruba 250 mg EEHO/kg/ , 4. Gruba 500 mg EEHO/kg/gün, 5.gruba 50 mg ranitidin/kg/gün ve 6.gruba 500 mg EEHO/kg/gün verilmiştir. Daha sonra grup I ve VI dışındaki tüm gruplara 11. günde 20 mg indometazin/kg oral olarak uygulanmıştır. Sıçanların mideleri çıkarılmış incelenmiştir. Ülser endeksi ve mukus bariyeri belirlenmiş antioksidan parametreler tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), glutasyonu azaltılmış (GSH), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) değerlendirilip karşılaştırmalar yapılmış Zufa otunun oksidatif stresi azaltarak mide

mukozasını güçlendirdiği ve buna bağlı olarak ranitidin ile karşılaştırılabilir düzeyde gastroprotektif aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tahir, Rahman, & Khushtar, 2022)

Ma ve arkadaşlarının kronik astımlı hale getirilen deney sıçanları üzerinde yaptıkları araştırmada Zufa otunun eozinofil istilasını engelleyerek ve immunoglobulin E düzeylerini azaltarak anti-inflamatuar bir rol oynamakla birlikte bağışıklık sistemini de düzenleyici etki göstermiştir (Ma et al., 2014).

Çift-kör randomize klinik bir araştırmada astımı olan kırk altı çocuğa (7-12 yaş arası) Zufa otunun da bulunduğu bitkisel karışım düzenli olarak verilmiş plasebo grubu ile sonuçlar karşılaştırılmış astıma bağlı gece uyanmalarını ve öksürüğü azalttığı gözlemlenmiştir (Javid et al., 2019).

Zufa otunun su ekstresinin Anti-HIV ve uçucu yağının (izopinokamfon ve 1-pinokamfon) Anti-HSV-1 gibi antiviral özelliği bulunmaktadır (Bekut et al., 2018).

Uçucu yağının linalool içeriği ile böcek öldürücü, uçucu yağ yapısında bulunan terpenik yapıdaki bileşiklerden kaynaklı antibakteriyel antimikrobiyel ve antifungal etki (Fathiazad et al., 2011a), bitki ekstresinin akciğer ve kolon kanser hücreleri ile yapılan çalışmalarda ve uçucu yağı ile yapılan çalışmalarda antikanser aktiviteleri bulunmaktadır (Fathiazad & Hamedeyazdan, 2011; Mićović et al., 2021) .

Uçucu yağ içeriğinde bulunan terpenik yapıdaki bileşikler sitotoksik (örn.sabinen, 1,8-sineol, terpinen-4-ol), antiproliferatif özelliğiyle kontrolsüz hücre çoğalmasını engelleyici (Örn.cis- ve trans-thujon, p-simen), apoptozu indükleyici özelliğiyle programlı hücre ölümünü sağlayıcı (örn., α -pinen, cis- ve trans-tujon) olarak antikanser aktivite gösterir (Guerrini et al., 2021).

Bitki Adı	Kullanılan Kısım	Farmakolojik Aktivite	Yöntem	Bulgu	Yetiştigi	Literatür
<i>H. Officinalis</i> L.	Herba(Etanol ekstre)	Antioksidan Aktivite	DPPH ABTS	IC ₅₀ (39.31 – 51.71) (µg/mL) IC ₅₀ (10.79 – 20.15) (µg/mL)	İtalya	(Guerrini et al., 2021)
	Herba (Etil asetat ekstre) Herba(N-Butanol ekstre)	Antioksidan Aktivite	DPPH	IC ₅₀ (103×10 ⁻³) IC ₅₀ (25×10 ⁻³) (mg mL ⁻¹)	İran	(Fathiazad et al., 2011a)
	Herba (Metanol ekstre)	Antioksidan Aktivite	DPPH FRAP	IC ₅₀ = 56.04–199.89 µg/mL FRAP = 0.667–0.959 mmol Fe ²⁺ /g).	Karadağ	(Mićović et al., 2021)
	Herba (metanol ekstre)	Genotoksik Antigenotoksik Sitotoksik	Comet tahlili, Comet tahlili MTT test	+ + +	Karadağ	(Mićović et al., 2021)
	Herba (MAE ekstre) (UAE ekstre) (SE ekstre) (MC ekstre)	Antioksidan Aktivite Anti-kanserojen	DPPH/ Reducing ability/ b-Carotene–linoleic acid Superoxide dismutase (SOD) enzyme inhibition MTT tahlili	296.5 ± 3.12 ^b / 190.5 ± 1.99 ^d / 105.6 ± 2.10 ^b 285.6 ± 2.14 ^a /185.6 ± 2.01 ^b / 90.6 ± 1.34 ^d 226.8 ± 2.56 ^d / 170.8 ± 1.55 ^c / 84.7 ± 1.12 ^a 206.8 ± 2.64 ^c / 161.3 ± 1.39 ^a / 76.2 ± 1.04 ^d (µmol Trolox/g)	Hindistan	(Nile et al., 2017)

				% 70.2		
				% 82		
<i>H. Officinalis</i> L.	Herba(Beyaz çiçekli) Herba(pembe çiçek) Herba (mavi çiçek) (Etanol ekstre)	Antioksidan Aktivite	DPPH	IC ₅₀ ,mg/ml M±SD 34.774±1.954 IC ₅₀ ,mg/ml M±SD 34.172±0.682 IC ₅₀ ,mg/ml M±SD 38.091±0.288	Moldova	(Benea et al., 2022)
	Herba WE Herba MWE Herba CE	Antioksidan Aktivite	DPPH	IC ₅₀ 18.80, IC ₅₀ 28.80 IC ₅₀ 250 µg ml ⁻¹ ,	Türkiye (Rize)	(Hatipoğlu et al., 2013)
	Yaprak (Etanol ekstre)	AChE inhibisyonu	Ellman Yöntemi	%I 2.5 µg/mL	Londra	(Perry et al., 1996)
	Herba (metanol ekstre) Herba(Hekzan ekstre)	AChE İnhibisyonu (100 µg/mL ve 400 µg/mL de) BChE İnhibisyonu (100 µg/mL ve 400 µg/mL de)	Ellman Yöntemi	% I = % 5.2 / % 13.2 (metanol ekstre) %I = % 29.6 / % 55 (hekzan ekstre) % I = %11.5 / % 31.8 (metanol ekstre) % I = %23.2 / % 51.7 (hekzan ekstre)	Polonya	(Wszelaki et al., 2010)

<i>H. Officinalis</i> L.	Yaprak (etanol ekstre)	Gastroprotektif aktivite	Sıçan deneyi tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), glutasyonu azaltılmış (GSH), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD)	+	İran	(Tahir et al., 2022)
	Herba (Su ekstresi) Uçucu yağ	Anti-HIV Anti viral		+		(Bekut et al., 2018)
	Yaprak (metanol ekstre) Uçucu yağ (su-distilasyonu)	Antimikrobiyal aktivite Anti fungicid Antibakteriyel	Disk difüzyon deneyi Mikro kuyucuk seyreltme deneyi Mic agar seyreltme deneyi	+	Türkiye (Gümüşhane)	(H. Özer et al., 2006)
	Herba (Etanol ekstresi)	Antidiyabetik aktivite	Sıçan deneyi (SABCA1 ve ABCG1 genlerinin modülasyonu , C-fos ve GSK-3β'nin gen ifadesi)	+	Hollanda	(Abdel-Megeed et al., 2020)
	Herba (Su ekstresi)	Antikonvülzan aktivite	Sıçan deneyi İnos Gen ekspresyonu	+	İran	(Gholami, Azhdari-Zarmehri, & Sadegh, 2019)

Tablo 3. *Hyssopus officinalis* L. bitkisine ait biyolojik aktivite çalışmaları

FRAP tests : ferric reducing/antioxidant power

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

MTT test : 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide dye

Comet assay : single-cell gel electrophoresis

Hekzan ekstresi (HE), kloroform ekstresi(CE) , su ekstresi (WE), Metanol–su ekstresi (MWE)

Gereç ve Yöntem

3.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Kimyasalların Listesi

Aşağıda farklı deneylerde kullandığımız alet, cihazlar ve kimyasallar tablolar halinde verilmiştir.

Kimyasal Madde Adı	Menşei
Hidroklorik Asit	Sigma
% 10 Sülfürik Asit	Merck
%15.8 Amonyum Karbonat	Merck

Tablo 4. Kalite Kontrol Testlerinde kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasal Madde Adı	Menşei
Gallik asit monohidrat	Sigma
Sodyum karbonat	AFG Bioscience
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Sigma
Metanol	Sigma

Tablo 5. Total fenolik bileşik miktar tayini çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasal Madde Adı	Menşei
Alüminyum Klorür	Merck
Kersetin	Sigma
Potasyum Asetet	Sigma
Metanol	Sigma

Tablo 6. Total flavonoit yapıda bileşik miktar tayini çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasal Madde Adı	Menşei
Apigenin	TCI
Rutin	Sigma
Metanol	Sigma
Fosforik asit	Merck

Tablo 7. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile apigenin ve rutin miktar tayini çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Kimyasal Madde Adı	Menşei
Dipotasyum fosfat	Sigma
Sodyumdihidrojen fosfat	Riedel
Sodyum klorür	Merck
Tween 20	Sigma
Disodyumhidrojen fosfat	Merck
5.5'-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)(DTNB)	Sigma
Asetiltiyokolin iyodür	Sigma
S-Bütürlitiyokolin iyodür	Sigma
Asetilkolinesteraz enzimi	Sigma
Bütürlilkolinesteraz enzimi	Sigma
Metanol	Sigma

Tablo 8. Asetilkolinesteraz ve bütürlilkolinesteraz enzim inhibitör aktivite çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kimyasal Madde Adı	Menşei
Fetal Sığır serumu	FBS
L-Glutamin	Gibco
Penisilin	İnvitrogen
Streptomisin	İnvitrogen
Tripan mavisi solüsyonu	Biowest
Dulbecco Modifiye Eagle solüsyon(DMEM)	Lonza
Trolox çözeltisi	Sigma
Hidrojen Peroksit	Sigma
2,2'Azino-Bis(3-Etilbenztiyazolin-6-Sülfonikası)	
5-(3-Karboksimetoksifenil)-2-(4,5-Dimetil-Tiyazolil)-3(4-Sülfofenil)	
Bikinkoninik asit kiti	
SH-SY5Y, ATCC CRL-2266	
Sığır Serum Albumüni	Sigma

Tablo 9. Hücre kültürü çalışmaları ve antioksidan enzim aktivitesi çalışmasında kullanılan kimyasallar ve çözücüler

Kullanılan Alet ve Cihazlar	Marka
Cam Nem Kabı	Merek
Desikatör	Sigma
Etüv	Heraus
Analitik Terazı	Denver
Porselen Kroze	
Yakma Fırını	Elektromag
Süzgeç Kağıdı	Sartarius
Su Banyosu	
Balon Joje	

Cam Huni	
Pileli süzgeç Kağıdı	
Rotary Evaporatör	Buchi
Ultrasonik Banyo	BandelinSonorex
Cam Flakon	
Santrifüj Tüpü	
Spektrofotometre	SP3000NanoOptima
PH Kağıdı	İsolab
Mikropitet	Brand
Manyetik Karıştırıcı	Yellowline
Vorteks	IKA
12 Kuyucuklu Kültür Kapları	
96 Kuyucuklu Kültür Kapları	Greiner
Değirmen	Retsch GmbH SK1
Isıtıcı Plaka	Simbo
İnvert Mikroskop	
Laminar Hava Kabini	TermofisherScientific
Mikroplaka okuyucu	MultiskanGo,ThermoScientific
Mikroplaka okuyucu	VersamaxTunableMicroplatereader
PH Metre	WTW Inolab
Santrifüj	Hettich EBA 20
Total Antioxidant Status(TAS)	RelAssayDiyagnostik
	Gaziantep,Türkiye
Total Oxidant Status(TOS)	RelAssayDiyagnostik
	Gaziantep,Türkiye
Buhar distilasyon cihazı	Arbeitssteckdose

Tablo 10. Kullanılan alet ve cihazlar

3.2. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada **G1** kodu altında BAÇEM (Balıkesir Büyükşehir Belediyesi Çiftçi Eğitim Merkezi)’den temin edilen Balıkesir Burhaniye Börezli kırsalında yetiştirilip kurutulan Herba Hyssopi droğu ile **G2** kodu altında online alışveriş sitesinden temin edilen Herba Hyssopi drogları ile çalışılmıştır. Her iki örneğin teşhisini Prof. Dr. Serdar Gökhan ŞENOL yapmıştır.



Şekil 7. BAÇEM-Balıkesir’den temin edilen paketin görseli
(Üretim tarihi 01.08.2022)



Şekil 8. Online alışveriş sitesinden temin edilen paketin görseli
(Üretim tarihi 01.09.2022)

3.3. Makroskobik İnceleme

Her iki örnek için yapılan makroskobik incelemeler sonucunda G1 kodlu örneğin aromatik kokusu belirgin, mor çiçekleri ve yaprakları belirgindir. G2 kodlu örneğin ise aromatik kokusu bulunmamakta, çiçekleri ve yaprakları belirgin olarak görülememektedir.

3.4. Yöntem

Bu çalışmada Kalite Kontrol Testleri olarak; Kurutmada kayıp (nem) miktar tayini; Bütün kül miktar tayini; HCl’de çözünmeyen kül miktar tayini; Sülfat külü miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. Miktar Tayini Çalışmaları olarak; Total fenolik bileşik miktar tayini; Total flavonoit miktar tayini; Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile apigenin ve rutin miktar tayini; Biyolojik Aktivite Testleri olarak ; Asetilkolinesteraz ve bütürlkolinesteraz enzim inhibitör aktivite testleri; Hücre kültürü çalışmaları ile antioksidan enzim aktivitesi; Uçucu yağı ile ilgili olarak; Uçucu yağ bileşenlerinin GC-MS yöntemi ile analiz çalışmaları yürütülmüştür.

3.4.1. Kalite Kontrol Testleri

Herba Hyssopi drogları üzerinde kalite kontrol testleri kapsamında “*Avrupa Farmakopesi 8.0*” (European Pharmacopoeia 8.0, 2013) ve “*Türk Farmakopesi 2017*” (Türk Farmakopesi, 2017) ’de yer alan Kurutmada kayıp (nem) miktar tayini, total kül miktar tayini, HCl’de çözünmeyen kül miktar tayini, sülfat külü miktar tayini analizleri yapılmıştır. Analizler 2 ayrı drog için 3 paralel çalışma şeklinde çalışılmıştır.

3.4.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

Paralel üç çalışma şeklinde üç ayrı cam nem miktar kapları daraları alınmak üzere 1 saat süre ile 105 °C ‘de etüve konulmuş bu süre sonunda 30 dk desikatörde soğumaya bırakılıp tartımlar kaydedildi. Sabit vezne gelinceye dek (iki tartım arasındaki fark 0.5 mg’ı geçmemeli) bu işlem tekrarlanmış sabit vezne geldiğinde ölçümler kaydedildi. 1 gr toz drog konulup aynı işlem drogla beraber sabit vezne gelinceye kadar tekrar edilip ölçümler kaydedildi. Alınan sonuçlar nem miktar yüzde hesabına göre yapıldı ortalamaları alındı. Her iki droğun kurutmada kayıp % nem miktarları hesaplandı.

A: Kurutma Kabı Darası

B: Kurutma Kabı Darası + Drog Ağırlığı

C: Kurutma Kabı Darası + Son Drog Ağırlığı

B-C: Kurutmada Kayıp Miktarı

% Kurutmada Kayıp Miktarı = $(B-C) \times 100 / (B - A)$

3.4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayini

Her iki drog için 3 ayrı porselen kroze 600 °C fırında 1 saat tutulup yarım saat desikatörde soğumaya bırakıldı. Sabit vezne gelinceye kadar bu işlem tekrar edilmiş ölçümler kaydedildi. 1 gr tam tartım toz droglar önce 105 °C’de 1 saat etüvde nemi uzaklaştırıldı sonra 600 °C’de 1 saat fırında yakıldı. Desikatörde yarım saat

soğumaya bırakılıp tartımlar alındı. Bu işlem sabit vezne gelinceye kadar tekrar edildi. Alınan sonuçlar üzerinden kül miktar yüzdeleri hesaplandı ortalamaları alındı.

A: Porselen Kroze Darası

B: Porselen Kroze Darası + Drog Ağırlığı

C: Porselen Kroze Darası + Kül Ağırlığı

$$\% \text{ Bütün Kül Miktarı} = (C - A) \times 100 / (B - A)$$

3.4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

Önceden 600 derece fırında sabit vezne getirilen krozelerin daraları alındı. (A) İçerisine yaklaşık 1 gr tam tartım drog konuldu. (B) İçinde drog bulunan porselen krozeye 2 ml %10'luk sülfürik asit çözeltisi çeker ocak altında eklendi. Su banyosunda belli kuruluğa kadar tutulup çeker ocak altında duman çıkışı durana kadar tablalı ısıtıcıda yakıldı. 1 saat 600°C'de yakma fırınında tutuldu süre sonunda bir maşa yardımıyla alınan porselen krozeler 30 dk. desikatör içinde soğumaya bırakıldı. İçerisinde yanmış drog bulunan krozelere bir kaç damla %10'luk sülfürik asit damlatıp aynı işlemler tekrarlandı. Tekrarlanan işlem sonunda porselen krozelere %15.8'lik amonyum karbonat çözeltisi eklendi. Yakma fırınında 1 saat tutulup ardından 30 dk desikatörde soğutulup tartımlar sabit vezne gelinceye kadar tekrarlanıp alındı(C). Formüle göre hesaplar yapıp droğun yüzde sülfat külü miktarı bulundu.

A: Porselen Kroze Darası

B: Porselen Kroze Darası + Drog Ağırlığı

C: Porselen Kroze Darası + Sülfat Külü Ağırlığı

$$\% \text{ Sülfat Kül Miktarı} = (C - A) \times 100 / (B - A)$$

3.4.1.4. HCL de Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

Total kül miktar tayini analizindeki işlemler aynı şekilde yapılip sabit vezne geldikten sonra 15 ml distile su 10 ml HCl eklendi. Ağzı saat camı ile kapatılan krozeler 10 dk plak ısıtıcıda ısıtılıp soğutuldu. Özel kül bırakmayan süzgeç kâğıdından süzüldü. Süzüntü turnusol kağıdı yardımı ile nötr oluncaya kadar bir

behere sıcak su ile yıkanarak süzölmeye devam edildi. Süzgeç kâğıdı içerisinde kalan miktarla beraber porselen krozeeye yerleştirilip 1 saat 600 °C fırında yakılıp ardından yarım saat desikatörde soğutma işlemi yapıldı. Ölçümler kaydedildi. İki tartım arası 0,5 mg'ı geçmeyene kadar (sabit vezne gelinceye kadar) bu işlem devam edildi. Sabit vezne gelince tartım sonucu alınıp aşağıdaki formüle göre droğun HCl'de çözünmeyen kül miktar tayini hesaplandı.

A : Porselen kroze darası

B: Porselen Kroze Darası + Drog Ağırlığı

C: Porselen Kroze Darası + HCl'de çözünmeyen Kül Ağırlığı

% HCl 'de Çözünmeyen Kül Miktarı = (C – A) x 100 / (B – A)

3.4.2. Ekstre Hazırlama (% Ekstre Verimi)

500 mL'lik balona 15 gr civarı tam tartım toz edilmiş drog (A) ve çözücü olarak 150 mL metanol eklendi. Çözünmeyi hızlandırmak için ağzına pamuk tıkayarak 30 °C ultrasonik su banyosunda yarım saat tutuldu. Soğumaya bırakılan karışım cam huni ve pileli süzgeç kağıdı yardımıyla darası alınan 250 mL'lik balona (B) süzöldü. Süzöntünün belli kuruluğa kadar alçak basınç altında rotavaporda metanol çözücüsü uzaklaştırıldı. Süzgeç kağıdı üzerinde kalan drog ile beraber balona konulup 150 mL metanol eklenerek aynı işlemler süzöntü berrak oluncaya kadar tekrarlandı. Süzöntüler darası alınmış 250 mL'lik balonda birleştirildi. Çözücüsü geri çevirici soğutucu altında rotavaporda uçurulup eksterenin belli kurulukta kalması için azot gazı uygulandı ve tartım alındı (C) . Daha sonra aşağıda belirtilen formöl ile % verim hesaplandı.

A: İlk Tartılan Drog Miktarı

B: Balon Darası

C: Balon Darası + Ekstre Miktarı

% Verim = (C – B)x100 / A

3.4.3. Miktar Tayini Çalışmaları

3.4.3.1. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini

3.4.3.1.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Sodyum Karbonat çözeltisi (1 M)

10.59 gr sodyum karbonat balon jojede distile suda ultrasonik banyo yardımıyla çözüldürölüp 100 mL' ye tamamlanır.

Folin –Ciocalteu çözeltisi (%10)

Balon jojeye 10 mL folin çözeltisi eklendi distile suyla 100 mL ye tamamlandı.

Örnek Ekstre Çözeltisi

Darası alınmış cam flakona 5 mg tam tartım ekstre konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde metanol ilave edilerek ultrasonik su banyosu yardımı ile çözüldü. G1 ve G2 kodlarına ait örnekler 500'er µL'lik 3 ayrı paralel çalışma olarak çalışıldı.

Metanol/Su çözeltisi

10 mL metanol 10 mL distile su kullanılarak 20 mL çözelti hazırlanır. Farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlamak için kullanılır.

Standart Gallik Asit Çözeltisi

Darası alınmış flakona 5 mg tam tartım gallik asit 1 mg/mL konsantrasyonda metanol/su karışımıyla çözümlere stok çözelti hazırladı. Sırasıyla her biri kendi arasında 3 ayrı paralel çalışma olacak şekilde 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 12,5 µg/mL'lik konsantrasyonlarda metanol/su karışımı kullanılarak çözeltiler hazırlandı. Kör çözeltisi olarak 500 metanol/S (1:1) karışımı alındı.

3.4.3.1.2. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Hazırlama

Folin–Ciocalteu yöntemi (McDonald, Prenzler, Antolovich, & Robards, 2001) kullanılan bu çalışma bazik ortamda drog içerisindeki fenolik bileşiklerin Folin–

Ciocalteu ayracını indirgeyip kendilerinin yükseltgeme esasına dayanır. Bu kimyasal tepkimede ortaya çıkan mavi rengin şiddeti (tonu) fenolik madde konsantrasyonuna bağlıdır.

Dilüsyon için hazırlanan 10 ml metanol/10 ml distile su toplam 20 ml metanollü su karışımı hazırlanır. Darası alınmış flakona 5 mg tam tartım gallik asit 1 mg/mL konsantrasyon oranında m/s karışımıyla çözülerek stok çözelti hazırlandı. Sırasıyla her biri kendi arasında 3 ayrı paralel çalışma olacak şekilde 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 12.5 µg/mL konsantrasyonlarda gallik asit çözeltisi hazırlandı. Kör çözeltisi ve hazırlanan gallik asit çözeltilerine 5 ml folin çözeltisi eklenerek yarım saat karanlık ortamda bekletildi. Süre sonunda 4 ml sodyum karbonat çözeltisi eklendi ve 1 saat karanlıkta bekleme süresi sonucunda kör çözeltisine karşı 765 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ile standart eğri denklemi oluşturuldu.

3.4.3.1.3. Bitki Ekstrelerinde Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini

Darası alınmış flakona tam tartım 5 mg ekstre konsantrasyonu 1mg/mL olacak şekilde metanol eklenerek ultrasonik su banyosunda çözüldü. Bu örnek çözeltiden 500 µL olacak şekilde 3 paralel örnek alınarak, gallik asit çözeltileri için yapılan işlemler uygulandı. Kör çözeltisine karşı 765 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Ekstrelerinin total fenolik bileşik miktarları, elde edilen absorbans değerleri ile farklı derişimlerde hazırlanan gallik asit absorbans değerleriyle oluşturulan ölçüm eğrisinde standart eğri denkleminde yerine konularak total fenolik bileşik miktarı “mg gallik asit eşdeğeri / g ekstre ± Standart Sapma” (GAE ± SS) şeklinde bulundu.

3.4.3.2. Total Flavonoit Miktar Tayini

3.4.3.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Potasyum Asetat Çözeltisi (1M)

0.982 gr potasyum asetat balon jojede bir miktar distile suda ultrasonik banyo yardımıyla çözündürülüp 10 mL ye tamamlanır.

Alüminyum klorür çözeltisi (%10)

5 gr alüminyum klorür 50 mL'lik balon jode bir miktar distile suda ultrasonik banyo yardımı ile çözündürülüp 50 mL ye tamamlanır.

Örnek Ekstre Çözeltisi

Darası alınmış cam flakona 5 mg tam tartım ekstre konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde metanol ilave edilerek ultrasonik su banyosu yardımı ile çözüldü. G1 ve G2 kodlarına ait örnekler 500'er µL'lik 3 ayrı paralel çalışmada çalışıldı.

Standart Standart Kersetin Çözeltisi

Darası alınmış cam flakona 5 mg tam tartım kersetin 1 mg/mL konsantrasyon olacak şekilde metanol ile çözülerek stok çözelti hazırlandı. Sırasıyla her biri kendi arasında 3 ayrı paralel çalışma olacak şekilde 200, 100, 50, 25, 12,5 µg/mL'lik konsantrasyonlarda metanol kullanılarak çözeltiler hazırlandı. Kör çözeltisi olarak 500 µL metanol alındı.

3.4.3.2.2. Kersetin Standart Eğri Grafiği Hazırlama

Toz edilmiş drogların total flavonoit madde miktarı Alüminyum klorür yöntemine (Chang ,Yang, Wen, &Chern, 2002) göre hesaplanmıştır. Bu metod alüminyum klorürün asidik ortamda flavon ve flavanol yapılarının C-4 keto grubu ,C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile kararlı kompleksler meydana getirmesi esasına dayanır . Elde edilen renkli kompleks 415 nm'de en yüksek absorbands verir.

Darası alınmış flakona 5 mg kersetin 5 ml metanol ile ultrasonik su banyosu yardımıyla çözülerek ana stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltilerden her biri 3'er paralel çalışma olarak 200, 100, 50, 25, 12.5 µg/mL konsantrasyonlarda olacak şekilde santrifüj tüplerine standart çözeltileri hazırlandı. 500 µL kör çözeltisi santrifüj tüpüne hazırlandı. Bu tüplere sırasıyla 1.5 ml metanol, 0.1 mL %10 luk alüminyum klorür, 0.1 mL 1M potasyum asetat ve 2.8 mL distile su ile 5 ml ye tamamlandı.Vorteks karıştırıcı yardımıyla karışım homojen hale getirildi. 30 dk karanlık ortamda beklendikten sonra 415 nm'de kör çözeltilisine göre absorbandsları ölçülmüş ortalamaları hesaplandı. Her bir konsantrasyona karşılık gelen elde edilen

ortalama absorbans değerleri ile standart kersetin eğrisi grafiği oluřturulup eęrinin denklemini bulundu.

3.4.3.2.3. Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini

Darası alınmış flakonda 5 mg ekstre 5 ml metanolde ultrasonik su banyosu yardımıyla çözüldü (stok çözelti). Her iki drog 500'er µL olarak santrifüj tüplerine alınarak 3 paralel çalışmada çalışıldı. 500 µL kör çözeltisi metanol hazırlandı. Bu tüplere sırasıyla 1.5 ml metanol, 0.1 mL %10 luk alüminyum klorür, 0.1 mL 1M potasyum asetat ve 2.8 mL distile su ile 5 ml ye tamamlandı. Vorteks karıştırıcı yardımıyla karışım homojen hale getirildi. 30 dk karanlık ortamda beklendikten sonra 415 nm de kör çözeltisine göre absorbansları ölçölüp ortalamaları hesaplandı. Her iki droğa ait elde edilen ortalama absorbans değerleri standart kersetin eğrisi ile oluşturulan eğri denkleminde yerine konularak total flavonoit madde miktarı “mg kersetin/g ekstre ± Standart Sapma ” (Kersetin ± SS) bulundu.

3.4.3.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Apigenin ve Rutin Miktar Tayini ve Miktar Tayini için yapılan Validasyon Çalışmaları

3.4.3.3.1. Bitki Ekstrelerinin hazırlanması

Her biri üç paralel çalışma olacak şekilde toz haline getirilmiş G1 ve G2 droğlarının 500 mg tartılıp 5 mL metanolde 30 dk 30 °C de ultrasonik su banyosu yardımı ile çözündürüldü. Daha sonra tüpler santrifüj aletinde 5000 rpm hızda 10 dk santrifüj edildi. Bu sure sonucunda üst kısmında toplanan sıvı kısım kılcal pipet yardımı ile darası alınmış balonlara aktarıldı. Anlatılan bu süreç her bir drog için 3 kez tekrar edilip çökelti üzerinde kalan sıvı kısımlar darası alınmış balonlarda biriktirildi. Rotavaporda çözücüsü uzaklaştırıldı.

3.4.3.3.2. Örnek Çözeltilerin Hazırlanması

Hazırlanmış olan ekstreden Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (MATAL) gönderilmek üzere 20 mg tartıldı. G1 ve G2 kodları verilen ekstreler tartım 2 mL (80:20, v:v) metanol:su karışımı ile çözündürülüp, filtreden süzülerek cihaza enjekte edilmiştir.

3.4.3.3.3. Standart Apigenin ve Rutin Çözeltilerinin Hazırlanması

Standart apigenin ve rutin konsantrasyon 1000 µg/mL olacak şekilde (80:20, v:v) metanol:su karışımı ile çözündürülerek hazırlanmıştır.

3.4.3.3.4. Standart Apigenin ve Rutin Çözeltilerine Ait Kalibrasyon Eğrisi Hazırlanması

Apigenin ve rutine ait hazırlanan stok çözeltilerden konsantrasyonları 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, ve 100.0 olacak şekilde uyum seyreltmeler yapılmıştır. Her bir konsantrasyondan 20 µL cihaza enjekte edilerek alan değerleri ölçülmüştür. Bu alan değerleri ile ölçü eğrileri ve standart eğri denklemleri oluşturulmuştur.

3.4.3.3.5. Deneyin Yapılışı

Analiz örnekleri Agilent 1260 Infinity II HPLC-DAD cihazında gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak C18 reverse-phase column (4.6 mm x 25 cm), type Spherisorb ODS-2 5µm, 100 Å kullanılmıştır. 330 nm dedektör dalga boyunda enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Gradient elüsyon ile oluşan analizde mobil fazlar water 0.2% H₃PO₄ (V/V) (A), metanol (B), acetonitrile (C)'den oluşmaktadır. Gradient elüsyon oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Zaman(dakika)	Akış Hızı (mL/dak)	A (%)	B (%)	C (%)
0	1.0	96	2	2
40	1.0	50	25	25
45	1.0	40	30	30
50	1.0	0	50	50
52	1.0	0	50	50
56	1.0	96	2	2

Tablo 11. HPLC-DAD Gradient elüsyon oranları

G1 ve G2 ekstrelerine ait hazırlanan örnek çözeltiler cihaza enjekte edilerek okunan alan değerleri daha önce hazırlanan standart apigenin ve rutine ait oluşturulan eğri denklemi kullanılarak ekstrele ait apigenin ve rutin miktarları tayin edilmiştir.

3.4.3.3.6. Validasyon Yöntemleri

Deney sonuçlarından elde edilen analitik verilerin güvenilirliği için Uluslararası kabul edilen Validasyon (Geçerlilik) kriterleri mevcuttur.

3.4.3.3.6.1. Doğrusallık (Linearity)

Yapılan deneyde aranan bileşen örnek içerisindeki miktarı ile orantılı sonuç vermelidir. Her deney sonucunda elde edilen ölçümler belirli bir aralıkta doğrusaldır ve bu sebeble doğrusallığın tespiti yapılan deneyin ölçüm aralığı ile ilgili bilgi verir.

3.4.3.3.6.2. Özgünlük (Seçicilik, Selectivity)

Analitik bir metodun sadece amaçlanan maddelerini tespit edebilme özelliğidir. Seçicilik yöntemin aranan bir analiti örnek matrisindeki diğer maddelerden ayırabilme özelliğidir.

3.4.3.3.6.3. Kesinlik (Precision), tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Aynı koşullarda elde edilen verilerin ardışık olarak elde edilen ölçüm değerlerinin yakınlığı, ölçümlerin tekrarlanabilirliği belirtmek için kullanılır. Analitik yöntemin doğruluğu homojen ve orjinal bir örnek kullanılarak ölçümlerin tekrarlanmasıyla bulunabilir.

3.4.3.3.6.4. Teşhis Limiti (Limit of detection, LOD), Miktar Tayin Limiti (Limit of Quantitation, LOQ)

Teşhis limiti (LOD) kör (blank) örnekten %95 ihtimalle ayırabilecek en düşük konsantrasyondur. Kullanılan metodun laboratuvar koşullarında tespit edebildiği minimum konsantrasyon da denilebilir.

Miktar tayin limiti (LOQ) deneyde bulunan en az miktarı anlatır. Bu nedenle deney birkaç kez tekrarlanır. Tayin limiti kabul edilir bir doğruluk ve kesinlik seviyesinde belirlenebilen düşük analit konsantrasyondur.

3.4.3.3.6.5. Doğruluk (Accuracy), Geri Kazanım (Recovery)

Doğruluk, elde edilen ölçümün doğru veya doğru olabilecek ölçüme yakınlığını gösterir. Mutlak hata veya bağıl hatayla beraber verilir. Uluslararası bağımsız laboratuvarlarda elde edilen ölçümler Standart Referans Maddelerin ölçümünden alınan sonuçlarla aynı bileşenin kullanılan aynı yöntemle sonuçları karşılaştırılır.

Geri kazanım yöntem geçerliliğinde son adımdır. Laboratuvarda hazırlanan içerdiği bileşenler sebebiyle analizi etkileyemeyecek bir örneğe eklenen analizi yapılan bileşenin analiz sonucunda net olarak sonuçlanmasıdır.

3.4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

3.4.4.1. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmaları

3.4.4.1.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)

Cam şişe içerisine 0.695 g dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), 0.136 g sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), 4.385 g sodyum klorür ($NaCl$) tartıldı. 450 mL distile suda çözündürülüp 0.25 mL Tween 20 eklendi. Manyetik karıştırıcıda pH ölçüm elektrodu ile çözelti pH sı belirlendi ve pH 7.5'e ayarlandı. Çözelti distile su ile 500 mL ye tamamlandı.

Substrat Çözeltisi (Asetilkolinesteraz İnhibitör Aktivite için)

100 mL'lik cam şişe içerisine 0.284 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), 0.004 g 5.5'-Ditiyobis-(2- nitrobenzoik asit) (DTNB), ve 0.0034 g asetiltiyokolin iyodür tartıldı. Distile su ile çözüldü. Çözeltinin pH 7.5'e ayarlandı. Distile su ile 50 mL ye tamamlandı.

Substrat Çözeltisi (Bütirilkolinesteraz İnhibitör Aktivite İçin)

100 mL'lik cam şişe içerisine 0.284 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), 0.004 g 5.5'-Ditiyobis-(2- nitrobenzoik asit) (DTNB), ve 0.0038 g S-bütiriltiyokolin iyodür tartıldı. Distile su ile çözüldü. Çözeltinin pH'sı 7.5'e ayarlandı. Daha sonra çözelti distile su ile 50 mL ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz Enzim Çözeltisi

Temin edilen enzim fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile çözülerek 0.25 U/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Bütirilkolinesteraz Enzim Çözeltisi

Temin edilen enzim fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile çözülerek 0.25 U/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Örnek Çözelti

Darası alınan cam flakonlara G1 ve G2 ekstresinden 5 mg tartılıp 5 mL metanolde çözündürülerek stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden PBS ile seyreltmeler yapılarak çeşitli konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. AChE inhibitör aktivite için G1 örneğinden 1000, 200, 100 µg/mL , G2 örneğinden 500, 200, 100 µg/mL ve BChE inhibitör aktivite için G1 örneğinden 1000, 500, 250 µg/mL, G2 örneğinden 500, 200, 100 µg/mL konsantrasyonlar alındı.

3.4.4.1.2. Enzim İnhibisyon Tayini

Ellman yöntemi'ne (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961) göre yürütülen bu çalışmada 96 kuyucuklu mikropalakadan yararlanılmıştır. Ellman yöntemi substrat çözeltisinin (asetiltiyokolin veya bütüriltiyokolin) enzim (asetilkolinesteraz veya bütirilkolinesteraz) ile tepkimeye girmesi sonucunda açığa çıkan tiyokolinin Ellman reaktifi (DTNB) ile tepkimeye girme esasına dayanır. Her biri üç paralel çalışma olacak şekilde çalışılmış en üst sırada enzimin etkinliği gözlemlendi. Oluşan sarı rengin şiddeti enzimin aktivitesinin yüksekliğinin göstergesidir. Alt sıralara doğru yine üç paralel çalışmada her biri farklı konsantrasyonda örnek çözeltiler ile çalışıldı. Örnek çözeltisi ile hazırlanan bu kuyucuklarda ekstrenin enzimi ne derecede inhibe ettiği gözlemlendi ve ölçüldü. Oluşan sarı rengin şiddeti ne kadar az ise örnek ekstrenin enzimi inhibe etme gücü o derece yüksektir. 405 nm dalga boyunda ölçümler yapılarak % enzim inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak galantaminden yararlanılmıştır. (IC₅₀ AChE:0.043µg/ml ve IC₅₀ BuChE:0.711µg/ml). Enzimin % inhibisyonu aşağıdaki formülden yararlanılarak hesaplandı.

E: Örnek Çözeltisinin Absorbans Değeri

B: Kör Çözeltisinin Absorbans Değeri

C: Kontrol Çözeltisinin Absorbans Değeri

BC: Kontrol Çözeltisinin Körünün Absorbans Değeri

$$\% I = 100 - ((E-B) / (C-BC)) \times 100$$

3.4.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere 10 mg tartılan bitkisel ekstrelerin antioksidan kapasitesi; H₂O₂ ile etkileşimde bırakılmış oksidatif stres örneğinde hücrelerin canlılığı ve antioksidan aktivitesi yönünden araştırılmıştır (Loubidi et al., 2018).

Bu çalışmada insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266) kullanılmıştır. Çalışma süresince hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve streptomisin içeren besiyeri (DMEM) kullanılmış poli-L-lizin örtülü polistiren hücre kültür kabına ekilmiş olup %5 CO₂ ve 37°C’de inkübe edilerek çoğaltılmış ve 1:4 oranında pasajlanmıştır. Deneyler sürerken açılan her bir hücre dizisinin kullanma süresi 20 pasajlamayla sınırlandırılmıştır. Hücreler istenilen şekilde çoğaldığında tripsin (% 0.25) yardımı ile flasklardan kaldırarak santrifüj edilmiş, sonra 1:1 oranında hücre süspansiyonu ve % 0.4 tripan mavisi ile karıştırılmıştır. Hemositometre lamına yerleştirilerek 1-2 dk oda ısısında bekletilmiş invert mikroskop ile sayılmıştır.

3.4.4.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Sayfa 36’da Bölüm “3.4.2. Ekstre Hazırlama (% Ekstre Verimi)” anlatılan ekstreler kullanıldı. Bu çalışma için 10 mg ekstre tartıldı.

3.4.4.2.2. Hücrelere Ekstre Uygulaması

Hücreler 12 kuyulu kültür kabında 0.25x10⁶ hücre/kuyu şeklinde ekilmiş ve %5 CO₂ ve 37°C’ye ayarlanan inkübatörde 24 saat süresince etkileşimde bırakılmıştır. Hücrelerin bu duruma uymasının ardından kültür ortamında hazırlanan ekstreler (1, 10, 100 µg/mL) 2 saat süresince uygulanmıştır. Sonra hücreler besi ortamında hazırlanan H₂O₂ (200µM) çözeltisi ile 2 saat etkileşimde bırakılmıştır. Süre sonunda besi ortamından ayrıştırılıp yenilenmiştir. Taze besi ortamı ile hücreler 18 saat süresince inkübe edilmiştir.

3.4.4.2.3. Hücre canlılığı analizi

Uygulamaların ardından her bir kuyuya 40µL MTS çözeltisi eklenmiş olup 2 saat süresince % 5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlanan inkübatörde etkileşimde bırakılmıştır. Mikroplaka okuyucuyla (Multiskan Go, Thermo Scientific) her bir kuyu 440 nm'de okunmuş ölçümler alınmıştır. Okunan absorbans ölçümüne göre hücrelerin canlılığı belirlenmiştir.

Hücrelerin canlılığındaki değişim " $1 - (\text{test kuyucugunun absorbansı} / \text{kontrol kuyucugunun absorbansı}) \times 100$ " denklemi ile belirlenmiştir.

3.4.4.2.4. Hücrelerin Toplanması ve Protein Miktar Tayini

Uygulamaların ardından hücreler soğuk 1x PBS ile muamele edilerek pellet şeklinde toplanmıştır. Toplanan pelletler proteaz inhibitör kokteyli bulunan homojenizasyon tamponuyla soğukta homojenize olmuştur. 15000xg'de +4°C'da 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Ayırışan supernatanlar protein miktar tayini ölçümünde kullanılmıştır. Toplam protein seviyesi bikinkoninik asit (BCA) kiti ile ölçülmüştür. Ölçümler 562 nm'de mikroplaka okuyucusunda yapılmıştır. Bilinen sığır serum albumini derişimlerine göre okunan absorbans ölçümleri kullanarak standart eğri grafiği çizilmiş numunelerdeki protein miktarı tespit edilmiştir.

3.4.4.2.5. Total Antioksidan Durum Ölçümü

Total Antioksidan nitelik ölçümü, test yapılacak örnekte bulunan antioksidan niteliği koyu mavi-yeşil renk ile ABTS radikalinin renk içermeyen indirgenmiş ABTS şekline indirgenmesi yöntemine dayanarak tayin etmeyi amaçlamaktadır. 660 nm dalga boyunda ölçülen absorbans ölçümleri örneğin total antioksidan kapasitesi ile ilgilidir. Standart bir çözelti için çok bilinen E vitamini analogu Trolox çözeltisi kullanılmıştır. Ekstrelerin hidrojenperoksit ile veya hidrojenperoksit olmadan hücrelerdeki toplam antioksidan niteliğine etkisi "*Total Antioxidant Status ((TAS) Rel Assay Diyagnostik Gaziantep, Türkiye)*" kitiyle ölçülmüştür. Uygulamaların ardından toplanan hücre örnekleri ve standart Trolox çözeltisi (1mM) 18'er µL şeklinde 96 kuyulu kaplara ilave edilmiştir. Bunu ardından üzerine 1. çalışma çözeltisi eklenmiş (Reagent 1) ve 30 saniye sonra 660 nm'de 1. ölçüm alınmış (A1).

sonra 2. çalışma çözeltisi eklenmiş (Reagent 2) 5 dakika 37°C’de etkileşime bırakılmış ardından 660 nm’de 2. ölçüm kaydedilmiştir (A2).

Sonuçlar aşağıdaki formül ile hesaplanmış olup uygulama yapılmamış hücrelere kıyasla % değişim şeklinde verilmiştir:

$$A2-A1=\Delta Abs \text{ (Standart veya örnek)}$$

$$\text{Sonuç (mmol Trolox eşdeğeri/L cinsinden)} = \frac{\Delta Abs_{H_2O_2} - \Delta Abs_{\text{Örnek}}}{\Delta Abs_{H_2O_2} - \Delta Abs_{\text{Standart}}}$$

3.4.4.2.6. Total Oksidan Durum Ölçümü

Toplam Oksidan Durum, test yapılacak numunedeki oksidanların ferröz demir şelatör bileşenini ferrik iyonla oksitleme yoluyla renk değişimi oluşturmaya yöntemine dayanır. Ferrik iyon, asidik özellikteki bir ortamda kromojenle renkli karışım oluşturur. Renk koyuluğu, örnek içerisindeki oksidan bileşenlerin total miktarıyla ilgilidir. Standart çözelti şeklinde H₂O₂ (10µM) kullanılmıştır. Renk farklılığı 530 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Ekstrelerin H₂O₂ var iken veya yok iken hücrelerdeki toplam antioksidan niteliğe etkisi "*Total Oxidant Status ((TOS) Rel Assay Diyagnostik Gaziantep, Türkiye)*" kitiyle belirlenmiştir. Uygulamaların ardından toplanan hücre homojenatları ile H₂O₂ standart çözeltisi (10µM) 45'er µL olarak 96 kuyulu kaplara ilave edilmiştir. Bunun ardından üzerine 1. çalışma çözeltisi ilave edilmiş (Reagent 1) ve 30 saniye sonra 530 nm’de 1. ölçüm kaydedilmiştir (A1). Sonra 2. çalışma çözeltisi ilave edilmiş (Reagent 2) 5 dakika 37°C’de etkileşimde bırakılmış daha sonra 530 nm’de 2. ölçüm kayıtlı edilmiştir (A2).

Elde edilen veriler aşağıdaki formül ile hesaplanmış ve H₂O₂ uygulamasına göre % olarak ifade edilen değişim şeklinde verilmiştir

$$A2-A1=\Delta Abs \text{ (Standart veya örnek)}$$

$$\text{Sonuç (µM H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L cinsinden)} = [\Delta Abs_{\text{Örnek}} / \Delta Abs_{\text{Standart}}] \times 10$$

3.4.4.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Deney gruplarında bütün numuneler en az üç kere çalışılmıştır. Elde edilen ölçümler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Ölçümlerin normal dağılıma uyumluluğu Shapiro-Wilks'le test edilmiş, çoklu grup karşılaştırmalarında tek taraflı varyans analizinde post hoc Bonferroni test kiti kullanılmıştır. $p < 0.05$ olduğunda ortalamalar arasındaki farklılık anlamlı olarak bulunmuştur.

3.4.5. Uçucu Yağ Eldesi ve Analizi

280 g tartılan G1 droğu uçucu yağ eldesi için TABİA "Doğal Destek Ürünleri Araştırma San. Ve Tic. A.Ş."da buhar distilasyonu yöntemine tabi tutulmuştur. Distilasyon süresi 1 saat suyun sıcaklığı 100°C soğutucu suyun sıcaklığı ise 18°C'dir. Daha sonra 1.5 mL elde edilen uçucu yağ analiz edilmek üzere MATA'L'a gönderilmiştir. GC-MS yöntemi (Mićović et al., 2021) ile uçucu yağ analizi yapılmıştır.

3.4.5.1. GC-MS Metot

PAL RSI 85 Liquid otomatik örnekleyici ile ve MSD 5977 A kütle spektrometresiyle bağlanmış 7890 B gaz kromatografisi ile analizlendi. Bileşenler HP-5MS kılcal kolonunda (0.25 μ m film, 0.30 mm çap ve 30 m uzunluk) analiz edilmiştir.. Taşıyıcı gaz olarak, 0.7 mL / dk akış hızında helyum kullanıldı. GC için sıcaklık programı sırasıyla; 50 °C başlangıç sıcaklığı, 210 °C, 4 °C / dk ile 3 dakika süresince tutulmuş sonra programlanan sıcaklık, 5 dakika süreyle 20 °C / dk tutularak 280 °C sıcaklığa yükseltilmiştir. Enjeksiyon bölünmüş modda yapıldı (1:50). Enjeksiyon hacmi 1.0 μ L olarak enjeksiyon gerçekleşti. GC-MS arayüzü, 250 °C, MS kaynağı 180 °C ve MS-kuadropolde 150 °C'dir. Elektron çarpma enerjisi 70 eV olarak kullanılmıştır ve veriler 50-500 atomik kütle birimi (amu) aralığında toplanmıştır. Numunelerin taranması, WILEY kütüphanesinde yapılmıştır.

Bulgular

4.1. Kalite Kontrol Testlerine Ait Bulgular

4.1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayinine Ait Bulgular

Her biri kendi içinde 3 paralel çalışma şeklinde yürütülen G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi drogları üzerinde kalite kontrol testleri kapsamında “*Avrupa Farmakopesi 8.0*” (European Pharmacopoeia 8.0, 2013) ve “*Türk Farmakopesi 2017*” (Türk Farmakopesi, 2017) ’de yer alan kurutmada kayıp miktar tayini yapılmış olup elde edilen bulgular Tablo 12. ve 13’de yer almaktadır.

ÖRNEK KODU G1		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
G1.1	1.0003	7.8676
G1.2	1.0002	7.8884
G1.3	1.0022	8.1283
Ortalama $\pm$ STD : % 7.9614 $\pm$ 0.1448		

Tablo 12. G1 ekstre örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları

ÖRNEK KODU G2		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
G2.1	1.0003	8.5174
G2.2	1	8.38
G2.3	1.0022	8.7407
Ortalama $\pm$ STD : % 8.546 $\pm$ 0.1820		

Tablo 13. G2 ekstre örneklerine ait kurutmada kayıp miktar tayini sonuçları

4.1.2. Bütün Kül Miktar Tayinine ait Bulgular

Her biri kendi içinde 3 paralel çalışma şeklinde yürütülen G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi drogları üzerinde kalite kontrol testleri kapsamında “*Avrupa Farmakopesi 8.0*” (European Pharmacopoeia 8.0, 2013) ve “*Türk Farmakopesi 2017*” (Türk Farmakopesi, 2017) ’de yer alan bütün kül miktar tayini yapılmış olup elde edilen bulgular Tablo 14 ve 15’de yer almaktadır

ÖRNEK KODU G1		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% Total Kül Miktarı
G1.1	1.0009	8.6522
G1.2	1.0007	8.7738
G1.3	1.0005	8.4457
Ortalama $\pm$ STD : % 8.6239 $\pm$ 0.1658		

Tablo 14. G1 örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları

ÖRNEK KODU G2		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% Total Kül Miktarı
G2.1	1	8.64
G2.2	1.0004	8.6265
G2.3	1.0004	8.3366
Ortalama $\pm$ STD : % 8.5343 $\pm$ 0.1714		

Tablo 15. G2 örneklerine ait bütün kül miktar tayini sonuçları

4.1.3. Sülfat Külü Miktar Tayinine Ait Bulgular

Her biri kendi içinde 3 paralel çalışma şeklinde yürütülen G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi drogları üzerinde kalite kontrol testleri kapsamında “*Avrupa Farmakopesi 8.0*” (European Pharmacopoeia 8.0, 2013) ve “*Türk Farmakopesi 2017*” (Türk Farmakopesi, 2017) ’de yer alan Sülfat Külü Miktar tayini yapılmış olup elde edilen sonuçlar Tablo 16 ve 17’de yer almaktadır.

ÖRNEK KODU G1		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
G1.1	1.0003	12.5762
G1.2	1	13.03
G1.3	1.0004	12.6149
Ortalama $\pm$ STD : % 12.7403 $\pm$ 0.2515		

Tablo 16. G1 örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları

ÖRNEK KODU G2		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
G2.1	1.0001	12.3887
G2.2	1.0001	12.4187
G2.3	1.0001	12.3487
Ortalama $\pm$ STD : % 12.3853 $\pm$ 0.0351		

Tablo 17. G2 örneklerine ait sülfat külü miktar tayini sonuçları

4.1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayinine Ait Bulgular

Her biri kendi içinde 3 paralel çalışma şeklinde yürütülen G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi drogları üzerinde kalite kontrol testleri kapsamında “*Avrupa Farmakopesi 8.0*” (European Pharmacopoeia 8.0, 2013) ve “*Türk Farmakopesi 2017*” (Türk Farmakopesi, 2017)’de yer alan HCl de Çözünmeyen Kül Miktar tayini yapılmış olup elde edilen bulgular Tablo 18 ve 19’da yer almaktadır.

ÖRNEK KODU G1		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% HCl'de Çözünmeyen Kül Miktarı
G1.1	1	0.59
G1.2	1.0003	0.6598
G1.3	1.0002	0.6198
Ortalama $\pm$ STD : % 0.6232 $\pm$ 0.0350		

Tablo 18. G1 örneklerine ait HCl'de çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları

ÖRNEK KODU G2		
Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	% HCl'de Çözünmeyen Kül Miktarı
G2.1	1	0.17
G2.2	1.0001	0.1499
G2.3	1.0003	0.3598
Ortalama $\pm$ STD : % 0.2265 $\pm$ 0.1158		

Tablo 19. G2 örneklerine ait HCl'de çözünmeyen kül miktar tayini sonuçları

4.2. Ekstre Hazırlama (Drog Verimi)'ne Ait Bulgular

G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi droglarının metanol ekstreleri hazırlanmış olup elde edilen verim aşağıdaki Tablo 20'deyar almaktadır.

Örnek Kodu	Drog miktarı (g)	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
G1	15.0007	1.7904	11.9354
G2	15.0006	3.6093	24.061

Tablo 20. G1 ve G2 örneklerinden hazırlanan metanol ekstreleri için % verim değerleri

4.3. Miktar Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

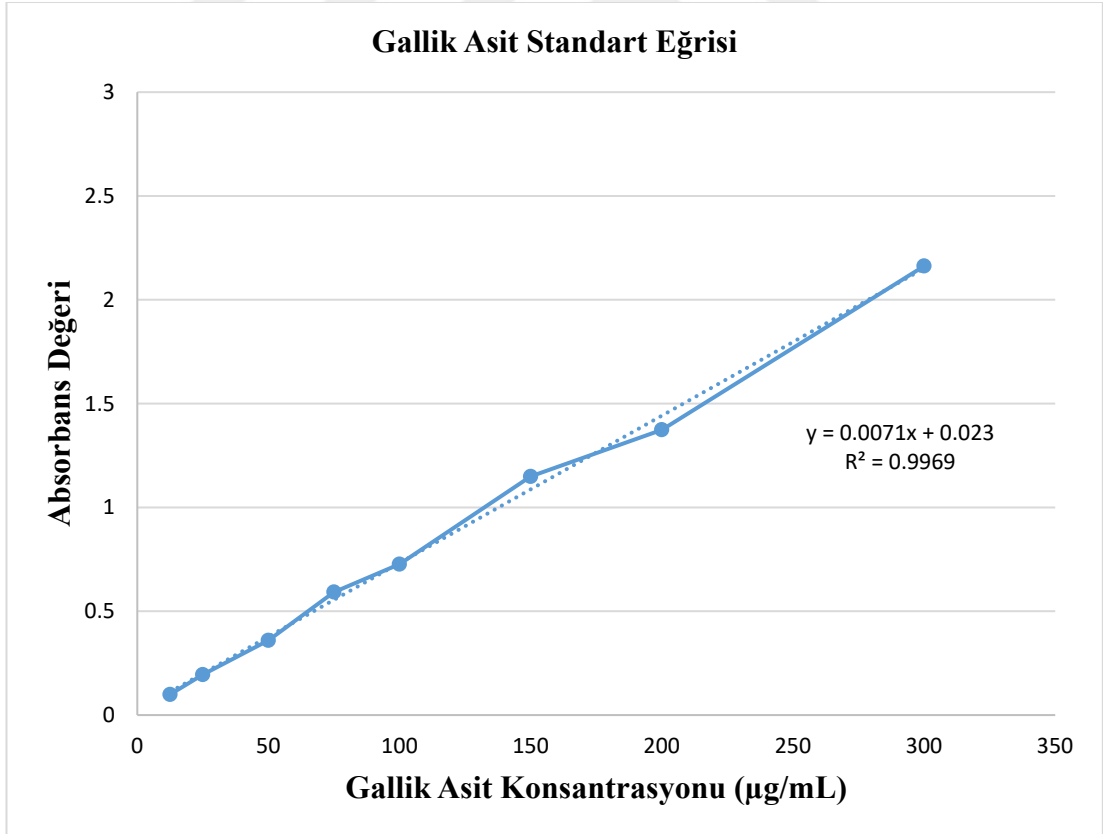
4.3.1. Total Fenolik Bileşik Miktar Tayinine Ait Bulgular

4.3.1.1. Gallik Asit Standart Eğri Grafiği Bulguları

Total fenolik bileşik miktar tayinde kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlanıp ve 765 nm dalga boyundaki absorbands değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Tablo 21'de gösterilmiştir. Bu ölçüm değerleriyle bir standart eğri oluşturuldu. Oluşturulan standart ölçüm eğrisi ve eğri denklemi Grafik 1'de gösterildi.

Gallik Asit Çözelti Konsantrasyonu (µg/mL)	Ortalama Absorbans Değeri ± SS
12.5	0.0993 ± 0.0067
25	0.1947 ± 0.0035
50	0.3597 ± 0.0032
75	0.592 ± 0.0080
100	0.7267 ± 0.0280
150	1.149 ± 0.0040
200	1.374 ± 0.0259
300	2.1623 ± 0.0265

Tablo 21. Gallik asit çözeltilerine ait absorbans değerleri



Grafik 1. Gallik asit standart eğrisi

4.3.1.2. Bitki Ekstrelerinde Total Fenolik Bileşik Miktar Tayini Bulguları

Birbirine paralel 3 farklı çalışma şeklinde yürütülen G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi örneklerine ait metanol ekstralarının 765 nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri kayıt altına alınmıştır. Elde edilen veriler ile galik asit standart eğri denklemi kullanılarak ekstralara ait total fenolik bileşik miktarları hesaplanmış Tablo 22 ve 23’de gösterilmiştir.

Örnek Kodu G1	
Absorbans Değeri	Total Fenolik Bileşik Miktarı (mg GAE /g ekstre)
0.5920	80.1408
0.5960	80.7042
0.5890	79.7183
Ortalama Total Fenolik Bileşik Miktarı $\pm$ SS : 80.1878 $\pm$ 0.4946	
Ortalama Absorbans Değeri $\pm$ SS : 0.5923 $\pm$ 0.0035	

Tablo 22. G1 ekstre örneklerine ait total fenolik bileşik miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu G2	
Absorbans Değeri	Total Fenolik Bileşik Miktarı (mg GAE /g ekstre)
1.913	266.1972
2.082	290.0000
2.089	290.9860
Ortalama Total Fenolik Bileşik Miktarı $\pm$ SS : 282.3944 $\pm$ 14.0358	
Ortalama Absorbans Değeri $\pm$ SS : 2.0280 $\pm$ 0.0996	

Tablo 23. G2 ekstre örneklerine ait total fenolik bileşik miktar tayini sonuçları

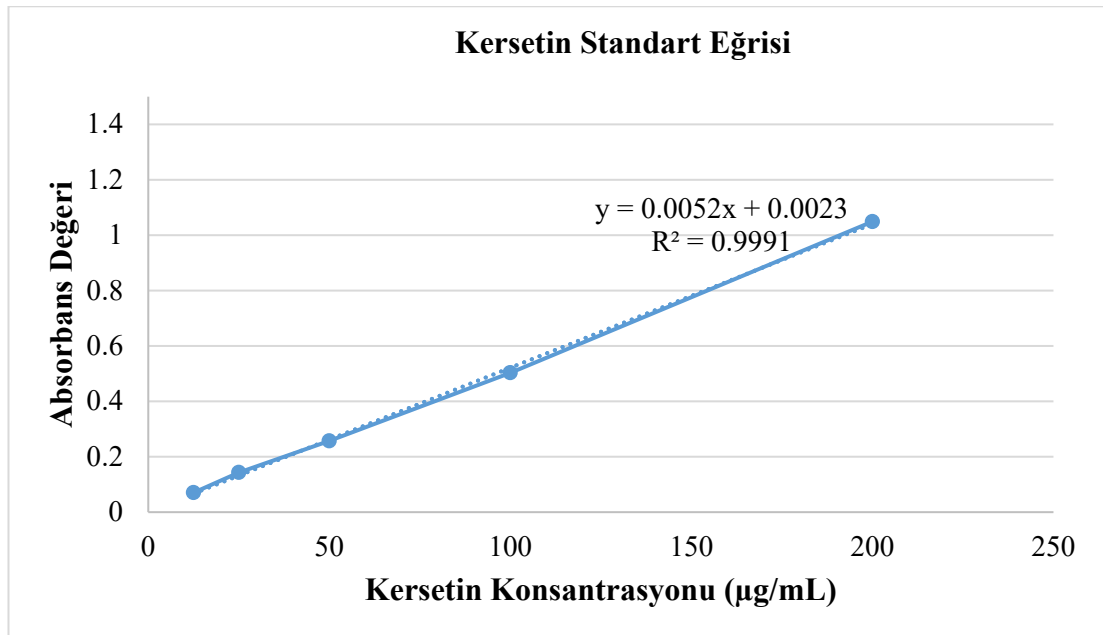
4.3.2. Total Flavonoit Miktar Tayinine Ait Bulgular

4.3.2.1. Kersetin Standart Eğri Grafiği Bulguları

Total flavonoit miktar tayinde kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda kersetin çözeltileri hazırlanmış ve 415 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Tablo 24’de gösterilmiştir. Bu ölçüm değerleriyle oluşturulan standart ölçüm eğrisi ve eğri denklemi Grafik 2’de gösterilmiştir.

Kersetin Çözelti Konsantrasyonu (µg/mL)	Ortalama Absorbans Değeri ± SS
12,5	0.0703 ± 0,001
25	0.1430 ± 0.0027
50	0.2573 ± 0,0023
100	0.5030 ± 0,0111
200	1,049 ± 0,0002

Tablo 24. Kersetin Çözeltilerine Ait Absorbans Değerleri



Grafik 2. Kersetin Standart Eğrisi

4.3.2.2. Bitki Ekstrelerinde Total Flavonoit Miktar Tayini Bulguları

Birbirine paralel 3 farklı çalışma şeklinde yürütülen G1 ve G2 kodlu Herba Hyssop örneklerine ait metanol ekstralarının 415 nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri alınmıştır. Elde edilen ve miktarları hesaplanmış Tablo 25 ve 26’da gösterilmiştir.

Örnek Kodu G1	
Absorbans Değerleri	Total Flavonoit Bileşik Miktarı (mg Kersetin /g ekstre)
0.379	72.4423
0.388	74.171
0.362	69.1731
Ortalama Total Flavonoid Bileşik Miktar Tayini $\pm$ SS : 71.9288 $\pm$ 2.5382	
Ortalama Absorbans Değeri $\pm$ SS : 0.3763 $\pm$ 0.0132	

Tablo 25. G1 ekstre örneklerine ait total flavonoit miktar tayini sonuçları

Örnek Kodu G2	
Absorbans Değerleri	Total Flavonoit Bileşik Miktarı (mg Kersetin /g ekstre)
0.248	47.25
0.263	50.1347
0.273	52.0577
Ortalama Total Flavonoid Bileşik Miktar Tayini $\pm$ SS : 49.8141 $\pm$ 2.4198	
Ortalama Absorbans Değeri $\pm$ SS : 0.2613 $\pm$ 0.0125	

Tablo 26. G2 ekstre örneklerine ait total flavonoit miktar tayini sonuçları

4.3.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile Apigenin ve Rutin Teşhis ve Miktar Tayinine Ait Bulgular

4.3.3.1. Bitki Ekstre Verimine Ait Bulgular

MATAL'a gönderilmek üzere G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi droglarına ait ekstre verimleri Tablo 27 ve 28'de verilmiştir.

Örnek Kodu G1			
Örnek Kodu	Drog Miktarı(g)	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
G1.1	0.5000	0.0556	11.12
G1.2	0.5000	0.0458	9.16
G1.3	0.5001	0.0418	8.3583
Ortalama ± Standart Sapma: %9.55 ± 1.4207			

Tablo 27. G1 örneklerine ait % verim sonuçları

Örnek Kodu G2			
Örnek Kodu	Drog Miktarı(g)	Ekstre Miktarı (g)	% Verim
G2.1	0.5000	0.1034	20.68
G2.2	0.5003	0.1087	21.7269
G2.3	0.5002	0.0781	15.6137
Ortalama ± Standart Sapma: %19.3402 ± 3.2694			

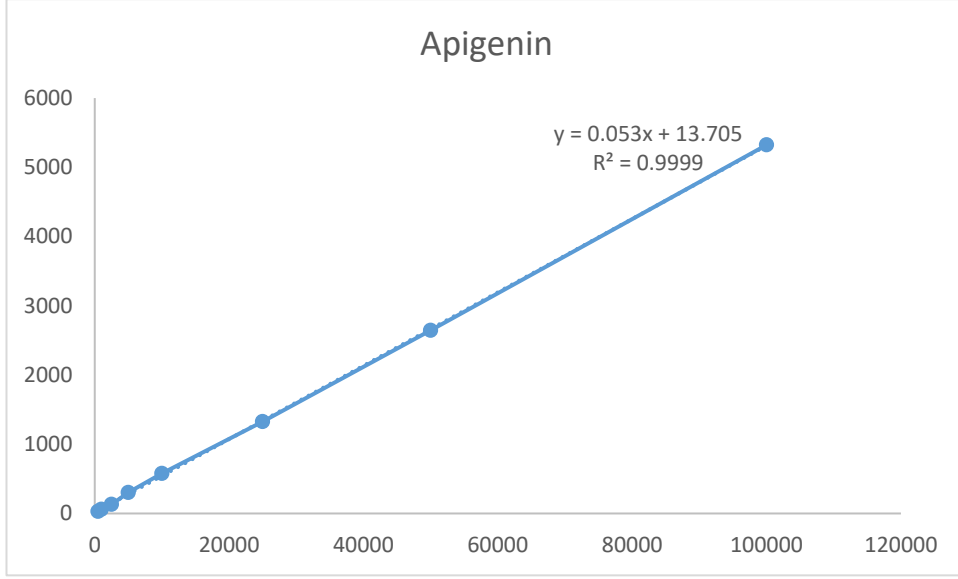
Tablo 28. G2 örneklerine ait % verim sonuçları

4.3.3.2. Standart Apigenin Kalibrasyon Eğrisine Ait Bulgular

Standart apigenin kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için ana stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda apigenin çözeltileri hazırlanmış Tablo 29’da gösterilmiştir. Bu konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri ile kalibrasyon eğrisi hazırlanmış grafik 3’de gösterilmiştir. Standart apigenine ait HPLC kromatogramı şekil 9’da gösterilmiştir.

Konsantrasyon (ng/mL)	Apigenin İçin Ort.Alan Değerleri
500	29.10
1000	60.10
2500	130.00
5000	301.90
10000	577.60
25000	1326.20
50000	2644.70
100000	5322.90

Tablo 29. Apigenin çözelti konsantrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD 'da okunan ortalama alan değerleri



Grafik 3. Standart apigenin kalibrasyon eğrisi



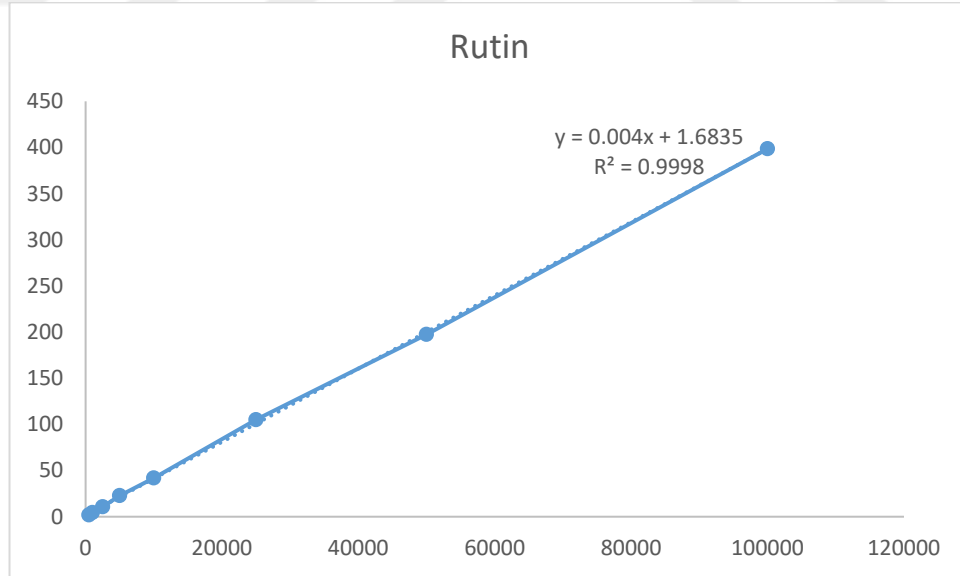
Şekil 9. Standart apigenin HPLC kromatogramı
($R_T = 49.7$ dakika)

4.3.3.3. Standart Rutin Kalibrasyon Eğrisine Ait Bulgular

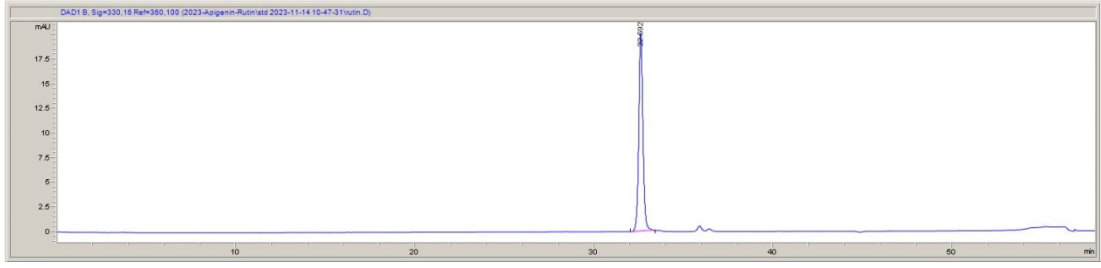
Standart rutin kalibrasyon eğrisinin hazırlanması için ana stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda rutin çözeltileri hazırlanmış Tablo 30'da gösterilmiştir. Bu konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri ile kalibrasyon eğrisi hazırlanmış grafik 4'de gösterilmiştir. Standart rutine ait HPLC kromatogramı şekil 10'da gösterilmiştir.

Konsantrasyon (ng/mL)	Rutin İçin Ort.Alan Değerleri
500	2.00
1000	4.50
2500	10.70
5000	22.90
10000	41.90
25000	105.1
50000	197.50
100000	398.60

Tablo 30. Rutin çözelti konsantrasyonuna karşılık gelen HPLC-DAD'da okunan ortalama alan değerleri



Grafik 4. Standart rutin kalibrasyon eğrisi



Şekil 10. Standart rutin HPLC kromatogramı
($R_T = 33.1$ dakika)

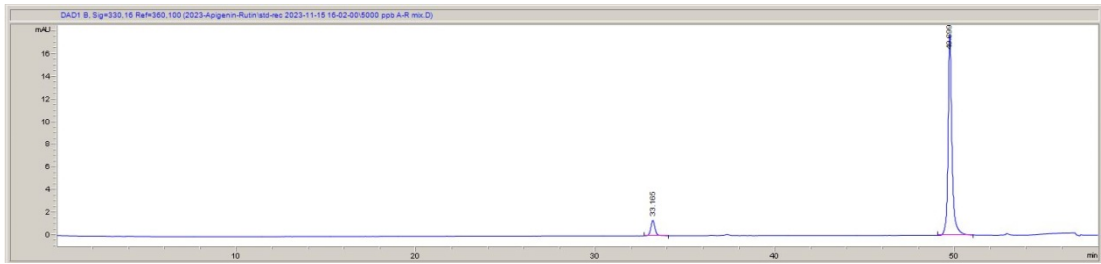
4.3.3.4. Validasyona Ait Bulgular

4.3.3.4.1. Doğrusallık , Kalibrasyon eğrisinin hazırlanması

Farklı 8 konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı ve HPLC-DAD cihazına enjekte edildi. Ölçülen alanlara karşılık gelen konsantrasyonlar ile grafikler oluşturuldu. Tablo 29 ve 30, grafik 3 ve 4 de gösterilmiştir.

4.3.3.4.2. Özgünlük (Seçicilik, Selectivity) Ait bulgular

Rutin ve Apigenin standartlarını içeren karışım çözeltinin enjeksiyonun kromatogramı aşağıdadır. Piklerin alıkonma zamanlarına göre pikler birbirinden net olarak ayrılmıştır.



Şekil 11. Apigenin ve rutin standartlarına ait HPLC kromatogramı

4.3.3.4.3. Kesinlik(Tekrarlanabilirlik)’a Ait Bulgular

10 µg/mL Rutin ve Apigenin enjeksiyon tekrarlanabilirlikleri sonuçları aşağıda verilmiştir.

10 ppm	rutin	rutin	rutin	rutin	rutin	rutin	Mean	SD	%RSD
Area	40.4	40.5	40.8	40.9	40.9	41.9	40.90	0.53	1.30
RT	33.2	33.2	33.2	33.2	33.2	33.3	33.19	0.04	0.11

Tablo 31. Rutin tekrarlanabilirlik sonuçları

10 ppm	apigenin	apigenin	apigenin	apigenin	apigenin	apigenin	Mean	SD	%RSD
Area	542.7	542.9	546.1	546.5	548.9	577.6	550.78	13.35	2.42
RT	49.7	49.7	49.7	49.7	49.7	49.8	49.73	0.03	0.07

Tablo 32. Apigenin tekrarlanabilirlik sonuçları

4.3.3.4.4. Tanımlama Limiti (LOD) ve Ölçüm (Rapor) Limiti (LOQ)’ne Ait Bulgular

Rutin ve Apigenin için LOD ((S/N)*3) ve LOQ ((S/N)*10) değerleri sinyal ve gürültü yükseklikleri kullanılarak S/N üzerinden hesaplanmıştır.

	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Rutin	0.065	0.005
Apigenin	0.215	0.016

Tablo 33. Apigenin ve rutin için tanımlama ve ölçüm limit verileri

4.3.3.4.5. Doğruluk (Geri Kazanım)'a Ait Bulgular

Geri kazanım çalışmaları doğruluk parametresi için 3 farklı derişimde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablodadır.

Rutin Eklenen Derişim (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
10	101.1±1,6
25	100.9±3,3
50	100.7±1,9

Tablo 34. Rutin için geri kazanım sonuçları

Apigenin Eklenen Derişim (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
10	98.3±0,8
25	99.2±1,4
50	99.7±0,4

Tablo 35. Apigenin için geri kazanım sonuçları

4.3.3.5. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Bulguları

G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi ekstrelerinden 20 mg tartım alınıp 2 mL metanol:su (80:20, v:v) karışımı içerisinde çözündürülmüştür. Her çalışma 2 kez tekrarlanarak her biri kendi arasında 3 paralel çalışma olarak yürütülmüştür. Numunelerin HPLC enjeksiyon sonrası ölçülen alan değerleri ve kalibrasyon eğrilerine göre konsantrasyon sonuçları Tablo 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43'de belirtilmiştir.

Örnek Kodu	Apigenin Alan Değeri
G1 1-1	19.7
G1 1-2	20.1
G1 2-1	20.7
G1 2-2	21.1
G1 3-1	19.6
G1 3-2	20.1

Tablo 36. G1 ekstre örneklerine ait apigenin alan değerleri

Örnek Kodu	Rutin Alan Değeri
G1 1-1	135.8
G1 1-2	136.8
G1 2-1	159.1
G1 2-2	153.7
G1 3-1	138.4
G1 3-2	139

Tablo 37. G1 ekstre örneklerine ait rutin alan değerleri

Örnek Kodu	Apigenin Alan Değeri
G2 1-1	1.1
G2 1-2	1.3
G2 2-1	1.05
G2 2-2	1.1
G2 3-1	1.46
G2 3-2	1.28

Tablo 38. G2 ekstre örneklerine ait apigenin alan değerleri

Örnek Kodu	Rutin Alan Değeri
G2 1-1	2.98
G2 1-2	3.35
G2 2-1	2.44
G2 2-2	2.38
G2 3-1	2.54
G2 3-2	2.62

Tablo 39. G2 ekstre örneklerine ait rutin alan değerleri

Örnek Kodu G1		
Örnek Kodu	Apigenin Konsantrasyonu (µg/mL)	Apigenin Miktarı (µg/g)
G1 1-1	0.113113	11.3113
G1 1-2	0.12066	12.066
G1 2-1	0.131978	13.1978
G1 2-2	0.139528	13.9528
G1 3-1	0.111226	11.11226
G1 3-2	0.1266	12.66
Ortalama ± Standart Sapma = 12.38336 ± 1.1016 (µg/g)		

Tablo 40. G1 ekstre örneklerine ait apigenin miktar değerleri

Örnek Kodu G1		
Örnek Kodu G1	Rutin Konsantrasyonu (µg/mL)	Rutin Miktarı (µg/g)
G1 1-1	33.529125	3352.9125
G1 1-2	33.779125	3377.9125
G1 2-1	39.354125	3935.4125
G1 2-2	38.004125	3800.4125
G1 3-1	34.179125	3417.9125
G1 3-2	34.329125	3432.9125
Ortalama ± Standart Sapma = 3552.9125 ± 249.324 (µg/g)		

Tablo 41. G1 ekstre örneklerine ait rutin miktar değerleri

Örnek Kodu G2		
Örnek Kodu	Apigenin Konsantrasyonu (µg/mL)	Apigenin Miktarı (µg/g)
G2 1-1	<LOQ	<LOQ
G2 1-2	<LOQ	<LOQ
G2 2-1	<LOQ	<LOQ
G2 2-2	<LOQ	<LOQ
G2 3-1	<LOQ	<LOQ
G2 3-2	<LOQ	<LOQ
Ortalama ± Standart Sapma = 0.0000 ± 0.0000 (µg/g)		

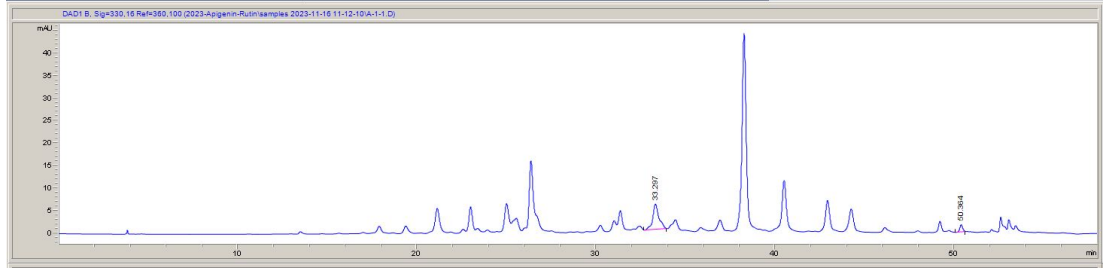
Tablo 42. G2 ekstre örneklerine ait apigenin miktar değerleri

Örnek Kodu G2		
Örnek Kodu	Rutin Konsantrasyonu (µg/mL)	Rutin Miktarı (µg/g)
G2 1-1	0.324125	32.4125
G2 1-2	0.416625	41.6625
G2 2-1	0.189125	18.9125
G2 2-2	0.174125	17.4125
G2 3-1	0.214125	21.4125
G2 3-2	0.234125	23.4125
Ortalama ± Standart Sapma = 25.870833 ± 9.360043 (µg/g)		

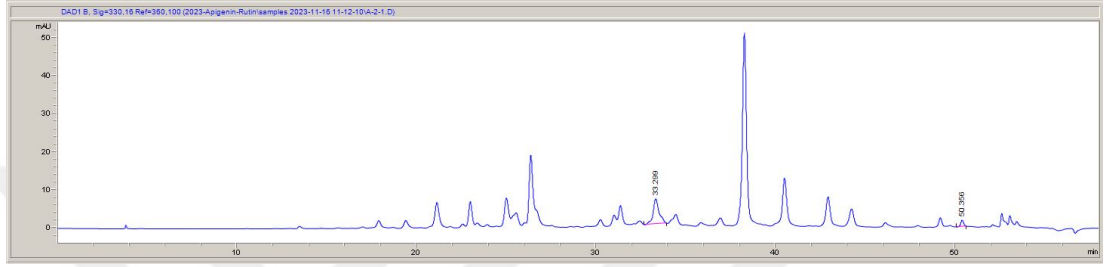
Tablo 43. G2 ekstre örneklerine ait rutin miktar değerleri

4.3.3.6. Bitki Ekstrelerine Ait HPLC-DAD Kromatogram Bulguları

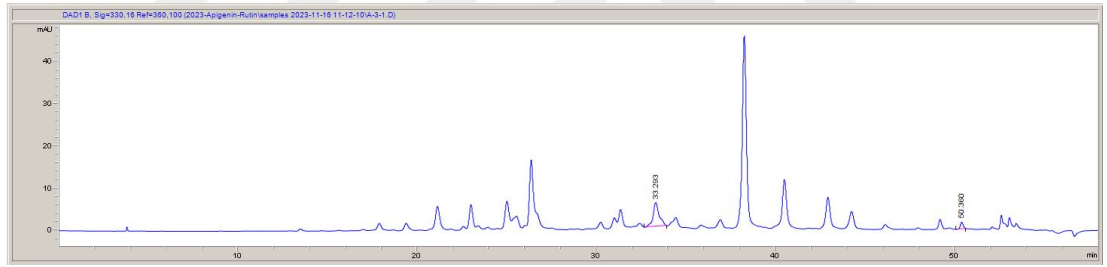
G1 ve G2 ekstre örneklerine ait kromatogram bulguları şekil 12, 13, 14, 15, 16, 17’de gösterilmiştir.



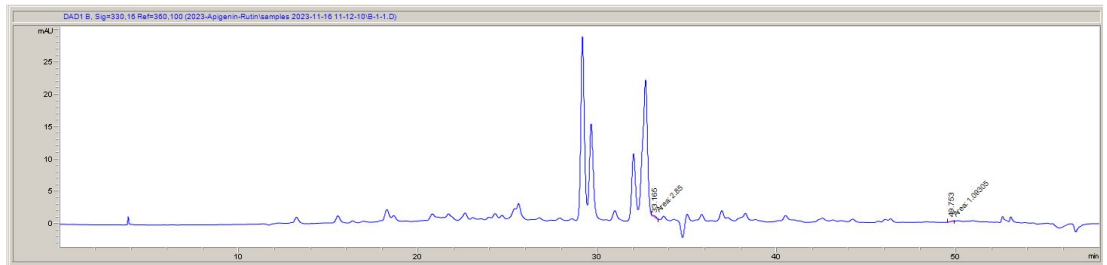
Şekil 12. G1- 1 ekstre örneği HPLC kromatogramı



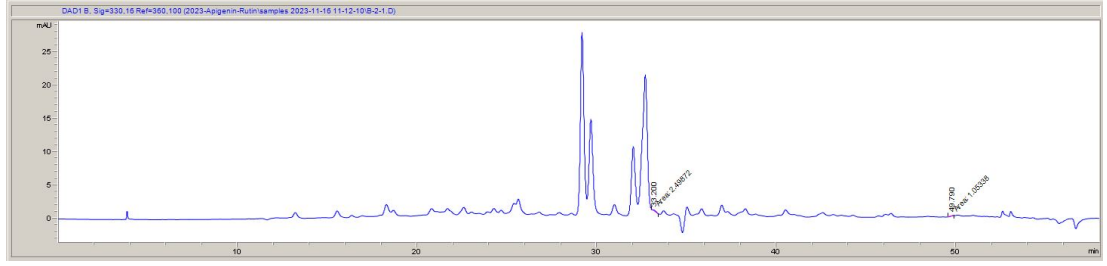
Şekil 13. G1- 2 ekstre örneği HPLC kromatogramı



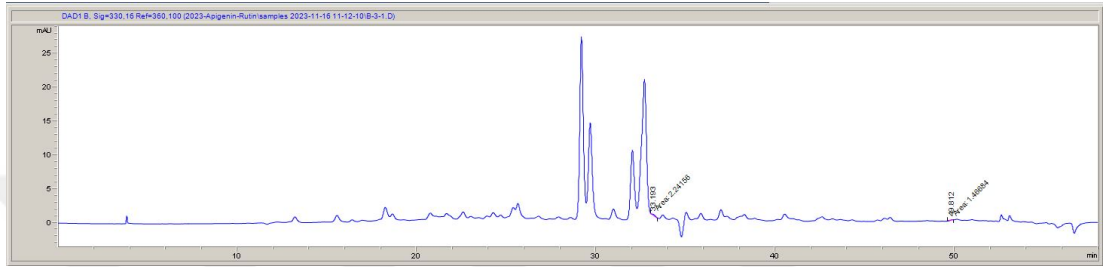
Şekil 14. G1- 3 ekstre örneği HPLC kromatogramı



Şekil 15. G2- 1 ekstre örneği HPLC kromatogramı



Şekil 16. G2- 2 ekstre örneği HPLC kromatogramı



Şekil 17. G2- 3 ekstre örneği HPLC kromatogramı

4.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

4.4.1. Asetilkolinesteraz ve Bütürlkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

G1 ve G2 ekstreleri ile hazırlanan mikropalakaların 405 nm dalga boyundaki ölçümleri sonucu elde edilen % enzim inhibisyon değerleri Tablo 4, 45, 46, 47’de gösterilmiştir.

Örnek Kodu G1	
Konsantrasyon (µg/mL)	% I
1000	% 37.7
200	% 37.1
100	%21

Tablo 44. G1 ekstresine ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

Örnek Kodu G1	
Konsantrasyon (µg/mL)	% I
1000	%16
500	%4
250	%3

Tablo 45. G1 ekstresine ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

Örnek Kodu G2	
Konsantrasyon (µg/mL)	% I
500	%11
200	%5
100	%1

Tablo 46. G2 ekstresine ait asetilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

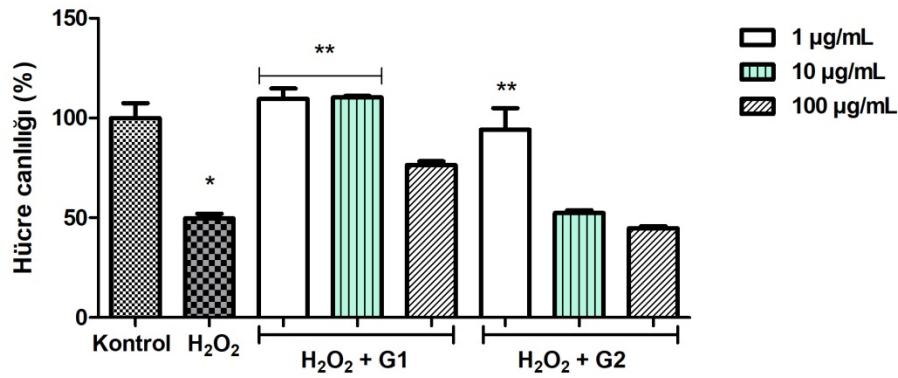
Örnek Kodu G2	
Konsantrasyon (µg/mL)	% I
500	%23
200	%10
100	%5

Tablo 47. G2 ekstresine ait bütirilkolinesteraz inhibisyon sonuçları

4.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

4.4.2.1. Hücre Canlılığı Analizine Ait Bulgular

Uygun besi şartlarında çoğaltılıp sayılan insan nöroblastoma hücrelerinin (SH-SY5Y ATCC CRL-2266) canlılığı, bu hücrelerin hidrojen peroksitle indükledikten sonraki canlılığı, hidrojen peroksitle indüklenen oksidatif stres koşullarındaki SH-SY5Y hücrelerinin 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki G1 ve G2 ekstreleri varlığındaki canlılıkları karşılaştırılmış deney sonuçları grafiksel olarak sunulmuştur.(Grafik.5.)



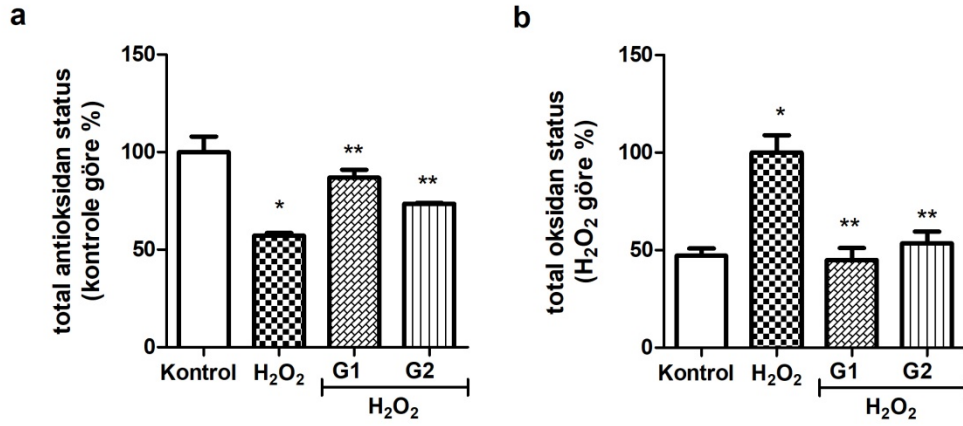
Grafik 5. Hidrojen peroksitle indüklenmiş oksidatif stres koşullarında G1 ve G2 ekstrelerinin (1, 10, 100 µg/mL) SH-SY5Y hücrelerindeki hücre canlılığına etkisi

*p<0.05; uygulama yapılmamış hücreler ile karşılaştırıldığı zaman hücrelerin canlılığındaki anlamlı azalma

**p<0.05; H₂O₂ uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığı zaman hücrelerin canlılığındaki anlamlı artış

4.4.2.2. Total Antioksidan ve Oksidan Durumuna Ait Bulgular

Kontrol grubuna karşın H₂O₂ (200 µM) ile indüklenmiş SH-SY5Y hücreleri ve H₂O₂ ile indüklenen SH-SY5Y hücrelerinin 1µg/mL konsantrasyonda G1 ve G2 ekstreleri varlığında total antioksidan durumu (TAS) ve total oksidan durumları (TOS) karşılaştırılmış deney sonuçları grafiksel olarak sunulmuştur.(Grafik 6).



Grafik 6. G1 ve G2 ekstralarının (1 µg/mL) H₂O₂ (200 µM) indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerindeki a) total antioksidan durum (TAS) b) total oksidan durum (TOS) üzerindeki etkisi

*p<0.05; uygulama yapılmayan hücreler ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı değişim;

**p<0.05; H₂O₂ uygulanan hücreler ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı değişim

4.5. Uçucu Yağ Analizine Ait Bulgular

G1 Kodlu Herba Hyssopi örneğinin uçucu yağının analizi GC-MS analizi yapılmıştır. Retansiyon zamanları ve alan değerleri Tablo 48’de yer almaktadır.

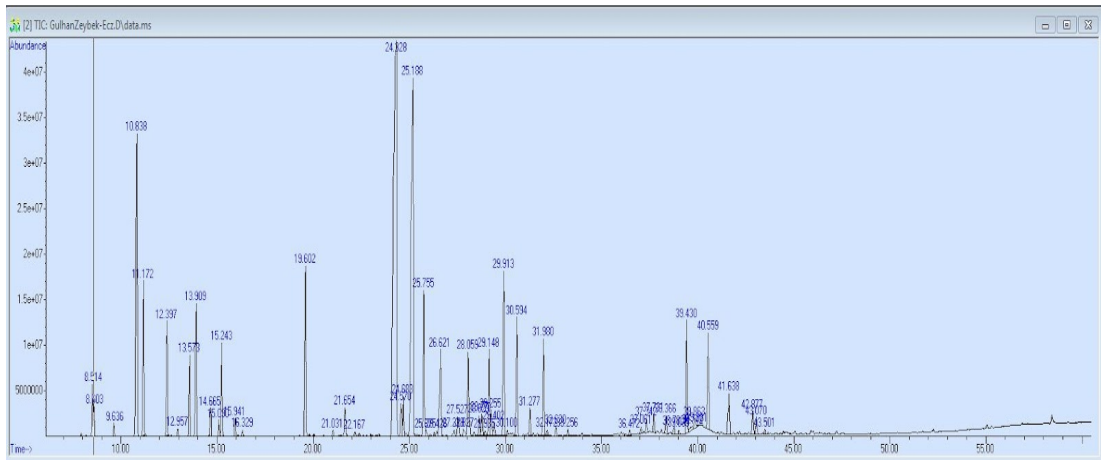
NO	Library/ID	RT	Area Pct
1	α -Pinen	8.5139	0.856
2	α -Fellandrene	8.603	0.4643
3	Kamfen	8.603	0.2246
4	β-Pinen	10.8376	8.4661
5	Sabinen izomer	11.1724	2.8173
6	β -Mirsen	12.3965	2.0298
7	α -Terpinen	12.9573	0.1291
8	Limonen	13.573	1.5113
9	Sabinen izomer	13.909	2.7
10	cis-Osimen	14.6649	0.5053
11	γ -Terpinen	15.0896	0.2833
12	β -Osimen	15.2434	1.6871

13	o-Simen	15.9411	0.3255
14	α - Terpinolen	16.3293	0.1253
15	Sikloheptan	19.6018	3.9223
16	α -Tujon	21.031	0.1136
17	β -Tujon	21.6537	0.6582
18	trans-Sabinen hidrat	22.1675	0.0935
19	Isopinokamfon	24.3277	25.0176
20	α -Gürjünen	24.3277	0.7003
21	Linalool	24.6833	0.7118
22	(E)-Pinokamfon	25.1879	15.5713
23	Pinokarvon	25.7552	3.2641
24	Bisiklo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropil-5-metil-9-metilen	25.8754	0.1475
25	β cubeben	26.4259	0.1158
26	β Karyofillen	26.6208	2.5335
27	α -Gürjünen	27.3275	0.1523
28	Mirtenal	27.5274	0.5513
29	δ -Kadinen	27.8271	0.2329
30	Neosallosimen	28.0595	2.1324
31	Estragol	28.6292	0.3984
32	4,7,10-Siklondekantrien	28.7712	0.5565
33	2-isopropil-5-metil-9-metilen	28.9347	0.1328
34	Mirtenil asetat	29.1483	1.7102
35	δ -Karen	29.2554	0.5808
36	beta.-Panasinsen	29.4016	0.348
37	Germakren D	29.9129	3.6973
38	Nerol asetat	30.0995	0.1046
39	bisiklogermakren	30.5936	2.588
40	Naftalen	31.2767	0.5566
41	Mirtenol	31.9801	2.0352
42	1,5-Sikloheksadin-1-metanol	32.1725	0.1273
43	2,6-Dimetil-3,5,7-oktarin-2-ol	32.6304	0.1798

44	L-Kalamenen	33.2559	0.1292
45	Pentanoik asit	36.4723	0.0922
46	(2,4,6-Trimetilsiklohekzil) metanol	37.0611	0.1411
47	Karyofilen oksit	37.3424	0.3114
48	Metilöjonol	37.7307	0.3551
49	Ledol	38.3665	0.3971
50	1-Hidroksi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-siklodekadin	38.7799	0.1858
51	Naftalin	39.0351	0.096
52	Siklohekzanmetanol	39.4296	2.2702
53	Siklohekzanmetanol	39.742	0.2271
54	m-Anişik hidrazid	39.8633	0.2999
55	Hedikaryol	39.9809	0.0512
56	(-)-Spatulenol	40.559	2.0979
57	α -Kadinol	41.6382	1.183
58	izospatulenol	42.8768	0.5823
59	β -Eudesmol	43.0698	0.4175
60	α -Eudesmol	43.5007	0.1038
		Toplam %	99.9997

Tablo 48. G1 Örneğine Ait Uçucu Yağ GC-MS Analiz Sonucu

RT: retention time



Tartışma

Yapılan bu tez çalışması piyasadan temin edilmiş *Hyssopus officinalis* L. (Zufa otu) bitkisinin kurutulmuş toprak üstü kısımlarında yapılan kalite kontrol testleri, miktar tayini çalışmaları, biyolojik aktivite çalışmalarını kapsamaktadır. Menşei bilinen BAÇEM’den alınan G1 kodlu drog örneği üzerinde uçucu yağ elde ve analiz çalışması da yürütülmüştür. BAÇEM tarafından Balıkesir Burhaniye Börezli kırsalında yetiştirilip kurutulan ve oradan temin edilen G1 kodlu Herba Hyssopi droğu ile online alışveriş sitesinden temin edilen G2 kodlu Herba Hyssopi drogları karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. İlk olarak droglar, genel görünümleri açısından makroskobik olarak incelenmiştir. Bu incelemeler sonucu iki drogdan da elde edilen bulgular, literatür çalışmalarıyla uyumludur.(Guerrini et al., 2021)

5.1. Kalite Kontrol Testleri

“Avrupa Farmakopesi 8.0” ve “Türk Farmakopesi 2017”ye göre değerlendirilmiştir (European Pharmacopoeia 8.0, 2013;Türk Farmakopesi , 2017)

Örnek kodları	G 1	G2
% Kurutmada Kayıp Miktarı ± Standart Sapma	7.9614±0.1448	8.546±0.1820
% Bütün Kül Miktarı± Standart Sapma	8.6239±0.1658	8.5343±0.1714
% Sülfat Külü Miktar ± Standart Sapma	12.7403±0.2515	12.3853±0.0351
% HCl'de Çözünmeyen Kül Miktarı± Standart Sapma	0.6232±0.0350	0.2265±0.1158

Tablo 49. G1 ve G2 kodlu örneklerin kalite kontrol test sonuçlarına ait ortalama değerler

Kurutmada kayıp miktar tayini bitkisel drogların raf ömrü, ve mikroorganizma üremesi açısından değerlendirilmesinde önemlidir. G1 kodlu örnekte ortalama % 7.9614 ve G2 kodlu örnekte ortalama % 8.546 nem miktarı tespit edilmiş Her iki drog için bu değerler farmakopede belirtilen en fazla nem miktar değeri % 12 nin altında olup iyi kurutulup depolandığı bilgisini vermektedir.

Bütün kül miktar tayini ve sülfat kül miktar tayini drogda taş, metal gibi organik olmayan kalıntıların varlığı konusunda bilgi verir. Bütün kül miktarı G1 kodlu örnekte ortalama % 8.6239, G2 kodlu örnekte ortalama % 8.5343 ve sülfat kül miktarı G1 kodlu örnekte % 12.7403, G2 kodlu örnekte %12.3853 olarak tespit edilmiş her iki örnek te birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Farmakopede belirtilen bütün kül miktarı ve sülfat kül miktarı en fazla % 13 olan değerin altında olup drogların iyi hazırlandığı bilgisini vermektedir.

HCl' de çözünmeyen kül miktarı silisyum gibi elementlerin varlığını toprak ve hava kirliliğinin bitki üzerindeki etkisini gösterir. G1 kodlu örnekte ortalama % 0.6232 ve G2 kodlu örnekte ortalama % 0.2265 HCl' de çözünmeyen kül miktarı tespit edilmiştir. Her iki örnek de farmakopede belirtilen % 2 sınırının altındadır. Bu da her iki bitkinin uygun koşullarda yetiştirildiğini göstermektedir.

5.2. Miktar Tayini Çalışmaları

Miktar tayinlerine başlamadan önce her iki droğun metanol ekstreleri hazırlanmış ve ekstre verimleri hesaplanmıştır. G1 ve G2 kodlu örneklerin ekstre verimleri sırası ile % 11.94 ve % 24.06 'dır. G2 kodlu örneğin metanol ekstresi verimi oldukça yüksektir.

Guerrini ve ark.(2021) İtalya'da farklı zaman ve bölgelerden toplanan zufa otunun kuru herbasi ile yaptıkları çalışmada kuru herbasının etanol ekstresi verimini % 7.39-13.00 olarak bulmuşlardır. Sırbistan'ın 6 farklı bölgesinde yapılan bir başka çalışmada elde edilen methanol ekstre verimleri % 9.48 -12.02 aralığındadır (Mićović et al., 2021). Bu değerler ile karşılaştırdığımızda G1 kodlu ekstre verimi ile uyumlu G2 kodlu ekstrenin ise daha yüksek bir verim verdiği görülmektedir.

Zufa otu ile ilgili yapılan araştırmalarda antioksidan aktivite, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibitörü aktiviteleri gibi biyolojik aktiviteleri bitkinin sekonder metabolitleri arasında yer alan fenolik bileşikler ve flavonoit özellikte bileşikler önemli role sahiptir. Bu bileşiklerin miktar ve oranlarını belirlemek için spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır.

Metanol ekstralarının verimleri ve total fenolik bileşik miktarı, total flavonoid miktarı ve HPLC-DAD yöntemi ile yapılan apigenin ve rutin miktar tayinleri sonuçları Tablo 50’de yer almaktadır.

Örnek kodu;% ekstre verimi	G1;% 11.94	G2; % 24.06
Toplam fenolik bileşik miktarı (mg GAE/g ekstre) ± Standart Sapma	80.1878 ± 0.4946	282.3944 ± 14.0358
Total flavonoit miktarı (mg kersetin/g ekstre) ± Standart Sapma	71.9288 ± 2.5382	49.8141 ± 2.4198
Apigenin miktarı (µg/g ekstre) ± Standart Sapma	12.38336 ± 1.1016	Tespit edilmemiştir
Rutin miktarı (µg/g ekstre) ± Standart Sapma	3552.9125 ± 249.324	25.870833 ± 9.360043

Tablo 50. G1 ve G2 kodlu örneklerin ortalama miktar tayini sonuçları

Total fenolik bileşik içeriği tayini çalışmalarında; standart olarak gallik asit üzerinden ölçümler yapılmış elde edilen eğri üzerinden oluşturulan denklemden G1 kodlu Herba Hyssopi droğu örneğinin ortalama fenolik bileşik miktarı 80.1878 mg GAE /g ekstre, G2 kodlu örneğin ise 282.3944 mg GAE/g ekstre olarak bulunmuştur. Vlase ve ark. zufa otunun kurutulmuş toprak üstü kısımlarından etanol ile hazırladıkları ekstrenin fenolik bileşik içeriğini 77.72 ± 1.83 (mg GAE/g), Nile ve arkadaşları zufa otunun farklı ekstraksiyon yöntemlerini kullanmış ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ile 60.35 ± 1.12 , ultrason destekli ekstraksiyon (BAE) ile 53.75 ± 1.98 , Soxhlet ekstraksiyonu (SE) ile 47.44 ± 2.01 ve Maserasyon (MC) ile 42.80 ± 1.34 (mg GAE/g) şeklinde bulmuştur (Nile et al., 2017; Vlase et al., 2014).

Benea ve ark. beyaz, pembe ve mavi renkli zufa otunun kurutulmuş toprak üstü kısımlarının etanol ekstresinin fenolik bileşik içeriğini sırası ile 36.111 ± 0.314 , 33.078 ± 0.620 , 39.056 ± 0.894 (mg GAE/g) olarak bulmuştur (Benea et al., 2022).

Fathiazad ve ark. kurutulmuş toprak üstü kısımlarının n-bütanol ve etilasetat ekstresi ile yaptıkları çalışmada toplam fenolik bileşik içeriğini sırası ile 246 mg GAE/ g ekstre ve 51 mg GAE mg/ g ekstre olarak bulmuşlardır (Fathiazad et al., 2011b).

Çalışmamızda kurutulmuş Herba Hyssopi droğundan hazırladığımız G1 ve G2 kodlu metanol ekstrelerimizin total fenolik bileşik içerikleri, literatürler ile karşılaştırıldığında genel olarak uyumlu görülmektedir.

Total flavonoid miktar tayini çalışmalarında; standart olarak kersetin üzerinden ölçümler yapılmış elde edilen eğri üzerinden oluşturulan denklemden G1 kodlu Herba Hyssopi droğu örneğinin ortalama flavonoid miktarı 71.9288 mg kersetin/g ekstre, G2 kodlu örneğin ise 49.8141 mg kersetin/g ekstre olarak bulunmuştur.

Hatipoğlu ve ark. (2013) den toplanıp kurutulan zufa otunun toprak üstü kısımlarının farklı çözücüler ile hazırladıkları ekstrelerinden methanol-su özütünden iyi verim almışlar ve flavonoid miktarını 31.25 mg/g ekstre olarak tespit etmişlerdir

Vlase ve ark. (2014) Herba Hyssopi'nin etanol ekstresi ile yaptıkları çalışmada total flavonoid bileşik içeriğini standart olarak kullandıkları rutin üzerinde 1.30 RE/g ekstre, İran'da yapılan bir çalışmada zufa otunun çiçek, yaprak ve köklerinin aseton ekstresinin total flavonoid yapıda bileşik içeriği standart kersetin üzerinden sırası ile 92.8 , 114.0 ve 48.0 mg kersetin/g ekstredir (Alinezhad et al., 2012).

Bizim Herba Hyssopi örneklerinden hazırladığımız G1 ve G2 kodlu metanol ekstreleri ile yaptığımız çalışmalardan aldığımız sonuçlar literatürler ile karşılaştırıldığında genel olarak uyumludur.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile apigenin miktar tayini;

G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi droğundan hazırlanan metanol ekstrelerinin HPLC-DAD analizi ile elde edilen sonuçlara göre G1 kodlu örneğin apigenin miktarı 12.38336 µg/g ekstredir. G2 kodlu örnekte ise apigenin tespit edilememiştir.

Fathiazad ve ark. (2011b) Herba Hyssopi'nin hidrometanolik ekstesinde apigenin 7-O-β-D-glukuronid maddesini major bileşen olarak tespit ettiklerini belirtmişler (220 g kuru toprak üstü *Hyssopus officinalis* droğundan 33.6 mg madde izole edilmiştir).

Yunanistan'da yapılan çalışmada Herba Hyssopi'nin metanol ekstresi ile yapılan çalışmada ise HPLC analizinde apigenin 0.012 mg/g olarak tespit edilmiştir.(Proestos et al., 2005)

Apigenin miktar tayini ile ilgili çok çalışma olmamakla beraber, Proestos ve arkadaşlarının HPLC ile yaptığı miktar tayini çalışması bizim G1 kodlu örneğimiz ile yapılan çalışma ile uyumludur.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC-DAD) ile rutin miktar tayini;

Herba Hyssopi droğunun G1 ve G2 kodlu Herba Hyssopi örneklerinin metanol ekstelerinin HPLC-DAD analizi ile elde edilen sonuçlara göre G1 kodlu örneğin rutin miktarı 3552.9125 µg/g G2 kodlu örneğin ise 25.870833 µg/g ekstredir.

Rusya’da zufa otunun farklı kültürleri ile yapılan çalışmada HPLC yöntemiyle rutin miktarı 8.34 – 19.75 µg/g aralığında elde edilmiş (Babich et al., 2021), yine başka bir çalışmada Herba Hyssopi’nin etanol ekstresinin HPLC analizinde rutin miktarı 21.93 µg/g ekstredir (Vlase et al., 2014). Yunanistan’da Herba Hyssopi’nin metanol ekstresi ile yapılan HPLC analizinde ise rutin bulunamamıştır (Proestos et al., 2005). Çalışmamızda özellikle G1 kodlu örneğimizin diğer yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında rutin açısından zengin bir Herba Hyssopi örneği olduğunu söyleyebiliriz.

5.3. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Asetilkolinesteraz ve Bütürlkolinesteraz Enzim İnhibitör Aktivitesi

Herba Hyssopi ekstrelerinin enzim inhibitör aktiviteleri farklı konsantrasyonlarda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir.

AChE enzim inhibitör aktivitesi, G1 ekstresinin 1000, 200, ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda enzim inhibisyon yüzdeleri sırası ile % 37.7, % 37.1, % 21 olarak; G2 ekstresinin ise 500, 200, 100 µg/mL konsantrasyonlarda enzim inhibisyon yüzdeleri sırası ile % 11, % 5, % 1 olarak bulunmuştur.

BChE enzim inhibitör aktiviteleri G1 ekstresinde 1000, 500, 250 µg/mL konsantrasyonlarda sırası ile % 16, % 4, % 3 ve G2 ekstresinde 500, 200, 100 µg/mL konsantrasyonlarda sırası ile % 23 % 10, % 5 olarak bulunmuştur.

Perry ve ark.(1996) zufa otunun uçucu yağı ve kuru yaprak ekstresi ile yaptıkları çalışmada spektrofotometrik ölçümlerle AChE inhibisyonunu değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak uçucu yağının 0.1 µL/mL konsantrasyonunda % 19.5, kurutulmuş yaprak ekstresinin 2.5 µg/mL konsantrasyonunda % 2.6 AChE inhibisyonu gösterdiğini bulmuşlardır.

Wszelaki ve ark. (2010) Herba Hyssopi’nin metanol ve hekzan ekstrelerinin AChE ve BChE enzim inhibisyonunu spektrofotometrik (Ellman yöntemi) olarak değerlendirmiş, metanol ekstresi 100 µg/mL konsantrasyonda % 5.2, 400 µg/mL konsantrasyonda % 13.2 AChE inhibisyonu ve 100 µg/mL konsantrasyonda %

11.5 400 µg/mL konsantrasyonda % 31.8 BChE inhibisyonu gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Hücre Kültürü Çalışmaları ve Antioksidan Enzim Aktivitesi; H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stres oluşturulan hücrelerin canlılığı ile 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki G1 ve G2 Herba Hyssopi ekstralarının varlığıyla beraber antioksidan enzim aktivitesinin hücre canlılığı üzerine etkisi karşılaştırılmıştır (Loubidi et al., 2018). Grafik 5 sayfa 73’de belirtilen verilere göre oksidatif stres oluşturulan SH-SY5Y hücrelerinin canlılığında kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalma olmuştur (p< 0,05). Oksidatif stres (H₂O₂ ile) oluşturulmuş hücrelere kıyasla; 1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki G1 ve G2 ekstraları varlığında oksidatif stres oluşturulmuş hücre canlılıkları karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı artış görülmüştür (p< 0,05). G1 ekstresinin 1 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında uygulanan hücrelerin canlılığı yaklaşık aynı olmakla birlikte 100 µg/mL konsantrasyon uygulanan hücrelere göre hücre canlılığı daha fazladır. G2 ekstresinin 1 µg/mL konsantrasyonda uygulanan hücrelerde canlılık oranı en fazla olmakla beraber uygulanan ekstre konsantrasyonu arttıkça bu oranda azalma görülmüştür. Her iki ekstreye beraber baktığımızda hücre canlılığı üzerine düşük konsantrasyonda etkinliğin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile bir sonraki aşamada total antioksidan ve total oksidan durum değerlendirilmelerinde kullanılacak etkin doz da 1 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Total antioksidan durumlarına (TAS) baktığımızda hidrojen peroksit (H₂O₂ 200µM) ile indüklenmiş SH-SY5Y hücrelerinin uygulama yapılmamış (kontrol) grubuna göre % TAS oranında anlamlı azalma görülmüştür. 1 µg/mL G1 ve G2 ekstralarının varlığında H₂O₂ (200µM) ile indüklenen hücrelere kıyasla G1 ekstresi varlığında daha fazla olmakla birlikte % TAS oranında anlamlı artış gözlemlenmiştir. Bu veriler G1 ve G2 droglarının H₂O₂ (200µM) ile oluşturulan oksidatif stresi ortadan kaldırma kapasitelerinin olduğu göstermiştir (p< 0,05).

Total oksidan durumunda (TOS), hidrojen peroksit (H₂O₂ 200µM) uygulanan hücrelerin kontrol grubuna göre % TOS oranında anlamlı artış gözlemlenmiştir. G1 ve G2 ekstraları varlığında ise total oksidan durumunda (TOS) H₂O₂ ile indüklenen hücrelere göre anlamlı azalma olmuştur (p< 0,05).

Bu durum her iki parametrede de kontrol grubu ve H₂O₂ ile indüklenen hücrelerle karşılaştırdığımızda G1 ve G2 ekstraktlarının hücrelerde koruyucu özellik gösterdiğini göstermektedir.

Antioksidan aktivite üzerine yapılan çalışmalara baktığımızda daha çok hesaplı ve kolay bir yöntem olması nedeniyle DPPH yöntemi tercih edildiğini görüyoruz. Guerrini ve ark.(2021) üç farklı bölgeden toplayıp kıyasladıkları züfa otunun hidroalkolik ekstresinin antioksidan aktivitesini DPPH ve ABTS yöntemi ile değerlendirmiş ortalama değerler DPPH IC₅₀ (39.31 – 51.71) ve ABTS IC₅₀ (10.79– 20.15) aralıklarında bulmuşlardır. Bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin ekstreden izole edilmiş yalın fenolik bileşik olan rosmarinik asit, klorojenik asit ve kaftarik asit'in antioksidan aktivitesinden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Fathiazad ve ark. DPPH yöntemi ile züfa otu ekstraktlarını ve izole edilmiş apigenin içeriğinin antioksidan aktivitelerini karşılaştırmalı çalışmış ekstre iyi antioksidan aktive gösterirken izole apigenin düşük antioksidan aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (Fathiazad et al., 2011b). Züfa otunun 6 farklı bölgeden metanol ekstresinin DPPH ile değerlendirildiği bir başka çalışmada IC₅₀ değerleri 56.04 - 199.89 aralığında belirlenmiştir (Mićović et al., 2021).

Hatipoğlu ve arkadaşlarının Rize (Türkiye)'den toplayıp kuruttukları Züfa otunun su, metanol/su ve kloroform ekstraktlarının antioksidan aktivitesini DPPH yöntemi ile değerlendirmişler %50 inhibisyon değerlerini sırası ile 18.80, 28.80 ve 250 µg ml⁻¹ olarak tespit etmişlerdir. (Hatipoğlu et al., 2013)

Bitki ile ilgili literatür çalışmalarına baktığımızda sonuçlarımızın diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Uçucu yağ içeriği; Tez ve proje bütçemizin kısıtlı olması nedeniyle, menşei belli olan (BAÇEM arazileri,Balıkesir) ve aromatik kokusu daha belirgin hissedilen G1 kodlu Herba Hyssopi örneğimiz ile uçucu yağ elde edilerek analiz çalışmaları yürütülmüştür. Yaptığımız bu çalışmada buhar distilasyonu ile % 0.53 verimle elde ettiğimiz uçucu yağ, toplamda 60 bileşen içeriği ile % 99.999 oranla GC-MS yöntemiyle analiz edilmiştir.

Bisiklik monoterprenik keton bileşik olan izopinokamfon (% 25.02), pinokamfon (% 15.57) ve β-pinen (% 8.47) majör bileşenlerdir. Bunların yanında bunları takip

eden yüksek miktarlarda sikloheptan (% 3.92), germakren (% 3.70) ve pinokarvon (% 3.26) bileşenleri tespit edilmiştir.

Dünyada züfa otunun uçucu yağı, majör bileşenlerine göre 3 farklı şekilde gruplandırılmaktadır. Bunlar: Monoterpen keton tip; 1,8 sineol tip ve Metilöjenol tip'lerdir (Gorunovic et al., 1995; Kürkçüoğlu et al., 2016; Vallejo et al., 1995).

Türkiye'de *Hyssopus officinalis* bitkisi'nin uçucu yağı ile yapılan çalışmalara baktığımızda Gümüşhane'den toplanan bitki ile yapılan iki çalışmada % 2.29 ve % 1.13 verimleri ile uçucu yağ elde edilmiştir. Bu çalışmada major bileşenler; pinokarvon (%29.2 ve %36.3 oranları ile en fazla), pinokamfon, β -pinen (Figueredo et al., 2012; Hakan Özer et al., 2005)'dir.

Diyarbakır'da bitkinin farklı dönemleri ile yapılan çalışmalarda ise % 0.70-1.22 verim ile uçucu yağ elde edilmiştir. Diyarbakır'dan toplanan bitki ile yapılan çalışmalarda major bileşen olarak isopinokamfon (%57.27 ve %26.88- 53.61 oranları ile en fazla) ve β -pinen(%15.29-16.33) olarak tespit edilmiştir (Bährle-Rapp, 2007).

Rize bölgesinden elde edilen *Hyssopus officinalis* uçucu yağının analizinin yapıldığı bir diğer çalışmada, uçucu yağ, %1.30 ile elde edilmiş olup, 32 adet uçucu yağ bileşeni tanımlanmıştır. Uçucu yağda majör bileşen olarak pinokamfon (% 28.1), pinokarvon (% 20.3), β -pinen (%15.1) ve ökaliptol (%8.5) olarak tespit edilmiştir (Hatipoğlu et al., 2013).

Isparta bölgesinden elde edilen *Hyssopus officinalis* uçucu yağının analizinin yapıldığı bir diğer çalışmada uçucu yağ %0.30-1.54 oranlarında elde edilmiş, ve uçucu yağın majör bileşeni olarak 1,8 sineol (%51.89), β -mirsen (%8.84),elemol (%8.26), germakren D (%6.27) ve γ -elemen (%6.10) olarak tespit edilmiştir (Kara et al., 2014).

Kastamonu Ihsangazi bölgesinden elde edilen *Hyssopus* uçucu yağının analizinin yapıldığı bir diğer çalışmada Kürkçüoğlu ve arkadaşları uçucu yağı % 2.2 gibi yüksek bir verimle elde etmişlerdir. Uçucu yağın majör bileşenleri olarak pinokarvon (27.1%), β -pinen (19.0%), izopinokamfon (13.6%) ve 1.8 sineol (%6.3) olarak tespit edilmiştir (Kürkçüoğlu et al., 2016).

Guerrini ve ark. İtalya’ da yaptığı çalışmada % 0.28-0.70 verim elde etmiş en yüksek %98.9 oranında 44 bileşen tanımlamış ve (-)-limonen-10-il-asetat, metilöjenol, ve izo-pinokamfon bileşenlerini major bileşen olarak bulmuşlardır (Guerrini et al., 2021).

Sırbistan'da yapılan çalışmada % 0.48-1.00 oranında uçucu yağ verimi ile en yüksek oran % 99.43 ile 21 bileşen tanımlanmış ve major bileşeni 1-8 sineol, cis-pinokamfon ‘dur. Oksijenli monotерpenlerce zengindir (Mićović et al., 2021).

Yaptığımız çalışma ile verim anlamında benzer sonuç içerik anlamında farklı sonuçlar vermiştir.

Madde	%	ISO 9841/ 2013 %
α -Pinen	0.856	0.4-1.5
β-Pinen	8.4661	7.0-20.0
Sabinen izomer	2.8173	1.0-3.5
Limonen	1.5113	0.6-4.0
Sabinen izomer	2.7	1.0-3.5
Izopinokamfon	25.0176	25.0-45.0
Pinokamfon	15.5713	8.0-25.0
β Karyofilen	2.5335	1.0-3.0
Germakren D	3.6973	1.2-4.5
(-)-Spatulenol	2.0979	0.1-1.5

Tablo 51. *Hyssopus officinalis* L. uçucu yağ bileşenlerinin ISO 9841-2013 standartları ile karşılaştırması

ISO 9841-2013 Uluslararası standart ile uçucu yağda analiz edilen bileşenler tablo 51’de sunulmuştur. Tabloda belirtilen bütün maddelerin sınır değerleri ISO değerleri ile uyum göstermektedir. Uçucu yağımızda, ISO 9841- 2013’de varlığı belirtilen bazı minör bileşenler [mirtenilmetileter (% 0.9-3), β -burbon (0.8-2.6), alloanomaden (1.0-3.0) ve elemol (0.2-2.5)] tespit edilmemiştir.(Standard & Preview, 1988)

Uçucu yağın majör bileşeni olarak monoterpen keton yapısında bileşikler yüksek miktarda olup, uçucu yağ monoterpen keton tip’dir. Bitkinin uçucu yağ verimi ve bileşenleri bitkinin kemotipine ve yetiştiği bölgeye göre farklılık gösterebilmektedir.



Sonuç ve Öneriler

Çok eski tarihi geçmişe sahip olan bitkisel ilaç uygulamalarında Antik çağda Dioscorides (MS 40-90), Claudius Galen (MS 131-200), İbn-i Sina (Avicenna), Hipokrat gibi birçok hekim yer almış olup günümüze ışık tutmuştur. Yüzyıllarca denenmiş olması nedeni ile oluşturduğu güven ile dünyada insanların % 80'i tarafından tercih edilen bir yöntem olmuştur. 2014 yılında Sağlık Bakanlığı'nın yayınladığı "Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği" içerisinde de bulunan Türkiye'de ve dünyada fitoterapi en çok tercih edilen geleneksel yöntem olmuştur (Erdal, n.d.). Günümüzde son yıllarda yaşanan COVID- 19 salgın hastalığı ile beraber tedavi protokolünün belli olmaması insanların yaşadığı çaresizlik ve endişe ile bir arayış içerisine girmesi güvenli bir liman olarak görülen bitkisel ilaçlara yönelişi hızla arttırmıştır. Yaşlanan dünya nüfusunda insan ömrü artmış olsa da kronik hastalıkların da aynı oranda artması yaşam kalitesini etkilemiştir. Modern tıp uygulamalarının pahalı ve çoğu kişi tarafından ulaşılamaz hale gelmesi, sentetik ilaçların tek bir hastalık belirtisi üzerine etki göstermesi ve beraberinde yan etkiler oluşturarak farklı sağlık sorunlarına yol açmasıyla oluşan kısır döngü modern tıp uygulamalarına güveni sarsmıştır (Özçelik & Toprak, 2015). Bitkisel ilaçlara yöneliş artmıştır. Bu yöneliş bitkisel ilaçların kontrolsüzce satılması ve kullanılmasıyla beraber çeşitli sorunlar da oluşturmuştur. Doğru bitkinin kullanılmaması, bitkisel karışımlarda oluşan sinerjik etkiler ile oluşan istenmeyen etkiler, bitki ilaç ve besin etkileşimleri bu alanda oluşan boşluğa dikkat çekmiş bitkisel drogların kalite kontrol ve aktivite çalışmalarına yön vermiştir.

Unani tıp sisteminde yer alan tedavi edici gücünün yer aldığı kitaplar bulunan ve manevi olarak geçmişe sahip züfa otu bu çalışmada incelenmiştir (Nile et al., 2017).

Kalite kontrol çalışmaları kapsamında kurutmada kayıp miktarı G1 kodlu örnekte ortalama % 7.9614 ve G2 kodlu örnekte ortalama % 8.546, bütün kül miktarı G1 kodlu örnekte ortalama % 8.6239 , G2 kodlu örnekte ortalama % 8.5343, sülfat kül miktarı G1 kodlu örnekte % 12.7403, G2 kodlu örnekte %12.3853 ve .G1 kodlu örnekte ortalama % 0.6232 ve G2 kodlu örnekte ortalama % 0.2265 HCl' de çözünmeyen kül miktarı tespit edilmiştir..

Metanol ekstresi verimleri G1 ve G2 kodlu örneklerin sırası ile % 11.9354 ve % 24.061 'dir

Miktar tayini çalışmalarında G1 kodlu örneğin ortalama fenolik bileşik miktarı 80.1878 mg GAE /g ekstre, G2 kodlu örneğin ise 282.3944 mg GAE /g ekstre olarak bulunmuştur. G1 kodlu örneğin ortalama flavonoit yapıda bileşik miktarı 71.9288 mg kersetin /g ekstre, G2 kodlu örneğin ise 49.8141 mg kersetin /g ekstre 'dir. G1 kodlu örneğin apigenin miktarı 12.38336 µg/g G2 kodlu örnekte ise apigenin tespit edilememiştir. G1 kodlu örneğin rutin miktarı 3552.9125 µg/g G2 kodlu örneğin ise 25.870833 µg/g 'dır.

1, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarındaki G1 ve G2 ekstralarının H₂O₂ ile indüklenen oksidatif stres oluşturulan hücrelerin canlılığı üzerine etkileri gözlemlenmiş en etkin dozun 1 µg/mL olarak tespit edilmiş yüksek konsantrasyonda etkinin azaldığı ve G2 ekstresine baktığımızda koruyuculuğunun olmadığını görmekteyiz. 1 µg/mL G1 ve G2 ekstralarının Total antioksidan durumlarında (TAS) ve Total oksidan durumlarında (TOS) anlamlı bulgular elde edilmiştir. Antioksidan aktivite üzerine yapılan bazı çalışmalarda bitkide aktiviteden sorumlu tek bir etken maddenin antioksidan aktivitesi ile bitki ekstresinin antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Ekstre aktivitesinin antioksidan aktivitesi ekstrede izole edilmiş yalın aktiviteden sorumlu bileşiğe göre daha yüksek bulunmuştur.

G1 ekstresi 1000 µg/mL konsantrasyonlarında % 37.7 oranda en yüksek AChE inhibitör aktivite ve % 16 oranda en yüksek BChE inhibitör aktive göstermiş G2 ekstresi ise 500 µg/mL konsantrasyonlarında % 11 oranda en yüksek AChE inhibitör aktivite ve % 23 oranda en yüksek BChE inhibitör aktivite göstermiştir.

G1 ekstresi ile yapılan uçucu yağ analizinde uçucu yağ verimi % 0.53 elde edilmiş içerik analizinde % 99.99 oranda 60 bileşen tayin edilmiştir. Bisiklik monoterpenik keton bileşik olan Izo-pinokamfon (% 25.0176), Pinokamfon (% 15.5713) ve Pinokarvon (% 3.2641) bulunmuştur. Bunun yanı sıra β-Pinen (% 8.4661), sikloheptan (% 3.9223), germakren (% 3.6973) major bileşenler olarak bulunmuştur.

Literatür araştırmalarında bitki ile ilgili genotoksik, sitotoksik, anti-kanserojen, anti-HIV, antiviral, antidiyabetik, antikonvülzan, gastroprotektif, antimikrobiyal, antifungusid, antibakteriyel, AChE, BChE inhibisyonu ve antioksidan aktivite gibi çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları yapılmış olduğu görülmektedir. Antioksidan aktivite çalışmalarında DPPH, FRAP, ABTS gibi yöntemler kullanılmıştır. Tezimizde antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla kullandığımız hücre kültürü yöntemi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Biyolojik aktivite çalışmalarında farklı dozlarda farklı oranda farklı etkiler görüldüğü hatta etkisiz kaldığını görmekteyiz. Yapılan çalışmalarda tek bir etken maddenin düşük etki gösterirken bir bütün olarak bitki ekstresinin daha aktif olduğunu görmekteyiz. Bu durum günümüzde piyasada bulunan tek etken madde içeren bitkisel ilaçların etkinliğini düşündürmekte, sentetetik ilaçlarda olduğu gibi bitkisel ilaçların da doğru dozda kullanılması gerektiği ve akılcı bitkisel ilaç kullanımının önemini göstermektedir.

Son yıllarda yeni ilaç üretiminde azalma yaşanmaktadır. Ekonomik yatırım ve teknolojik gelişmelerin yanı sıra ilaç üretiminde yeni görüşlere ihtiyaç vardır. Evrimsel biyoloji ve doğa bu anlamda iyi bir kaynaktır. 1981-2006 yılları arasında onaylanmış ilaçların ya direk yada dolaylı yoldan bitkisel kaynaklardan elde edilmiştir.(Özdede, 2017)

Elde edilen sonuçlardan da gördüğümüz üzere bitki ekstre kalitesi için belli bir standardizasyonun gerekliliği önemlidir. Bu nedenle zufa otunun güvenle kullanılabilmesi için daha çok çalışma yapılması ve farmakopede yer alması sağlanmalıdır. Zufa otu zengin içeriği ile akılcı kullanıldığında modern tıp için iyi bir kaynak pek çok hastalık için koruyucu ve tedavi edici bir ajan olabilir..

Kaynaklar

- Abdel-Megeed, R. M., El Newary, S. A., Kadry, M. O., Ghanem, H. Z., El-Shesheny, R. A., Said-Al Ahl, H. A. H., & Abdel-Hamid, A. H. Z. (2020). Hyssopus officinalis exerts hypoglycemic effects on streptozotocin-induced diabetic rats via modulating GSK-3 β , C-fos, NF- κ B, ABCA1 and ABGA1 gene expression. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 19(1), 483–491. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00535-y>
- Ahmadi, H., Babalar, M., Sarcheshmeh, M. A. A., Morshedloo, M. R., & Shokrpour, M. (2020). Effects of exogenous application of citrulline on prolonged water stress damages in hyssop (Hyssopus officinalis L.): Antioxidant activity, biochemical indices, and essential oils profile. *Food Chemistry*, 333(March), 127433. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127433>
- Alinezhad, H., Azimi, R., Zare, M., Ebrahimzadeh, M. A., Eslami, S., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2013). Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of hyssopus officinalis L. Var. angustifolius. *International Journal of Food Properties*, 16(5), 1169–1178. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.578319>
- Alinezhad, H., Baharfar, R., Zare, M., Azimi, R., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2012). Biochemical activities of acetone extracts of Hyssopus angustifolius. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 69(4), 617–622.
- Arsenijević, J., Slavkovska, V., & Milenković, M. (2022). Anatomical characterization, chemical analyses and essential oil antimicrobial activity of Hyssopus officinalis L. (Lamiaceae). *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 68(03), 421–422. <https://doi.org/10.33320/maced.pharm.bull.2022.68.03.203>
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Astahova, L., Chupakhin, E., Belova, D., ... Ivanova, S. (2021). Evaluation of the conditions for the cultivation of callus cultures of hyssopus officinalis regarding the yield of polyphenolic compounds. *Plants*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/plants10050915>
- Baj, T., Blazewicz, A., Swiatek, L., Wolski, T., Kocjan, P., Glowinski, K. (2011). Analysis of phenolic acids in hyssop (Hyssopus officinalis L.) by HPLC-DAD with monolithic column ChromolithTM RP-18e, ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA VOL. XXIV, N 4, 5
- Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün). Nobel Tıp

- Kitabevleri, 2. Baskı, Ankara, s. 307-308, 1999.
- Bährle-Rapp, M. (2007). *Hyssopus officinalis*. *Springer Lexikon Kosmetik Und Körperpflege*, 276–276. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71095-0_5144
- Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N., & Božin, B. (2018). Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacological Research*, 133, 301–314. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.016>
- Benea, A., Ciobanu, C., Ciobanu, N., Pompus, I., & Cojocaru-Toma, M. (2022). Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from the Republic of Moldova. *The Moldovan Medical Journal*, 65(2), 41–46. <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.65-2.22.06>
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., ... Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. Davis conference. *Annals of Internal Medicine*, 107(4), 526–545. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-107-4-526>
- DEMİR, Z., & TÜRKAN, F. (2022). Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(4), 2386–2395. <https://doi.org/10.21597/jist.1161271>
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India*, 52(OCT), 794–804.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Erdal, R. (n.d.). Smyrna Tıp Dergisi Derleme İlk İnsandan Günümüze Fitoterapi - Antik Çağ (Bölüm -1) Phytotherapy From the First Man to the Present – Ancient Ages, 58–67.
- European pharmacopoeia 8.0. (2013).
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872–879. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
- Fatahinezhad, N., Lorigooini, Z., Arabi, M., Rabiei, Z., sheykhabani, S. K., &

- Rafieian-Kopaei, M. (2022). Effects of *Hyssopus Officinalis* Hydroalcoholic Extract on Pentylentetrazol-Induced Convulsive Seizures in Rat. *Neurochemical Research*, 47(12), 3792–3804. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03759-x>
- Fathiazad, F., & Hamedeyazdan, S. (2011). A review on *Hyssopus officinalis* L: Composition and biological activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(17), 1959–1966. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.527>
- Fathiazad, F., Mazandarani, M., & Hamedeyazdan, S. (2011a). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *hyssopusofficinalis* L. from iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(2), 63–67. <https://doi.org/10.5681/apb.2011.009>
- Fathiazad, F., Mazandarani, M., & Hamedeyazdan, S. (2011b). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *hyssopusofficinalis* L. from iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(2), 63–67. <https://doi.org/10.5681/apb.2011.009>
- Figueredo, G., Musa Özcan, M., Chalchat, J. C., Bagci, Y., & Chalard, P. (2012). Chemical composition of essential oil of *hyssopus officinalis* l. and *origanum acutidens*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 15(2), 300–306. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644051>
- Filip, Š., Rinaldi, L., & Castagna, F. (n.d.). In vitro anthelmintic potential of selected essential oils against gastrointestinal nematodes of sheep, 1–12.
- Gharakhani-Beni, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Javanmard, H., Soleymani, A., & Golparvar, A. (2023). Chemical compositions, yield and antioxidant activity of the essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) under intercropping with fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Natural Product Research*, 37(4), 675–680. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2078971>
- Gholami, M., Azhdari-Zarmehri, H., & Sadegh, M. (2019). Effects of aqueous extract of *Hyssopus officinalis* on seizures induced by pentylentetrazole and hippocampus mRNA level of iNOS in rats he Effects of Melatonin with Memantin on MPTP-Induced Parkinson View project neuroscience View project. *Article in Avicenna Journal of Phytomedicine*, 10(3), 213–221. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/335420400>
- Gorunovic, M. S., Bogavac, P. M., Chalchat, J. C., & Chabard, J. L. (1995). Essential Oil of *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae of Montenegro Origin. *Journal of Essential Oil Research*, 7(1), 39–43.

<https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698459>

- Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T., ... Lahiri, D. K. (2001). A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Current Medical Research and Opinion*, 17(3), 159–165. <https://doi.org/10.1185/0300799039117057>
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Paulina, M., Guevara, E., Paganetto, G., Grandini, A., ... Tacchini, M. (2021). Biological Activities.
- Hatipoğlu, G., Sökmen, M., Bektaş, E., Daferera, D., Sökmen, A., Demir, E., & Şahin, H. (2013). Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.028>
- Hristova, Y., Wanner, J., Jirovetz, L., Stappen, I., Iliev, I., & Gochev, V. (2015). Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(3), 592–601. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1020341>
- Javid, A., Motevalli Haghi, N., Emami, S. A., Ansari, A., Zojaji, S. A., Khoshkhui, M., & Ahanchian, H. (2019). Short-course administration of a traditional herbal mixture ameliorates asthma symptoms of the common cold in children. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 9(2), 126–133. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30984577> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6448545>
- Kara, N., Baydar, H., Kayaalp, Ö., Boyar, S., & Bayhan, A. K. (2014). Güneşte ve Gölgede Kurutmanın Çördük Otu (*Hyssopus officinalis* L .) Uçucu Yağ Oranı ve Kompozisyonuna Etkileri Effects of Drying in Sun and Shade on Essential Oil Content and Composition of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L .), 18(1), 85–90.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, 4(1), 50–59. Retrieved from <http://edergi.mehmetakif.edu.tr/index.php/sabed/index>
- KATAR, N., KATAR, D., & YILDIZ, E. (2021). Farklı kurutma sürelerinin Zufa/Çördük Otu (*Hyssopus officinalis* L.) bitkisinin verim ve uçucu yağ oranı üzerine etkisinin belirlenmesi. *Biological Diversity and Conservation*, 14(1),

28–34. <https://doi.org/10.46309/biodicon.2021.743654>

- Kizil, S., Haşimi, N., Tolan, V., Kiliç, E., & Karataş, H. (2010). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 99–103.
- Kürkçüoğlu, M., Eser, Ş. A., & Başer, K. H. C. (2016). Composition of the essential oil of the *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* (Bieb.) Arcangeli. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 3(2), 0–0.
- Loubidi, M., Jouha, J., Tber, Z., Khouili, M., Suzenet, F., Akssira, M., ... Guillaumet, G. (2018). Efficient synthesis and first regioselective C-6 direct arylation of imidazo[2,1-c][1,2,4]triazine scaffold and their evaluation in H₂O₂-induced oxidative stress. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 145, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.081>
- Ma, X., Ma, X., Ma, Z., Wang, J., Sun, Z., Yu, W., ... Ding, J. (2014). Effect of *Hyssopus officinalis* L. on inhibiting airway inflammation and immune regulation in a chronic asthmatic mouse model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(5), 1371–1374. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1978>
- Marty, A. T. (1999). *PDR for Herbal Medicines*. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* (Vol. 281). <https://doi.org/10.1001/jama.281.19.1853>
- Mazzanti, G., Battinelli, L., & Salvatore, G. (1998). Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 13(5), 289–294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(1998090\)13:5<289::AID-FFJ750>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(1998090)13:5<289::AID-FFJ750>3.0.CO;2-A)
- Menev, A. (1999). Hastalýklara Karşý Tutumlarýn Evrimi, 117–124.
- Mićović, T., Topalović, D., Živković, L., Spremo-Potparević, B., Jakovljević, V., Matić, S., ... Maksimović, Z. (2021). Antioxidant, antigenotoxic and cytotoxic activity of essential oils and methanol extracts of *hyssopus officinalis* l. Subsp. *aristatus* (godr.) nyman (lamiaceae). *Plants*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/plants10040711>
- Nile, S. H., Nile, A. S., & Keum, Y. S. (2017). Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic

- plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*, 7(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0706-9>
- Ortiz de Elguea-Culebras, G., Sánchez-Vioque, R., Berruga, M. I., Herraiz-Peñalver, D., González-Coloma, A., Andrés, M. F. é., & Santana-Méridas, O. (2018). Biocidal Potential and Chemical Composition of Industrial Essential Oils from *Hyssopus officinalis*, *Lavandula × intermedia* var. Super, and *Santolina chamaecyparissus*. *Chemistry and Biodiversity*, 15(1).
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201700313>
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z. (2015). Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331–336.
<https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545>
- Özçelik, G., & Toprak, D. (2015). Bitkisel Tedavi Neden Tercih Ediliyor? *Ankara Medical Journal*, 15(2), 48–58. <https://doi.org/10.17098/amj.05190>
- Özdede, M. (2017). Tıp Ve eczacılıkta evrim teorisinin önemi Ana Sayfa. Available at https://bilimveutopya.com.tr/index.php/tip-ve-eczacilikta-evrim-teorisinin-onemi#google_vignette
- Özer, H., Sökmen, M., Güllüce, Adigüzel, A., Kiliç, H., Şahin, F., ... Bariş, Ö. (2006). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Italian Journal of Food Science*, 18(1), 73–83.
- Özer, Hakan, Şahin, F., Kiliç, H., & Güllüce, M. (2005). Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* (Bieb.) Arcangeli from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(1), 42–44. <https://doi.org/10.1002/ffj.1421>
- Özkay, Ü. D., Öztürk, Y., & Can, Ö. D. (2011). Yapılan dünyanın hastalığı : Alzheimer hastalığı, 18(8), 35–42.
- Perry, N., Court, G., Bidet, N., Court, J., & Perry, E. (1996). European herbs with cholinergic activities: Potential in dementia therapy. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 11(12), 1063–1069. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1166\(199612\)11:12<1063::AID-GPS532>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1166(199612)11:12<1063::AID-GPS532>3.0.CO;2-1)
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E., & Komaitis, M. (2005). RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural*

- and *Food Chemistry*, 53(4), 1190–1195. <https://doi.org/10.1021/jf040083t>
- Redakcyjny, K. (n.d.). *UNIVĚRSITATIS MARIAE CURIĚ-SKŁODOWSKA*.
- Savill, P. (2019). *Populus L. The Silviculture of Trees Used in British Forestry*, 226–242. <https://doi.org/10.1079/9781786393920.0226>
- Sharifi-Rad, J., Quispe, C., Kumar, M., Akram, M., Amin, M., Iqbal, M., ... Cho, W. C. (2022). Hyssopus Essential Oil: An Update of Its Phytochemistry, Biological Activities, and Safety Profile. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022(January). <https://doi.org/10.1155/2022/8442734>
- Soheilikhah, Z., Modarresi, M., Karimi, N., & Movafeghi, A. (2021). Qualitative And Quantitative Analysis Of Diosmin Content Of Hyssop (Hyssopus Officinalis) In Response To Salinity Stress. *Heliyon*, 7(10), e08228. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08228>
- Srivastava, A., Awasthi, K., Kumar, B., Misra, A., & Srivastava, S. (2018). Pharmacognostic and pharmacological evaluation of hyssopus officinalis L. (Lamiaceae) collected from kashmir himalayas, India. *Pharmacognosy Journal*, 10(4), 690–693. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.4.114>
- Standard, I., & Preview, T. S. (1988). INTERNATIONAL STANDARD ISO iTeh STANDARD PREVIEW iTeh STANDARD PREVIEW. *Iso-8042*, 2013.
- Tahir, M., Khushtar, M., Fahad, M., & Rahman, M. A. (2018). Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant Hyssop (Hyssopus officinalis L.). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(7), 132–140. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8721>
- Tahir, M., Rahman, M. A., & Khushtar, M. (2022). Gastroprotective effect of Hyssopus officinalis L. leaves via reduction of oxidative stress in indomethacin-induced gastric ulcer in experimental rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(1), 291–300. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1685537>
- Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O. (2021). Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203–215. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/bursauludagziraat/issue/58016/721701>
- TOPCU, G., & KUSMAN, T. (2014). Lamiaceae Family Plants as a Potential Anticholinesterase Source in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Bezmialem Science*, 2(1), 1–25. <https://doi.org/10.14235/bs.2014.233>
- Türkiye Bitkileri Veri Servisi [internet]. Version 2.0 BETA.erişim adresi:

http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=4884 10 Ocak 2019

Türk Farmakopesi 2017, Ankara TC.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi cihaz Kurumu

Uluda, B., Enst, M., Ve, F., Tar, N., Tez, S., & Bursa, D. A. N. (2023). PAGANLARIN ELEŞTİRİLERİNE KARŞI MACARIUS MAGNES ' İN HİRİSTİYANLIK SAVUNUSU.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Vallejo, M. C. G., Herraiz, J. G., Pérez-Alonso, M. J., & Velasco-Negueruela, A. (1995). Volatile oil of hyssopus officinalis L. From Spain. *Journal of Essential Oil Research*, 7(5), 567–568. <https://doi.org/10.1080/10412905.1995.9698590>

Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag, I., Sevastre, B., ... Tilea, I. (2014). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for Hyssopus officinalis, Ocimum basilicum and Teucrium chamaedrys. *Molecules*, 19(5), 5490–5507. <https://doi.org/10.3390/molecules19055490>

Wang, N., & Yang, X. W. (2010). Two new flavonoid glycosides from the whole herbs of Hyssopus officinalis. *Journal of Asian Natural Products Research*, 12(12), 1044–1050. <https://doi.org/10.1080/10286020.2010.533120>

Wesołowska, A., Jadcak, D., Grzeszczuk, M., Wesołowska, A., Jadcak, D., & Grzeszczuk, M. (2010). Essential oil composition of hyssop (Hyssopus officinalis L.) cultivated in north-western Poland. *Herba Polonica*, 56(1), 57–65.

Wszelaki, N., Kuciun, A., & Kiss, A. (2010). Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharmaceutica*, 60(1), 119–128. <https://doi.org/10.2478/v10007-010-0006-y>

Zawislak, G. (2016). Essential Oil Composition of Hyssopus officinalis L. Grown in Poland. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 19(3), 699–705. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935034>

Teşekkür

Tez çalışmam süresince bana ismi gibi güler yüzüyle destek olan ve kıymetli bilgi ve birikimleriyle bana yol gösteren iyi ki dediğim sevgili danışman hocam Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülen İrem KAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

TABİA fabrikası ziyaretimde değerli bilgilerini aktaran ve benim fitoterapi alanında yüksek lisans yapmama vesile olan, ilham veren kıymetli eski Maliye Bakanımız Sayın Zekeriya TEMİZEL'e,

Laboratuar çalışmalarında yanımda olan sabırla bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nehir SOMER'e,

Çalışmalarım süresince manevi desteğini hissettiğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hüsniye Kayalar'a,

Fitoterapi alanında uzmanlaşmamızı sağlayan Farmakognozi kürsüsündeki değerli hocalarıma,

Zufa otunun temininde destek veren BAÇEM Şube Müdürü Sayın Nazım TANRIKULU'na,

MATAL analiz çalışmalarında destek veren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Zinar Pınar GÜMÜŞ'e

Hücre kültürü çalışmalarında destek veren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güliz ARMAĞAN'a,

Bitki teşhisinde destek veren Prof. Dr. Serdar Gökhan Şenol (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Botanik Anabilim Dalı)'a

Tez çalışmamıza mali destek sağlayan T.C. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'ne,

Yüksek lisans programına başvuruda beni cesaretlendiren ve yol gösteren Doç. Dr. Yusuf PUSTU ve Değerli eşi Seher ZAN PUSTU'ya

Tez çalışmam süresince beni anlayışla karşılayan destek veren Urla Devlet Hastanesi Eczane birimindeki mesai arkadaşlarıma,

Yüksek lisans süresince beni anlayışla karşılayan olgunlukla destek veren canım çocuklarım Eda ZEYBEK ve E. Seymen ZEYBEK'e ve her zaman yanımda olan değerli eşim Soner ZEYBEK'E

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 12.09.2024

Ecz. Gülhan ZEYBEK

Özgeçmiş

Adı Soyadı : Gülhan ZEYBEK
Ünvanı : Eczacı
Görev Yeri : Urla Devlet Hastanesi

Eğitim Bilgileri :

1993-2000 : Alaşehir Şehitleri Anadolu Lisesi
2000-2004 : Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

İş Deneyimi :

10.12.2004-14.08.2009	Serbest Eczacılık
27.01.2010-14.04.2010	Mecitözü Devlet Hastanesi
23.09.2010-26.05.2011	Şalpazarı Ayten Yılmaz Anadolu Sağlık Meslek Lisesi (Öğretmenlik)
08.07.2011-14.10.2014	Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi
26.05.2016-01.06.2016	Lüleburgaz Devlet Hastanesi
06.06.2016-10.08.2021	Vize Devlet Hastanesi
21.08.2020 – 14/12/2021	Söke Fehime Faik Kocagöz Devlet Hastanesi
14/12/2021-	Urla Devlet Hastanesi

Projeler :

Akılcı ilaç kullanımına yönelik koordinatörlüğümde "Akılcı İlaç Kullanımı Ve Atık İlaç Toplama Projesi " yapılmıştır.

Bu kapsamda Vize merkez ve 23 köyde halka ve okullara eğitimler verilmiştir. Proje kapsamında tarafımdan Akılcı İlaç Kitapçığı, Akılcı İlaç Kartı, Akılcı İlaç Çocuk Tiyatrosu, Akılcı ilaç Şarkısı hazırlanıp seslendirilmiştir.

.Dil Bilgisi :İngilizce (orta derece)

