

***MARRUBIUM VULGARE* L.'NİN FARMAKOGNOZİK İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Serhan Seha KOÇ

Eskişehir 2019

***MARRUBIUM VULGARE* L.'NİN FARMAKOGNOZİK İNCELENMESİ**

Serhan Seha KOÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ecz. Serhan Seha KOÇ'un "*Marrubium vulgare* L.'nin Farmakognozik İncelenmesi" başlıklı tezi 22/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ
Üye : Prof. Dr. Neşe KIRIMER
Üye : Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN
Enstitü Müdürü



FINAL APPROVAL FOR THESIS

This thesis titled “Pharmacognostical evaluation of *Marrubium vulgare* L.” has been prepared and submitted by Pharm. Serhan Seha KOÇ in partial fulfillment of the requirements in “Anadolu University Directive on Graduate Education and Examination” for the Degree of Master of Science in Pharmacognosy Department has been examined and approved on 22/08/2019.

Committee Members

Signature

Member (Supervisor)	: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ
Member	: Prof. Dr. Neşe KIRIMER
Member	: Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Director



ÖZET

Marrubium vulgare L.'nin Farmakognozik İncelenmesi

Serhan Seha KOÇ

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Lamiaceae familyası ülkemizde geniş yayılış göstermektedir. *Marrubium vulgare* L. bozotu olarak halk arasında tanınmakta ve farklı şekillerde kullanılmaktadır. Son yıllarda *M. vulgare* preparatlarına dünya çapında ilginin artmasından dolayı, ülkemizdeki hammadde potansiyelini değerlendirmek üzere, standart bitkisel drog materyali de kullanarak, kültür ve ticari formlarının Avrupa Farmakopesi'ne uygunluk testleri makroskobik ve mikroskobik olarak yapıldıktan sonra fitokimyasal ve biyolojik incelemeler de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ince tabaka kromatografisi, gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi genel kalite kontrol yöntemlerinin yanında aynı bitkisel ekstre preparatlarının *in vitro* olarak genel antimikrobiyal ve antioksidan potansiyelleri de standartlarla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Sonuç olarak hem fitokimsayasal hem de biyolojik aktivite açısından *M. vulgare* preparatlarının daha detaylı olarak incelenmesi gereği ortaya çıkmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Marrubium vulgare*, Farmakope analizleri, Biyolojik aktivite, İTK, GK/KS, YBSK.

ABSTRACT

Pharmacognostical evaluation of *Marrubium vulgare* L.

Serhan Seha KOÇ

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2019

Supervisor: Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Marrubium vulgare L., white horehound, or bozotu in Turkish is a perennial medicinal plant of the Lamiaceae family, which is used in folk medicine. The worldwide interest to *M. vulgare* preparations in recent years, urged the need to evaluate the potential of plant raw materials originated from Turkey. To compare the Pharmacopoeia quality of culture and commercial plant materials, standard herbal drug was used for the experiments. Initially, macroscopic and microscopic evaluation was followed by phytochemical and biological evaluations. Analytical techniques such as thin layer chromatography, gas chromatography-mass spectroscopy, high pressure liquid chromatography as well as biological evaluations such as *in vitro* antimicrobial and antioxidant assays were comparatively conducted. As an overall result, more detailed phytochemical and bioactivity elaborations of *M. vulgare* preparations from Turkish origin need to be performed to meet the Pharmacopoeial standards.

Keywords: *Marrubium vulgare*, Pharmacopoeia Analyses, Biological Activity, TLC, GC/MS, HPLC.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her türlü desteği ve imkânı sağlayan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Değerli bilgileri ve tecrübeleriyle bu çalışmada bana yardımcı olan başta kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Betül DEMİRCİ olmak üzere diğer bütün Farmakognozi Anabilim Dalı hocalarıma,

Bu tez çalışması sayesinde tanıma fırsatı bulduğum, laboratuvar çalışmalarında bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Emre ODUNCU'ya;

Yüksek lisans öğrenimlerimiz esnasında birlikte dersler aldığımız, bu tez çalışmasında bana çok destek olan sevgili arkadaşım Ecz. Damla KIRCI'ya,

Biyolojik aktivite analiz çalışmalarında destek veren Melek TEKGÖZ ve Oya BÜYÜKEMİR ile; sıvı kromatografisi analizlerinde yardımcı olan Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e,

Ticari bitkisel materyal temininde yardımlarından dolayı Dr. Dieter PAPER (AcanChia, Kümmersbruck, Almanya) ve Uzm. Ecz. Saadettin AKÇA'ya (Nativital, İstanbul);

Hayatım boyunca maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve bugünlere gelmemde sonsuz emeği olan anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

S. Seha KOÇ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

İbrahim Seha KOC

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

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

Serhan Serhan KOC

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
FINAL APPROVAL FOR THESIS.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Familya ve Cins Özellikleri.....	3
2.1.1. Lamiaceae familyasının genel özellikleri	3
2.1.2. <i>Marrubium</i> cinsinin genel özellikleri:.....	4
2.2. <i>Marrubium vulgare</i> Türünün Botanik Tanımlaması	5
2.3. Habitat, Morfoloji ve Mikroskopik Özellikler	6
2.4. Avrupa Farmakopesi'nde <i>Marrubium vulgare</i> L.....	9
2.5. Kimyasal Bileşenleri	10
2.6. Tıbbi Kullanımı.....	13
2.6.1. Solunum sistemi hastalıkları:.....	13

	<u>Sayfa</u>
2.6.2. Gastrik hastalıklar:.....	13
2.6.3. Geleneksel kullanımdaki diğer endikasyonlar:.....	14
2.7. <i>In Vitro</i> Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	14
2.7.1. Drog ile yapılan çalışmalar	14
2.7.1.1. Antispazmodik, antienflamatuvar ve analjezik etkiler ...	14
2.7.1.2. Gastroprotektif aktivite.....	15
2.7.1.3. Antimikrobiyal etkiler.....	16
2.7.1.4. Diüretik aktivite	19
2.7.1.5. Antihiperglisemik etkiler	19
2.7.1.6. Antioksidatif etkiler	20
2.7.1.7. Antikanser etkiler	21
2.7.2. Saflaştırılmış metabolitler ile yapılan çalışmalar.....	21
2.7.2.1. Koleretik aktivite	21
2.7.2.2. Antienflamatuvar etkiler.....	21
2.7.2.3. Analjezik etkiler	22
2.7.2.4. Vazorelaksan etkiler	23
2.7.2.5. Antioksidatif etkiler	24
2.8. Toksikolojik Veriler.....	24
2.8.1. Genel toksisite.....	24
2.8.2. Üreme ve gelişimsel toksisite.....	25
2.9. Klinik Çalışmalar.....	25
2.10. Pozoloji.....	26
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....	28
3.1. Bitkisel Materyal.....	28
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Standart Maddeler	32
3.3. Kullanılan Kimyasal Reaktifler.....	32
3.4. Kullanılan Materyal, Cihaz ve Apeyler	32
3.5. Deneyisel Çalışmalar ve Yöntemler	33
3.5.1. Mikroskopik inceleme	33
3.5.2. Kurutmada kayıp.....	33
3.5.3. Ekstrelerin hazırlanması	34

3.5.3.1. İnce tabaka kromatografisinde (İTK) kullanılan ekstrelerin hazırlanması.....	34
3.5.3.2. Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan ekstrelerin hazırlanması.....	34
3.5.3.3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (YBSK) kullanılan ekstrelerin hazırlanması	34
3.5.4. İnce tabaka kromatografisi (İTK).....	35
3.5.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK).....	35
3.5.6. Uçucu yağ eldesi	36
3.5.7. Gaz kromatografisi	38
3.5.7.1. GK analiz koşulları (GK-AİD)	38
3.5.7.2. GK-KS analiz koşulları	38
3.5.8. Biyolojik aktivite analizleri	38
3.5.8.1. Mikrobiyal aktivite analizi.....	38
3.5.8.1.1. Besiyeri ve numunelerin hazırlanışı	38
3.5.8.1.2. Agar kuyucuk difüzyon metodu	39
3.5.8.1.3. Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum	
inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi.....	39
3.5.8.2. Antioksidan aktivite analizi	40
3.5.8.2.1. DPPH radikal süpürücü etkisi	40
3.5.8.2.2. ABTS anyon süpürme aktivitesi	41
4. BULGULAR VE YORUMLAR.....	42
4.1. Makroskobik İnceleme.....	42
4.2. Mikroskobik İnceleme.....	42
4.3. Kurutmada Kayıp.....	44
4.4. Ekstre Verimi	45
4.5. İnce Tabaka Kromatografisi	45
4.6. Sıvı Kromatografisi	46
4.7. Gaz Kromatografisi	49
4.8. Biyolojik Aktivite Analizleri	53
4.8.1. Ekstrenin mikrobiyal aktivite analizi	53

	<u>Sayfa</u>
4.8.2. Ekstrenin antioksidan aktivite analizi	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
KAYNAKÇA.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>Marrubium</i> cinsinin dünya üzerindeki yayılış haritası	7
Şekil 2.2. <i>Marrubium vulgare</i> L. türünün Türkiye’deki dağılım haritas	8
Şekil 2.3. Marrubiin molekülünün kimyasal yapısı	9
Şekil 2.4. Prearrubiin molekülünün kimyasal yapısı.....	10

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Marrubium türlerinin Türkiye ve dünya genelinde dağılımı	7
Tablo 2.2. Marrubium vulgare türünde bulunan kimyasal bileşenler	10
Tablo 2.3. Bitkisel çay preparatı için önerilen dozaj ve kullanım	26
Tablo 2.4. Bitkinin sıkılmış suyunun (DEO 1:0,70-0,90) dozu ve kullanımı	27
Tablo 2.5. Ekstraksiyon çözücüsü %30 etanol (h/h) olan sıvı ekstrenin (DEO 1:0,9-1,1) dozu ve kullanımı	27
Tablo 2.6. Ekstraksiyon çözücüsü %30 etanol (h/h) olan sıvı ekstrenin (DEO 1:1) dozu ve kullanımı	27
Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan droglar ve kaynakları	28
Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan çözücü ve kimyasal maddeler	32
Tablo 3.3. Tez çalışmasında kullanılan cihaz/aparey ve markaları	32
Tablo 3.4. YBSK çalışmasının koşulları	35
Tablo 4.1. Kurutmada kayıp deneyi sonuçları	44
Tablo 4.2. Biyolojik aktivite analizlerinde kullanılan bitkisel ekstraktların verimi	45
Tablo 4.3. YBSK analizi sonucunda elde edilen marrubiin miktarları	47
Tablo 4.4. M. vulgare uçucu yağlarının bileşimleri	49
Tablo 4.5. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile yapılan mikrobiyal aktivite analiz sonuçları	53
Tablo 4.6. Mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan mikrobiyal aktivite analiz sonuçları	54
Tablo 4.7. DPPH radikal süpürücü etki sonuçları	54
Tablo 4.8. ABTS anyon süpürme aktivite sonuçları	54

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 2.1. <i>Marrubium vulgare</i> , yakından fotoğraf.....	5
Görsel 2.2. <i>Marrubium</i> tarlasından bir görüntü.....	6
Görsel 3.1. MV1 numunesinin ambalajı.....	28
Görsel 3.2. MV1 numunesi.....	29
Görsel 3.3. MV2 numunesi.....	30
Görsel 3.4. MV3 numunesine ait ambalaj	31
Görsel 3.5. MV3 numunesi.....	31
Görsel 3.6. Uçucu yağ eldesinde kullanılan Clevenger apareyi düzeneği.....	37
Görsel 3.7. Distilasyon işlemi sonucunda elde edilen uçucu yağ.....	37
Görsel 4.1. MV1 numunesinin mikroskop görüntüleri.....	43
Görsel 4.2. MV2 numunesinin mikroskop görüntüleri.....	43
Görsel 4.3. MV3 numunesinin mikroskop görüntüleri.....	44
Görsel 4.4. Elde edilen 6 farklı ekstrenin kromatogram görüntüleri	45
Görsel 4.5. Standart madde olarak marrubiin ve	46
Görsel 4.6. MV1 örneğine ait kromatogram.....	47
Görsel 4.7. MV2 örneğine ait kromatogram.....	48
Görsel 4.8. MV3 örneğine ait kromatogram.....	48
Görsel 4.9. Marrubiin'e ait kromatogram	49
Görsel 4.10. Tanımlanamayan bileşenin kütle spektrumu.....	51
Görsel 4.11. MV1 örneğine ait GK-KS kromatogramı	52
Görsel 4.12. MV2 örneğine ait GK-KS kromatogramı	52
Görsel 4.13. MV3 örneğine ait GK-KS kromatogramı	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a/a	: Ağırlıkça yüzde (ağırlık/ağırlık)
ABTS ⁺	: 2,2-azinobis(3-etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)
ATCC	: American Type Culture Collection
CFU	: Colony-forming unit – koloni oluşturan birim
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
COX	: Cyclooxygenase – siklooksijenaz
DEO	: Drog-ekstre oranı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH [•]	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EMA	: European Medicines Agency – Avrupa İlaç Kurumu
FID	: Flame Ionization Detector – alev iyonlaşma dedektörü
GK-AİD	: Gaz kromatografisi – alev iyonlaşma dedektörü
GK-KS	: Gaz kromatografisi – kütle spektrometrisi
HDL	: High-density lipoprotein – yüksek yoğunluklu lipoprotein
IC	: Inhibitory concentration – inhibisyon konsantrasyonu
IC ₅₀	: Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu
ID	: Infective dose – enfektif doz
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
İZ	: İnhibisyon zonu
LDL	: Low-density lipoprotein – düşük yoğunluklu lipoprotein
M _A	: Moleküler ağırlık
MHA	: Mueller Hinton agar
MHB	: Mueller Hinton broth
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MRSA	: Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PDA	: Potato dextrose agar
TÜBİVES	: Türkiye Bitkileri Veri Servisi
UV	: Ultraviyole
YBSK	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanoğlu geçmişten beri çeşitli hastalıkların tedavisi, önlenmesi ve semptomlarının hafifletilmesi amacıyla halk hekimliğinde bitkilerden yararlanmıştır. İlerleyen teknoloji ve yapılan bilimsel araştırmaların ışığında sentetik ilaçlar üretilmiş ve bitkisel kaynaklı ilaçların kullanımı giderek azalmıştır. Ancak son zamanlarda dünya genelinde insanlarda başlayan doğala dönüş eğilimi, gıda ve kozmetik alanında olduğu gibi ilaç ve takviyelerde kendini göstermektedir. Bazı bitkisel kaynaklı preparatlar, uzun yıllar boyunca kullanılarak etkileri deneyimlenmiş ve geleneksel kullanıma tabi olmuştur. Bitkilerin deneyimlenen bu etkileri literatür verileriyle birlikte doğrulandıktan sonra, çeşitli işlemler sonucunda geleneksel bitkisel tıbbi ürünler elde edilmektedir. Geniş florasıyla birlikte çok sayıda türe ev sahipliği yapan ülkemizde de bu bağlamda büyük bir potansiyel bulunmaktadır.

Lamiaceae familyasından çok yıllık bir bitki olan *Marrubium vulgare* L.; Avrupa, Asya ve Kuzey Afrika başta olmak üzere dünya geneline yayılmıştır. Türkiye’de “bozotu”, “boz ot” ve “karaderme” adıyla bilinen bitkinin kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır. *M. vulgare*’nin halk hekimliğinde oral yolla akut ve kronik bronşit, boğmaca, astım, tüberküloz, pulmoner mukoza iltihabı, solunum sistemi enfeksiyonları, diyare, sarılık, halsizlik, ağrılı menstrüasyon gibi şikâyetlerde ve yüksek dozda laksatif olarak; haricen ise deri hasarı, ülseri ve yaralanmalarında ve ağız ve boğaz enfeksiyonlarında da gargara şeklinde kullanıldığı belirtilmiştir [1]. Farmakope ve monograflarda ise akut bronşit, kuru öksürük ve soğuk algınlığı ile iştah kaybı ve dispepsi şikâyetlerinde kullanıldığı bildirilmiştir [2]. Literatür incelendiğinde bitkisel preparasyonlar antibakteriyel, antioksidan, hipertansif, analjezik, antiinflamatuvar, hipoglisemik, vazodilatör, antidiyabetik ve yara iyileştirici vb. özellikler gösterdiği görülmektedir [3-12].

Literatürlerde *M. vulgare*’nin Avrupa dışında da geleneksel olarak kullanıldığı görülmektedir. Örneğin Pakistan’da öksürük, mukoz membran iltihabı, histeri, romatizma gibi rahatsızlıklarda ve emetik olarak kullanıldığı bildirilmiştir [13]. Brezilya’da geleneksel kullanımda tedavi amacıyla enflamasyonda, gastrointestinal şikâyetlerde ve solunum sistemi rahatsızlıklarında kullanıldığı kayıtlarda mevcuttur [4, 14, 15]. Tunus’ta halk hekimliğinde *M. vulgare* hipotansif, hipoglisemik ve kardiyotonik amaçlı kullanılmıştır [7]. Ayrıca *M. vulgare*’nin ilaç dışı kullanımı da mevcuttur. *M. vulgare*

ekstreleri aynı zamanda içeceklerde (bira yapımında şerbetçi otu yerine) ve şekerlerde aroma verici olarak kullanılmaktadır [16, 17].

Dünyada bitkisel ürün kullanımına yön veren en büyük pazarlardan biri olan Amerika Birleşik Devletleri'nde yer alan American Botanical Council'e ait HerbalGram isimli dergisinde *M. vulgare*, 2013-2017 yılları arasında ardaşık olarak 5 yıl en çok satılan / kullanılan bitkisel ürün olarak kayıtlara geçmiştir.

Bu tez çalışması ile, Anadolu'da yetişebilen ve ülkemizde unutulmaya yüz tutmuş bu bitkinin, temin edilen üç farklı örneğinin, standardize bitkisel ürünlerin üretilmesinde hammadde olarak kullanılıp kullanılamayacağı konusunda fikir elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda etkileri güvenilir literatür verileriyle kanıtlanmış ve uzun yıllardır kullanılarak geleneksel kullanım kategorisine girmiş *M. vulgare* bitkisi hakkında farmakognozik bir inceleme yapılmıştır. Almanya'dan sağlanan Avrupa Farmakopesi'ne uygun olduğu belirtilen bitkisel drog ile yurtiçinden temin edilen kültür örneği ve ticari olarak tedarik edilen bitki numunelerinin bitki örnekleri makroskobik ve mikroskobik olarak, ayrıca farklı ekstrelerinin fitokimyası kromatospesktal analizler ile incelenmiş, ayrıca ekstrelerin *in vitro* biyolojik aktivite çalışmaları karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Familya ve Cins Özellikleri

2.1.1. Lamiaceae familyasının genel özellikleri

Otsu ve çalı formunda, gövdesi salgı tüylü, aromatik kokulu, çoğunlukla dört köşelidir. Yapraklar stipulasız, basit, bazen pinnat, daima dekussattır. Çiçek durumu, üst yapraklar ve braktelerin koltuklarından panikula şeklinde meydana gelmekte ve genellikle gittikçe daralan halkalar (vertisillat) oluşturmaktadır. Bunun dışında diğer çiçeklenme şekilleri; spika (başak), kapitula (baş) veya rasemoz (salkım) biçiminde olup çiçekler ya hermafrodit ya da ginodioiktir. Brakteler belirgin şekilde yapraklardan farklı ya da çiçeklenme döneminde iken yapraklara benzer görünürler. Brakteol familya üyelerinin bir kısmında bulunup bir kısmında bulunmayabilir. Kaliks genellikle üç dişli bazen üst dudak ve iki dişli alt dudak ile beş loplü, 5-20 damarlı, aktinomorf simetridir. Korolla gameopetalus (bileşik taç yapraklı), zigomorf (tek simetridi) ve iki dudaklıdır. Üst dudak genellikle belirsiz iki loplü olup tepede falçata biçimlidir. Düz veya İç bükeye yakın alt dudak üç loplüdür. Nadiren korollada üst dudak indirgenmiş ve alt dudak beş loplüdür veya bir üst ve dört alt loplü ya da aktinomorf korolla şeklindedir. Stamenler korolla ile bitişik dört tane ve didinam stamen şeklinde veya iki kısır erkek organa sahip iki stamen şeklindedir. Dıştaki çift içtekinden genellikle daha kısa olan iki tekalı antere sahip, stamenler paralel veya divergent olup nadiren (*Salvia*'lardaki gibi) uzamış konnektifler tarafından ayrılmıştır. Ovaryum üst durumlu iki karpelli ve dört tohum taslaklı, dört loplüdür. Stilus çoğunlukla ginobazik olup yukarıya doğru kısa iki parçalıdır.

Meyve dörtlü, nadiren daha az kuru fındıksı (nutlet) tohumlu olup, seyrek olarak etli olabilir. Tohumlar ıslandıklarında müsilağı yapıya sahip olurlar. Lamiaceae familyasına dâhil 21 cinste bu özellik görölmektedir.

Lamiaceae stomaları genel olarak diasitiktir. Familya üyelerinde çok hücreli, başlı (kapitat) glandular sık tüylerin yanında değişik tipte tüylere de rastlanmaktadır. Bazı cinslerde iç salgı hücreleri de bulunmaktadır. Çok fazla olmayan okzalatlari değişik şekillerde görölebilmektedir.

Dört köşeli olan gövdenin köşeleri, kollenkimatik özellik gösterir. Bazı cinslerde ya yüzeysel ya da derin bir periderm bulunmaktadır. Endodermis çoğunlukla iyi farklılaşmıştır. Sekonder odun ve soymuk elemanları (paket) genellikle yaşlı gövdelerde

devamlı fakat trakeler genel olarak demetler şeklinde gruplaşmış durumdadır. Familya odunu, yarı porludur. Trakeler küçük ve ışınsal bir bant şeklinde yerleşmiştir. Perforasyonlar (delikler) basit, geçitler küçük almalı, spiral kalınlaşmalar siktir. Lifler basit geçitli, bazı cinslerde ise bölmelidir. Parankima çoğunlukla ışınsal bant şeklinde ve paratrakeol tiptedir. Işınsal heterojen, bir veya çok sıralıdır [18].

2.1.2. *Marrubium* cinsinin genel özellikleri:

Marrubium cinsinin bilimsel olarak sınıflandırılması aşağıdaki gibidir [19]:

Âlem: Plantae

Alt âlem: Viridiplantae

Infra âlem: Streptophyta

Üst bölüm/Üst şube: Embryophyta

Bölüm/Şube: Tracheophyta

Alt bölüm/Alt şube: Spermatophytina

Sınıf: Magnoliopsida

Üst takım: Asteranae

Takım: Lamiales

Familya: Lamiaceae

Cins: *Marrubium* L.

Tek yıllık ya da çok yıllık bitkiler. Yapraklar dişli, gövdeler olduğu gibi yoğun tüylü, taban kısımları nadiren kordat. Çevrel çiçekler florai yaprakların koltuklarla desteklenmiş, her çiçek bir dış, iki iç brakteolle desteklenmiştir. Kaliks hafif obkonikal; 10 damarlı, 9-10-30 dişli, kaliks tüpünün dış kısmı yoğun tüylü, ağzın iç kısmı çimen gibi uzun tüylerle kaplı. Korolla beyaz, sarımsı ya da morun değişik tipleri renginde, dış tarafı tüylü, iki dudaklı, üst dudak düz olup ikiye çatallanmış, alt dudak üç loplulu, tüp kaliks içinde, iç tarafı düz olmayan tüylerle kaplı ya da tüysüz. Stamenler 4 adet, paralel, ait çift uzun, tümü korolla tüpünün içinde; anter tekalan birbirinden ayrılmış. Meyvalar düz, trunkat ya da uçta yuvarlak [18].

Marrubium cinsinin ülkemizde 23 taksonu yayılış göstermekte olup bu taksonlardan 14 tanesi Türkiye için endemiktir [20, 21].

2.2. *Marrubium vulgare* Türünün Botanik Tanımlaması

Ömür: Çok yıllık

Yapı: ot

Çiçeklenme: 4-8

Habitat: yol kenarları, tebeşirli kıyı kenarları, bozkır aşınmış tepeler

Yükseklik: 0-1400 m

Endemik: Endemik değil

Türkiye dağılımı: Dış ve O. Anadolu

Genel Dağılımı: Avrupa-Asya, K. Afrika [20, 21]



Görsel 2.1. *Marrubium vulgare*, yakından fotoğrafı (<http-1>)



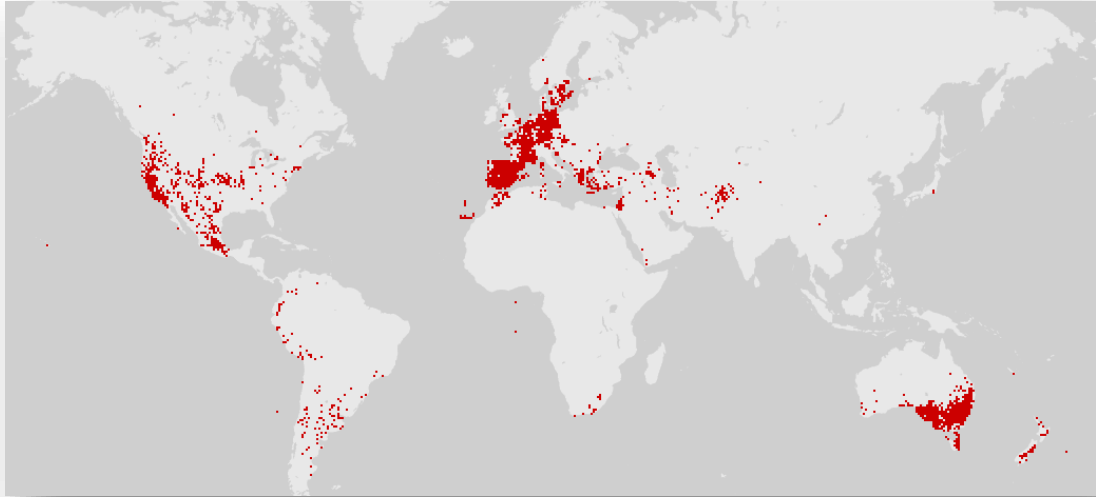
Görsel 2.2. *Marrubium* tarlasından bir görüntü (<http-2>)

Dik, küçük dallanmış çok yıllık bitkiler. Gövde 20-60 cm uzunluğunda, yoğun piloz, alt kısım beyazımsı; üst kısım grimsi. Yapraklar saplı, ovatdan orbikulara kadar değişen şekillerde, krenat, her iki yüz stellat tüylü, alt kısım beyazımsı ya da grimsi, üst kısım koyu grimsi-yeşil. Çevrel çiçekler birkaç çiçekten oluşmuş; brakteoller hemen hemen kaliks tüpüne eşit ya da ondan uzun. Kaliks 3,5-4,5 mm uzunluğunda, yoğun stellat-piloz; dişler (-5)10 adet, dağınık, sirsinat kadar değişen şekillerde, birbirine eşit yada değil, 1,5 - 2 mm uzunluğunda, uzunluklarının 1/2 - 2/3'ü stellat-piloz. Korolla beyaz ya da krem renginde, dış kısmı yoğun stellat-piloz, üst dudağa kadar tüylü ya da tüysüz. Meyvalar grimsi-kahverengi 2 mm'ye kadar uzar [18].

2.3. Habitat, Morfoloji ve Mikroskobik Özellikler

Marrubium cinsi, dünyada geniş olarak yayılım göstermektedir. “World Checklist of Selected Plant Families” veri tabanına göre şu bölgelerde doğal olarak bulunmaktadır: Afganistan, Almanya, Arnavutluk, Avusturya, Baltık Devletleri, Batı Himalaya, Belçika, Beyaz Rusya, Bulgaristan, Cape Verde, Cezayir, Çekoslovakya, Danimarka, Doğu Ege, Fas, Filistin, Fransa, Girit, Hollanda, İngiltere, Irak, İran, İspanya, İsveç, İsviçre, İtalya, Kanarya Adaları, Kazakistan, Korsika, Kuzey Kafkasya, Kıbrıs, Kırgızistan, Kırım, Libya, Lübnan-Suriye, Macaristan, Mısır, Nepal, Özbekistan, Pakistan, Polonya,

Portekiz, Romanya, Rusya, Sardinya Adası, Sicilya, Sina Yarımadası, Suudi Arabistan, Tacikistan, Trans Kafkasya, Tunus, Türkiye, Türkmenistan, Ukrayna,, Yugoslavya, Yunanistan [22]



Şekil 2.1. *Marrubium* cinsinin dünya üzerindeki yayılış haritası [23]

TÜBİVES veri tabanına göre ise Türkiye’de dağılım gösteren *Marrubium* türlerinin sayısı 23’tür. Bu türlerin Türkiye’deki ve dünya genelindeki dağılımı ise Tablo 2.1’de şu şekilde belirtilmiştir:

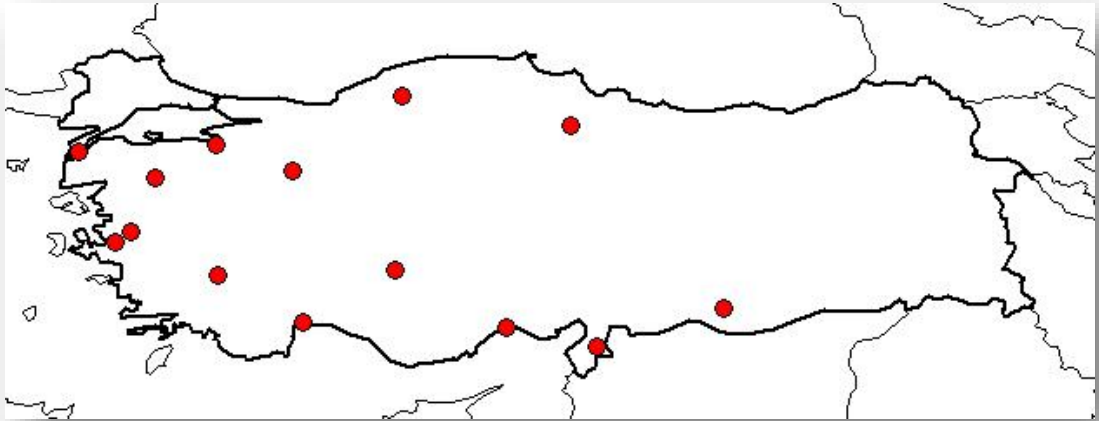
Tablo 2.1. *Marrubium* türlerinin Türkiye ve dünya genelinde dağılımı [20, 21]

Türler	Türkiye Dağılımı	Genel Dağılımı
<i>Marrubium vulgare</i>	Dış ve O. Anadolu	Avrupa-Asya, K. Afrika
<i>Marrubium anisodon</i>	D., GD., O. ve G. Anadolu	GB. Avrupa, Kafkasya, İran, Afganistan, Pakistan, Kaşmir, O. Asya
<i>Marrubium parviflorum</i> subsp. <i>parviflorum</i>	Karasal Anadolu	G. Rusya, Kafkasya, İran, Balkanlar
<i>Marrubium parviflorum</i> subsp. <i>oligodon</i>	Karasal Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium cuneatum</i>	D. Anadolu	K. Irak, İran, Filistin, Suriye
<i>Marrubium persicum</i>	KD. Anadolu	KB. İran, Taliş, Kafkasya
<i>Marrubium vanense</i>	D. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium vulcanicum</i>	D. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium heterodon</i>	G. ve K. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium bourgaei</i> subsp. <i>bourgaei</i>	GB. Anadolu	Türkiye

Tablo 2.1. (Devam) *Marrubium* türlerinin Türkiye ve dünya genelinde dağılımı

<i>Marrubium bourgaei</i> subsp. <i>caricum</i>	GB. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium rotundifolium</i>	B. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium globosum</i> subsp. <i>globosum</i>	O. ve G. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium globosum</i> subsp. <i>micranthum</i>	G. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium trachyticum</i>	O. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium lutescens</i>	O., B. ve G. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium cephalanthum</i>	O. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium peregrinum</i>	Trakya, B., KB. ve bitişigi O. Anadolu	O. ve GB. Avrupa, Doğuya Ciskafkasya'ya
<i>Marrubium depauperatum</i>	O. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium astracanicum</i> subsp. <i>astracanicum</i>	K., G. ve Karasal Anadolu	Kafkasya, K. Irak, İran
<i>Marrubium astracanicum</i> subsp. <i>macrodon</i>	O. ve GB. Anadolu	Türkiye
<i>Marrubium cordatum</i>	GD. Anadolu	KB. İran, K. Irak
<i>Marrubium catariifolium</i>	D. Anadolu	Kafkasya

Marrubium vulgare L. TÜBİVES veri tabanına göre Amasya, Antalya, Balıkesir, Bursa, Denizli, Eskişehir, Hatay, İzmir, İçel, Karabük, Konya, Manisa, Çanakkale, Şanlıurfa illerinde yayılış göstermektedir [20, 21].



Şekil 2.2. *Marrubium vulgare* L. türünün Türkiye'deki dağılım haritası [24]

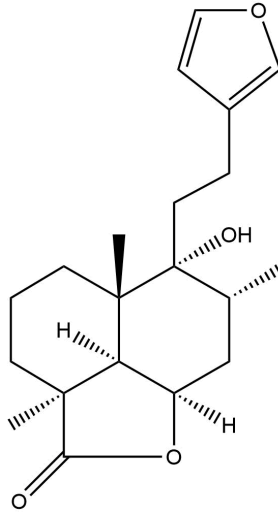
Mikroskopi

Marrubii Herba droğunun mikroskopisi Avrupa Farmakopesi 8.0’de şu şekilde tanımlanmıştır:

“Toz grimsi-yeşil. Girintili çıkıntılı, çok köşeli epiderma hücreleri ve alt epidermada daha çok sayıda diasitik (2.8.3) stoma içeren yaprak epidermasına ait parçalar, iğne veya druz şeklinde kalsiyum oksalat kristalleri taşıyan mezofil; çok sayıda 100-200 µm uzunlukta, tek veya çok hücreli ve 2-6 hücreden oluşan tek sıralı, boğum yerlerinde şişkin, kıvrılmış veya helezoni örtü tüyleri; yıldız tüyler 2 tip, bazıları kısa tek hücreli bir saptan çıkan 15-20 dala ayrılmış, diğerleri sesil bir tabandan çıkan daha az dallanmış; salgı tüyleri Lamiaceae tipi, 8 hücreli; bazıları 1-2 hücreli sap ve 1-4 hücreli başı olan salgı tüyleri; kaliksin iç yüzünde 1000 µm uzunlukta 2-3 hücreli, şişkin eklem yerlerinde kalınlaşmış, üst hücreleri uzamış örtü tüyleri; küre şeklindeki polenler 25 µm çapında, düz eksinli; gövde ve damarlardan gelen iletim demetleri içerir (Ph. Eur. 8.0, 2014).”

2.4. Avrupa Farmakopesi’nde *Marrubium vulgare* L.

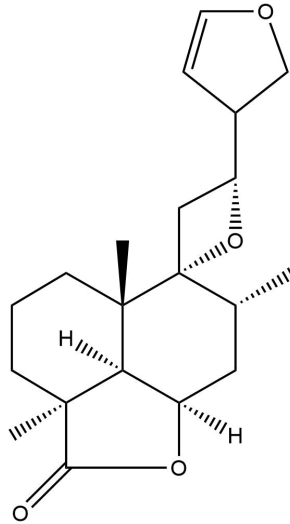
Avrupa Farmakopesi’ne göre *M. vulgare* L. bitkisine ait bütün ya da parçalara ayrılmış, kurutulmuş, çiçekli toprak üstü kısımları; Marrubii herba olarak tanımlanmıştır. Kuru drog üzerinden minimum olarak yüzde 0,7 marrubiin ($C_{20}H_{28}O_4$) içermelidir [25].



Şekil 2.3. Marrubiin molekülünün kimyasal yapısı

2.5. Kimyasal Bileşenleri

Bu tür ile yapılan fitokimyasal çalışmalar; bitkinin yapısında alkaloidler, steroidler, laktonlar, terpenler, tanenler, şekerler ve C vitamini gibi çeşitli kimyasal bileşenlerin bulunduğunu göstermiştir. *M. vulgare* ekstrelerinde bulunan ana bileşik marrubiin, furanik labdan tipi bir diterpen yapısındadır ve ekstraksiyon esnasında sıcaklığın etkisi ile yine bir diterpen olan premarrubiinden (Şekil 2.4.) meydana gelmektedir[26]. *M. vulgare*'de marrubiin dışında apigenin, apigenin 7-O-glukozit, apigenin 7-laktat, apigenin 7-(6''-p-kumaroil)-glukozit, luteolin, luteolin 7-O-β-D-glukozit, luteplin 7-laktat, krysoeriol, kersetin 3-O-α-L-ramnosil-glukozit, izokersetin, ursolik asit, gallik asit, kafeik asit, maleik kafeoil, vulgarol, vulgarin, β-sitosterol, stigmasterol, viteksin, akteozit, forsitozit B, arenariozit, ballotetrozit, marrubozit, asetil marrubozit, pre-marrubiin, marrubenon, fenilpropanoit esterleri ve monotерpenler yer almaktadır [4, 27-33].



Şekil 2.4. Prearrubiin molekülünün kimyasal yapısı

M. vulgare bitkisinde “Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases” adlı veri tabanına göre 65 tanesi aktiviteye sahip olmak üzere toplamda 121 kimyasal bileşen bulunmaktadır ve bu kimyasal bileşenler Tablo 2.2.’de gösterilmiştir [34, 35].

Tablo 2.2. *Marrubium vulgare* türünde bulunan kimyasal bileşenler

Kimyasal	Bitki Kısım	%	Kaynak
1,8-sineol	Uçucu yağ	1,49	[36]
1-Okten-3-ol	Uçucu yağ	2,35	[37]
		2,48	[36]

Tablo 2.2. (Devam) *Marrubium vulgare* türünde bulunan kimyasal bileşenler

4,8,12,16- Tetrametil heptadekan-4-olid	Uçucu yağ	16,97	[37]
Apigenin	Bitki geneli		[38]
	Yaprak, filiz		[34]
Apigenin-7-glikozit	Bitki geneli		[38]
Askorbik asit	Bitki geneli, çiçek		[34]
Benzaldehit	Uçucu yağ	2,31	[37]
Betonisin	Bitki geneli, filiz		[34]
Borneol	Uçucu yağ	1,12	[36]
Dehidro-sabina keton	Uçucu yağ	4,12	[37]
Fitol	Bitki geneli		[39]
	Uçucu yağ	4,87	[37]
Fitosteroller	Bitki geneli		[40]
Gallik asit	Çiçek, bitki geneli		[34]
Germakren D	Uçucu yağ	9,37	[7]
Germakren D-4-ol	Uçucu yağ	9,61	[37]
İzokaryofilen	Uçucu yağ (Toprak Üstü Kısımlar)	14,1	[41]
İzokersetin	Bitki geneli, filiz		[34]
Kafeik asit	Bitki geneli		[34]
Kamfen	Bitki Geneli, Uçucu yağ		[34]
Karvakrol	Uçucu yağ	36,28	[36]
Karvil asetat	Uçucu yağ	11,52	[36]
Kersetin	Bitki geneli		[40]
Klorojenik asit	Bitki geneli		[34]
Kolin	Yaprak, bitki geneli, filiz, çiçek		[34]
Kosmosiin	Yaprak, filiz		[34]
Krizoeriol	Bitki geneli, yaprak		[34]
Limonen	Bitki Geneli, Uçucu yağ		[34]
Linalool	Uçucu yağ	3,86	[36]
Luteolin	Bitki geneli		[38]
	Yaprak, filiz		[34]
Marrubiin	Bitki geneli, çiçek, tohum,		[34]
	Yaprak, filiz		
Marrubiinik asit	Bitki geneli		[42]
Müsilaj	Bitki geneli		[34]
Pektin	Bitki geneli		[34]
Piperiton	Uçucu yağ	3,27	[37]
P-simen	Bitki Geneli, Uçucu yağ		[34]
Sabinen	Bitki Geneli Uçucu yağ		[34]

Tablo 2.2. (Devam) *Marrubium vulgare* türünde bulunan kimyasal bileşenler

Saponinler	Bitki geneli		[39]
Sclareol	Bitki geneli		[43]
Sinarosid	Yaprak, filiz		[34]
Sitronellil format	Uçucu yağ	9,50	[7]
Stakhidrin	Bitki geneli		[42]
Tannik asit	Bitki geneli		[34]
Tannin	Çiçek		[34]
	Bitki geneli		[44]
Trans-karyofilen	Uçucu yağ	4,06	[36]
Trans-sabinen hidrat	Uçucu yağ	3,29	[36]
Ürsolik asit	Yaprak, çiçek, bitki geneli		[34]
			[34]
			[34]
Visenin-2	Yaprak, bitki geneli		[34]
Viteksin	Yaprak		[34]
	Bitki geneli		[42]
α -pinen	Uçucu yağ	9,37	[37]
			[34]
	Bitki geneli		[43]
α -terpinen	Uçucu yağ	3,83	[36]
β -bisabolen	Uçucu yağ	20,4	[41]
β -elemen	Bitki geneli		[34]
β -fellandren	Uçucu yağ	15,49	[36]
β -pinen	Bitki Geneli, Uçucu yağ		[34]
		3,53	[36]
β -sitosterol	Bitki geneli		[39]
	Filiz		[34]
β -sitronellol	Uçucu yağ	9,90	[7]
β -tuyon	Uçucu yağ	2,93	[36]
γ -ödesmol	Uçucu yağ	11,93	[7]
δ -kadinen	Uçucu yağ	3,13	[37]
	Uçucu yağ (Toprak Üstü Kısımlar)	19,1	[41]

2.6. Tıbbi Kullanımı

Farmakope ve literatürlerde *M. vulgare*'den elde edilen bitkisel hammadde ve preparatların şu endikasyonlarda kullanıldığı belirtilmiştir [45]:

2.6.1. Solunum sistemi hastalıkları:

- Solunum yolundaki mukoz membran iltihapları [46]
- Akut bronşit, kuru öksürük, solunum yolundaki mukoz membran iltihapları [2]
- Öksürüklerin tedavisinde geleneksel kullanıma sahip olduğu belirtilmiştir
- Akut bronşiyal hastalıklarda geleneksel kullanıma sahip olduğu belirtilmiştir [47]
- Solunum yolundaki mukoz membran iltihapları [48]
- Solunum yolundaki sekretolitik aktiviteyi destekleyici olarak geleneksel kullanıma sahip olduğu belirtilmiştir [49]
- Akut ya da kronik bronşit, bronşit ile birlikte kuru öksürük, boğmaca [50, 51]
- Ekspektoran [50-53]
- Ekspektorandır. İnfüzyon, oksimel ya da şurup formunda olabilir. Öksürük, soğuk algınlığı ve pulmoner hastalıklarda kullanımı vardır [54]
- Solunum yolundaki mukoz membran iltihapları [55-57]
- Öksürük, bronşit, solunum yolundaki mukoz membran iltihapları [1]

2.6.2. Gastrik hastalıklar:

- Şişkinlik ve gaz gibi dispeptik şikâyetler.
- Marrubik asit koleretik olarak kullanılır. [48]
- Gastrointestinal işleyişi destekleyici amaçlı geleneksel kullanım [49]
- Şişkinlik ve gaz gibi dispeptik şikâyetler. [46]
- Dispepsi [2]
- Yüksek dozlarda laksatif olarak [54]
- Dispeptik şikâyetler [55-57]
- Kolagog [58-60]
- Şişkinlik ve gaz gibi dispeptik şikâyetler, karaciğer ve safra kesesi rahatsızlıkları [1]

2.6.3. Geleneksel kullanımdaki diğer endikasyonlar:

- İştahsızlık [1, 46, 48, 55-57]
- İştah eksikliği [2]

Ayrıca Avrupa İlaç Kurumu tarafından yayınlanan bir raporda, Avrupa ülkelerinde piyasada bulunan ürünler için yetkili makamlarca belirlenen şu endikasyonlar belirtilmiştir [45]:

- a) Taze Marrubii herba sıkılmış suyu (1:0,70-0,90): Solunum yolundaki mukoz membran iltihapları; şişkinlik ve gaz gibi dispeptik şikâyetler
- b) Marrubii herba sıvı ekstresi (1:0,9-1,1) (çözücü %30 (h/h) etanol): solunum yolundaki sekretolitik aktiviteyi destekleyici

Yine aynı raporda piyasada bulunan ürünlerle ilgili literatürlerde geçen şu endikasyonlar monograf tarafından kabul edilmiştir:

- a) Soğuk algınlığı ile ilişkili kuru öksürükte geleneksel bitkisel tıbbi ürünün kullanılması
- b) Şişkinlik ve gaz gibi orta dereceli dispeptik şikâyetlerde geleneksel bitkisel tıbbi ürünün kullanılması
- c) Geçici iştah kaybında geleneksel bitkisel tıbbi ürünün kullanılması

2.7. In Vitro Biyolojik Aktivite Çalışmaları

2.7.1. Drog ile yapılan çalışmalar

2.7.1.1. Antispazmodik, antienflamatuvar ve analjezik etkiler

Schlemper ve diğerleri (1996) *M. vulgare* kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen hidro-alkolik ekstrenin (Drog ekstre oranı (DEO) 1:3, %50 etanol) çeşitli kaslar üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla *in vitro* çalışmalar yapmıştır. Sonuçlar ekstrenin; asetilkolin, bradikinin, prostaglandin E2, histamin ve oksitosin gibi bazı nörotransmitterleri inhibe ederek belirgin antispazmodik etki gösterdiği şeklinde bulunmuştur. Bulgular; ekstrenin konsantrasyona bağımlı (100, 300 ve 1000 µg/mL) yarışmasız inhibisyon profili gösterdiğini ve oluşan maksimum yanıtın agonistler ile herhangi bir intraselüler etkileşim durumunda azalacağını öne sürmektedir [61].

De Souza ve diğerleri (1998) *M. vulgare*'den elde edilen hidroalkolik ekstrenin olası analjezik etkilerini araştırmak için değişik ağrı modelleri ile fareler üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Kurutulmuş *M. vulgare* yaprak, gövde ve kökleri karıştırılmış ve %50 etanol-su çözeltisi ile ekstre edilmiştir (DEO 1:3) ve 14 gün boyunca oda sıcaklığında maserasyona bırakılmıştır. Sonuçlar ekstrenin intraperitoneal olarak 30 dakika ya da ağızdan 60 dakika önce verildiğinde; analjezik etkilerin farelerde asitle indüklenmiş kıvranma durumunda belirgin ve doza bağımlı şekilde ortaya çıktığını belirtmektedir. Analjezik etkisi için ID₅₀ değerleri intraperitoneal yol ile 22,2 mg/kg ve ağız yolu ile 272,2 mg/kg olarak bulunmuştur. İntraperitoneal 60 mg/kg ve ağız yolu ile 600 mg/kg değerlerinde ise ekstre; farelerde iritan madde ile ortaya çıkartılan ve kıvranma ile karakterize edilen ağrıyı hemen hemen ortadan kaldırmıştır. Formalin testinde ekstre, doza bağımlı bir şekilde belirgin olarak hem birinci hem de ikinci fazda inhibisyon meydana getirmiştir (ID₅₀ değerleri oral ve intraperitoneal yol için sırasıyla 280 mg/kg ve 30 mg/kg). Formalin ile indüklenen ödem intraperitoneal yol ile doza bağımlı şekilde (%62,9±3 maksimum inhibisyon) inhibe edilmiş ancak ağız yolu ile uygulamada inhibe edilememiştir. Sıcak tabaka testinde ekstre, termal stimulan ile indüklenen ağrının latent periyodunu artıramamıştır [14].

Kanyonga ve diğerleri (2011) *M. vulgare* metanollü ekstresinin (Soxhlet cihazında metanol ile 200g toz drogdan elde edilen) etkilerini araştırmışlardır. Ekstre, verimi %39,2 (DEO ~2.5:1) olacak şekilde buharlaştırılmıştır. Farelerde p-benzokinon ile indüklenen abdominal kasılma testinde ekstre (200 mg/kg, oral), belirgin şekilde (%35,3) kasılmaları inhibe etmiştir. Bunun da ötesinde, karragen ile indüklenen ödem testinde; indometazine (%38,7) yakın şekilde, 200 mg/kg doz ile inhibisyon (%34) elde edilmiştir. 100 mg/kg dozunda ise bir inhibitör yanıt ortaya çıkmamıştır. Prostaglandin E2 ile indüklenen ödem testinde, 200 mg/kg doz ile önemli ölçüde inhibisyon (%23,2-27,2) gözlenirken, 100 mg/kg dozda ekstre önemli bir aktivite ortaya çıkarmamıştır. Maksimum inhibisyon ise 45 dakika sonrasında gözlemlenmiştir [62].

2.7.1.2. Gastroprotektif aktivite

De Oliveira ve diğerleri (2011) *M. vulgare* yapraklarından elde edilen marrubiin ve methanol ekstresi (1,5 kg bitki materyalinin 4 litre metanol ile 7 gün boyunca maserasyon işlemi uygulanması ile elde edilen) ile gastroprotektif etkiler hakkında bir araştırma yapmışlardır. Farelerde etanol ile indüklenen ülser lezyonları, analizi yapılan tüm

parametreler (lezyon indeksi, toplam hasarlı alan ve yüzde hasarlı alan) açısından etkili bir şekilde azalmıştır. İyileştirme oranları, tedavi edilen gruplarda 50 mg/ kg ekstre, 100 mg/kg ekstre ve omeprazol (30 mg/kg, oral) için sırasıyla $49,31 \pm 0,57$, $74,31 \pm 0,91$ ve $79,86 \pm 0,59$ olarak bulunmuştur. İndometazin ile indüklenmiş ülserlerde, ülser inhibisyon değerleri 25, 50 ve 100 mg ekstre/kg ve simetidin için sırasıyla $50,32 \pm 5,6$, $66,24 \pm 4,3$, $82,17 \pm 4,09$ ve $67,52 \pm 4,38$ olarak bulunmuştur. Her iki modelde de incelenen bütün parametrelerde kontrol grubuna kıyasla marrubiin (25 mg/kg) önemli ölçüde bir etki ortaya koymuştur. Aynı zamanda *M. vulgare* ve marrubiin ile tedavi edilen grup için pH değerinde (*M. vulgare* ekstresinin 50 ve 100 mg/kg dozlarında, marrubiinin 25 mg/kg dozunda) ve mukus üretiminde bir artış gözlemlenmiştir. Sonuçlar en azından bir kısım marrubiin varlığı ile orantılı sitoprotektif etki oluştuğu konusunda bir indikatör olarak görülmektedir. Ayrıca ekstrenin ve marrubiinin göstermiş oldu gastroprotektif etkinin, önemli gastroprotektif faktörlerden olan nitrik oksit ve endojen sülfidril gruplarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar analjezik ajanların, ortaya çıkardıkları gastrik irritasyon, kanama ya da mukozal hücre hasarları gibi olumsuz etkiler konusundaki kısıtlı kullanımlarından ötürü; antienflamatuvar, antinosiseptif ve gastroprotektif etkilerin, aynı bitkinin ekstresinden ya da kimyasal bileşenlerinden elde edilmesinin önemine vurgu yapmışlardır [63].

2.7.1.3. Antimikrobiyal etkiler

Diaz ve diğerleri (1988) *M. vulgare*'ye ait sulu ekstrenin (DEO 1:10) ve etanollü ekstrenin *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı antibakteriel etkilerini disk difüzyon yöntemiyle incelemişlerdir. Her iki ekstrede de aktivite görülmemiştir [64].

Keleş ve diğerleri (2001) *M. vulgare* etanollü ekstresinin antibakteriyel etkilerini *Salmonella enteritis*, *Salmonella gallinarum*, *Streptococcus dysgalatiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* bakterilerine karşı agar difüzyon testi ile incelemişlerdir. 50 g kuru bitkisel materyal, 250 mL %80 etanol ile ekstre edilmiş ve ardından kurumaya bırakılmıştır. *M. vulgare* ekstresinin minimum inhibisyon konsantrasyonu; *K. pneumoniae* bakterisi için 4 mg/mL ve *S. aureus* için ise 1 mg/mL olarak bulunmuştur [65].

Al-Bakri ve diğerleri (2007) bir çalışmada *M. vulgare* etanollü ekstresinin antimikrobiyal etkilerini incelemek amacıyla XTT kolorimetri testi ve bakteri sayım

işlemi gerçekleştirmişlerdir. 2,5 g bitki materyali 25 mL etanol ile ekstre edilmiştir ve ekstre kurutulduktan sonra son konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde DMSO (dimetil sülfoksit) içinde çözülmüştür. *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal etki gözlenmiştir [66].

Kunduhoglu ve diğerleri (2011) ham etanollü ekstre (Soxhlet cihazı ile 10 g bitki materyali, 100 mg kuru ekstre/mL olarak şekilde ekstre edilmiştir) ile bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Ancak sınırlı sayıda gram-pozitif bakteriye karşı antimikrobiyal etkinlik gözlemlenmiştir. Araştırmacılar elde edilen sonucun, Al-Bakri ve diğerlerinin (2007) [66] yapmış olduğu çalışmanın sonucu ile benzeşmemesinin olası nedenleri olarak; uygulanan tekniklerde farklılık olmasını ya da kullanılan ekstrelerin farklı olmasını göstermişlerdir [67].

Kanyonga ve diğerlerinin (2001) yaptıkları bir çalışmada *M. vulgare* metanollü ekstresinin *in vitro* antimikrobiyal etkilerinin araştırılması amacıyla disk difüzyon yöntemi ile 50, 100, 200, 400 ve 600 mg/mL derişimindeki ekstreler incelenmiştir. Sonuçlar ekstrelerin; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* bakterilerine karşı doza bağımlı olarak etkili olduğunu, *Proteus vulgaris* ve *E. coli* bakterilerine karşı orta derecede etkili olduğunu ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı ise etkisiz olduğunu göstermiştir [62].

Ramos-Guerra ve diğerleri (2007) *M. vulgare*'den elde edilen metanollü ve asetonik ekstrlerinin, amebiyazis ve giardiazise sebep olan *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia* bakterilerine karşı *in vitro* aktivitelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar ekstrelerin *E. histolytica*'ya karşı çok etkili ($IC_{50}=7$ ve $12 \mu\text{g/mL}$) ve *G. lamblia*'ya karşı az etkili olduğunu belirtmişlerdir [68].

Robles-Zepeta ve diğerleri (2011) *M. vulgare* metanollü ekstresinin anti-*Helicobacter pylori* aktivitesini broth mikrodilüsyon yöntemiyle araştırmışlardır. Kuru bitkisel materyal metanol ile ekstre edilmiş (1:10), kurutulmuş ve DMSO içinde 10mg/mL konsantrasyonuna gelecek şekilde çözülmüştür. Ekstrenin %50 minimum inhibisyon konsantrasyonu 800 $\mu\text{g/mL}$ değerinden yüksek bulunmuştur [69].

Riachi ve diğerleri *M. vulgare* ve birkaç bitki ile ilgili yaptıkları bir çalışmada bu bitkilerden elde edilen ekstrelerin kimyasal karakteristiklerini ve antibakteriyel aktivitelerini incelemişlerdir. Ekstrelerin etil asetat, dietil eter ve 1-bütanol fraksiyonları 4 farklı bakteri suşu üzerinde test edilmiştir: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* ve *Pseudomonas aeruginosa*. *M. vulgare* ekstrlerinin *Staphylococcus*

aureus ve *Proteus vulgaris* üzerinde herhangi bir aktivite göstermediği; *P. aeruginosa* üzerinde dietil eter ve 1-bütanol ekstralarının, *E. coli* üzerinde ise etil asetat ekstralarının düşük aktivite gösterdiği belirtilmiştir [70].

Béjaoui ve diğerleri, Tunus'ta 6 farklı bölgede yetişen *M. vulgare* bitkisindeki uçucu bileşenlerin kimyasal içeriğini ve *in vitro* antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Toplamda 37 farklı bileşen tespit edilmiş ve bunların büyük çoğunluğunun diterpenler ve alkanlar olduğu belirtilmiştir. Ana bileşenlerin ise marrubiin (%9-34), dotriakontan (%13-25) ve skualen (%6-47) olduğu ortaya konmuştur. Bitkinin antibakteriyel aktivitesinin ölçülmesi için ise 3 adet Gram-pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ve *Enterococcus faecium*), 3 adet Gram-negatif bakteri (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve 1 adet maya (*Candida albicans*) kullanılmıştır. Araştırma sonucunda ekstraların bütün bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği, Gram-pozitif bakterilerin Gram-negatif bakterilere göre uçucu bileşenlere daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Aligiannis ve diğerlerinin [71] yapmış oldukları bitkisel materyallerin MİK değerlerine göre antimikrobiyal aktivitelerinin sınıflandırılmasına göre, bu çalışmada elde edilen sonuçların büyük çoğunluğunun güçlü ve orta inhibisyon gösterdiği belirtilmiştir. *M. vulgare*'de bulunan uçucu bileşenlere duyarlı olan bakteriler için inhibisyon alanları ve MİK değerleri sırasıyla 7-15 mm ve 300-850 µg/mL olarak bulunmuştur [11].

Bouterfas ve diğerleri Cezayir'in 3 farklı bölgesinde yetişen *M. vulgare* bitkisinin yapraklarından elde edilen flavonoidlerin *in vitro* antibakteriyel aktivitelerini araştırmışlardır. *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* ve *Proteus mirabilis* bakterileri üzerindeki etkiler difüzyon agar metodu ile incelenmiş ve inhibisyon çapı 7.5–34.3 mm aralığında ve MİK değerleri 25 ve 100 µg/mL aralığında bulunmuştur ve araştırmacılar bu sonuçların güçlü antibakteriyel inhibisyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ortaya çıkan bu antibakteriyel aktivitenin, yapılan fitokimyasal analizler sonucunda ekstrede bulunan flavanlar ve flavanollerden dolayı ortaya çıkmış olabileceğini belirtmişlerdir [10].

Quave ve Smeltzer, *M. vulgare* ekstresinin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (Methicillin-resistant *S. aureus*-MRSA) üzerindeki anti-biyofilm aktivitesini araştırmışlardır. Cilt enfeksiyonlarının yaygın bir sebebi olan *S. aureus*, ilaçlara dirençli olan suşları nedeniyle sağlık alanında giderek endişeleri artırmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar elde edilen ekstrenin MRSA üzerindeki planktonik büyüme, biyofilm

oluşturma ve tutunma özelliklerindeki inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Köklerden elde edilen etanollü ekstrenin hem biyofilm oluşumunu ($IC_{50} = 32 \mu\text{g/mL}$) hem de tutunmayı ($IC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$) doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğı görülmüştür [72].

2.7.1.4. Diüretik aktivite

El Bardai ve diğ rleri (2001) *M. vulgare* sulu ekstresinin sıçanlardaki hipotansif aktivitesini araştırmak için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Sulu ekstre 5 g Marrubii herba droğunun 100 mL su içerisinde kaynatılması ile hazırlanmıştır. Liyofilizasyon işleminden sonra ekstre yaklaşık olarak %16 (a/a) (DEO ~6,2:1) oranına getirilmiştir. Hazırlanan ekstre hipertansif ($210 \pm \text{mm Hg}$) ve normotansif ($156 \pm \text{mm Hg}$) sıçanlara 80 mg/kg/gün dozunda oral olarak 5 gün boyunca verilmiştir. Hipertansif sıçanların tedavisinde başlangıçta idrar hacminde ufak bir artış göstermiştir ancak bu etki 3 gün sonra ortadan kaybolmuştur; elektrolit, kreatinin ve üre atılım değerlerinde ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Normotansif sıçanlarda ise diürez ve elektrolit atılımında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir [3].

2.7.1.5. Antihiperglisemik etkiler

Roman Ramos ve diğ rleri (1992) *M. vulgare* sulu ekstresinin hipoglisemik etkilerini incelemek amacıyla sağlıklı tavşanlarda bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. %50 dekstrozu solüsyonu s.c injeksiyon yoluyla geçici hiperglisemi oluşturulmuş ve 5 saat süreyle her saat başı kandaki glukoz değerleri ölçülmüştür. Tavşanlara su (4 mL/kg), tolbutamid (20 mg/kg) ve sulu ekstre (132 g kurutulmuş bitki 1 litre suda kaynatılarak hazırlanmış; 4 mL/kg) verilmiş; tolbutamid ve sulu ekstre verilen deneklerde kontrol grubuna kıyasla (su) daha belirgin bir şekilde kan şekerinde düşüş gözlemlenmiştir. Ekstre ile 20 mg/kg tolbutamid sonuçları arasında belirgin bir fark olmadığı belirtilmiştir [73].

Novaes ve diğ rleri (2001) *M. vulgare*'nin allokzan-diyabetik sıçanlardaki hipoglisemik etkilerini araştırmışlardır. Ekstre etanol ile oda sıcaklığında yaklaşık 10 günde maserasyon ile hazırlanmıştır. Referans ilaç olarak allokzan monohidrat (100 mg/kg; intraperitoneal) kullanılmıştır. Ekstre (300 mg/kg) diyabetik sıçanlara verilmiş ve sonuç olarak %30,3 inhibisyon oranı ile orta dereceli etkili olduğu belirtilmiştir [74].

Boudjelal ve diğ rleri (2012) *M. vulgare* sulu ekstresinin antidiyabetik etkilerini in vivo deneylerle araştırmışlardır. Allokzan ile diyabet oluşturulan sıçanlara 15 gün boyunca, sulu esktre (6 g Marrubii herba 25 mL suda kaynatılmış) 100, 200 ve 300 mg/kg

ve glibenklamid (5 mg/kg) uygulanmıştır. 200 ve 300 mg/kg/günde 2 defa dozda uygulanan sulu ekstrenin kan glukoz seviyesini en iyi düşürdüğü (%60'dan fazla) gözlemlenmiştir. 100 mg doz grubunda ise %50'lik bir düşüş görülmüştür. Toplam lipid, trigliserid ve kolesterol değerlerinde de azalma meydana geldiği belirtilmiştir [8].

Khacheba ve diğerleri; Cezayir'de diyabet için geleneksel olarak kullanımı olan, aralarında *M. vulgare*'nin de bulunduğu 18 farklı bitkiden elde edilen hidro-alkolik ve sulu ekstrelerin α -glukozidaz enzimi inhibisyonu ve antioksidan etkilerini incelemiştir. *M. vulgare*'den elde edilen hidro-alkolik ekstrenin (1 mg/mL) enzim inhibisyon oranı %86,62 olarak, sulu ekstrenin ise (5 mg/mL) %5,39 olarak bulunmuştur [75].

2.7.1.6. Antioksidatif etkiler

VanderJagt ve diğerleri (2002) *M. vulgare* sulu ekstresinin (40 mL su ile 2 g kuru bitkiden hazırlanan) toplam antioksidan kapasitesini çift aşamalı Trolox deneyi ile araştırmışlardır. Sulu ekstrenin antioksidan içeriği 560 μ mol/g Trolox eşdeğeri/g kuru kütle olarak bulunmuştur[76].

Berrougui ve diğerleri (2006) *M. vulgare* metanollü ekstresinin (%40 metanol) düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) lipid peroksidasyonundan koruyarak ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HLD) aracılı kolesterol akışını yükselterek kardiyovasküler hastalıklardaki etkilerini incelemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak *M. vulgare*'nin; LDL oksidasyonunu engelleyerek ve kolesterol taşınmasını tersine çevirerek kardiyovasküler rahatsızlıkların gelişimini önleyen doğal antioksidan kaynağı olduğu belirtilmiştir [77].

Tupec ve diğerleri Avrupa'da yetişen bazı tıbbi bitkilerin antioksidan kapasitelerini ve bulundurdıkları metal elementlerini incelemiştir. Bu çalışmada *M. vulgare* bitkisinin sulu ekstresinin, metanollü ekstresine oranla daha yüksek antioksidan kapasite gösterdiği belirtilmiştir. Çinko miktarı sulu ekstrede 0,083 g/kg kuru ağırlık, metanollü ekstrede ise 0,029 g/kg kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Ayrıca kurutulmuş kül testlerinde *M. vulgare*'ye ait Ca, Mg, Zn ve Se miktarları sırası ile; 27,51, 7,62, 0,11, 67,57 g/kg kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Bitkinin içerdiği Mg miktarının, bu çalışmada incelenen diğer bitkiler arasında en yüksek değerlerden biri olduğu belirtilmiştir [12].

Amri ve diğerleri *M. vulgare* bitkisinin yapraklarından elde ettikleri ekstrenin fitokimyasal kompozisyonunu belirlemek, antioksidan ve yara iyileştirici özelliklerini incelemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla hazırladıkları metanollü ekstre ile yaptıkları inceleme sonucunda flavonoidlerin, ekstredeki ana antioksidan bileşen olduğunu öne sürmektelerdir. Araştırmacılar elde ettikleri ekstrenin (marrubiince zengin (%6,62), yüksek miktarda fenol ve flavonoid ve çeşitli feniletanoit glikozitleri içeren hidro-alkolik ekstre) antioksidan ve yara iyileştirici özelliklerinin, fibroblastların hücre göçünü ve proliferasyonunu artırdığını belirtmişlerdir [9].

2.7.1.7. Antikanser etkiler

Yamaguchi ve diğerleri (2006) *M. vulgare* yapraklarından elde edilen ekstrenin insan kolorektal kanser hücrelerine karşı antitümör özelliklerini incelemişlerdir. 200 mL metanol ile 48 saat boyunca 20 g bitki materyali ekstraksiyona tabi tutulmuştur (DEO 1:10) ve ardından ekstre yoğunlaştırılmış ve kurutulmuştur. 250 µg/mL dozda apoptozis ve hücre büyümesinin baskılandığı gözlemlenmiştir [78].

Paunovic ve diğerleri *M. vulgare* etanollü ekstresinin kanser hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Ekstrenin kanser hücrelerindeki proliferasyonu engellediği, apoptozisi ve sitoprotektif otofajiyi indüklediği ve anti-melanoma ve anti-gliom tedavisinde tek başına ya da otofaji inhibitörleri ile birlikte kullanılması için iyi bir aday olduğu vurgulanmıştır [79].

2.7.2. Safılaştırılmış metabolitler ile yapılan çalışmalar

2.7.2.1. Koleretik aktivite

Krejci ve Zadina (1959); marrubiin, marrubiinik asit ve onların sodyum tuzlarının fareler üzerindeki safra sekresyonunu stimüle etmesi konusunda bir araştırma yapmışlardır. Safra, pankreatik sıvı ile birlikte duodenumdan toplanmıştır. Marrubiin, kolorez stimüle etmede başarılı olamamış ancak marrubiinik asit ve sodyum tuzlarının 2-3 mg/100g dozunda sıçanlarda sekresyon oluşturduğu gözlemlenmiştir [80].

2.7.2.2. Antiinflamatuar etkiler

Sahpaz ve diğerleri (2002) *M. vulgare*'den elde edilen polar ekstrenin terapötik kullanımı için kimyasal kompozisyonu hakkında bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Analiz sonucunda 5 adet fenilpropanoit esteri bulunmuştur: 1) kafeoil-L-malik asit; 2) akteosit; 3) forsythosit B; 4) arenariosit; 5) ballotetosit. Bu bulunan bileşiklerin COX

(cyclooxygenase – siklooksijenaz) aktivitesini inhibe etme kapasitesi *in vitro* olarak ölçülmüş ve referans olarak selektif olmayan COX inhibitörü olan indometazin ve selektif COX-2 inhibitörü olan nimesulid kullanılmıştır. 2-4 numaralı bileşenler COX-2 üzerinde en güçlü inhibitör etkinlik göstermiştir. Ancak bu 3 bileşik de COX-1 üzerinde önemli derecede bir inhibitör etki gösterememiştir [33].

Stulzer ve diğerlerinin (2006) marrubiinin ödeme karşı etkilerini inceledikleri bir araştırmada, ID₅₀ değeri (mg/kg, intraperitoneal) ve maksimum inhibisyon (%) değeri ölçülmüş. Çeşitli ajanlar kullanılmış ve histamin 13,84 mg/kg ve %73,7; bradikinin 18,82 mg/kg ve %70,0; karragen 13,61 mg/kg ve %63,0 olarak bulunmuştur. Marrubiinin (100 mg/kg, intraperitoneal) ise ovalbumin ile indüklenmiş allerjik ödemde belirgin derecede (%67,6 ± 4) etki gösterdiği ortaya koyulmuştur [81].

2.7.2.3. Analjezik etkiler

De Jesus ve diğerleri (2000) marrubiinin antinosiseptif etkilerini incelediği bir çalışmada, marrubiinin doza bağımlı antinosiseptif etkinliğini ve asetik asit ile indüklenmiş kıvrınma yanıtlarını inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Kıvrınma testinde ID₅₀ değeri (intraperitoneal) 2,2 µmol/kg olarak bulunmuştur. Asetik asit ile stimüle edildikten 5 saat sonrasına kadar, analjezik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Marrubiinin, bilinen bazı analjezik ilaçlardan daha etkili ve daha düşük IC₅₀ değerine sahip olduğu belirtilmiştir (intraperitoneal yol ile aspirin ve diklofenak moleküllerine kıyasla). Hayvanlara, nalokson (85 mg/kg, intraperitoneal) (selektif olmayan morfin reseptör antagonisti) verildiğinde marrubiinin antinosiseptif etkisinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir; bu nedenle de araştırmacılar marrubiinin opioidlerden farklı bir mekanizma ile etki ettiği yönünde görüş bildirmişlerdir. Sıcak plaka testi (180 µmol/kg) (opioid türevi analjezikler için selektif bir yöntem) sonucunda gözlenen antinosiseptif etki eksikliği de bu görüşü desteklemektedir. Formalin testinde marrubiinin intraperitoneal yoldan uygulandığında ID₅₀ değerleri ilk faz için 6,6 µmol/kg, ikinci faz için ise 6,3 µmol/kg olarak; maksimum inhibisyon değerleri ise ilk faz için %78, ikinci faz için ise %83 bulunmuştur. Oral yoldan yapılan testte ise marrubiinin ID₅₀ değerleri ilk ve ikinci faz için sırasıyla 126 ve 128 µmol/kg; maksimum inhibisyon değerleri ise ilk ve ikinci faz için sırasıyla %75 ve %99 olarak bulunmuştur. Kapsaisin ile indüklenen nörojenik nosisepsiyon testinde ise marrubiin, doza bağımlı olarak etkili bir şekilde aktivite

göstermiş ve ID₅₀ değeri 28,8 µmol/kg, maksimum inhibisyon değeri ise %76 olarak bulunmuştur [82].

Meyre-Silva ve diğerleri (2005) bazı marrubiin türevlerini (marrubiin, marrubiinik asit, marrubenol, marrubiinik asit benzil esteri, marrubiinik asit metil esteri) elde etmiş ve bu bileşiklerle bir çalışma gerçekleştirmiştir. Kıvrınma testinde marrubiinik asit (10 mg/kg, intraperitoneal) abdominal kasılmaları %80 oranında inhibe etmiştir. Marrubiinik asitin, çalışılan modellerde (farelerde formalin ve kapsaisin ile indüklenmiş nörojenik ağrı, glutamat ile indüklenmiş hiperaljezi durumlarında spinal ve supraspinal antinosisepsiyon) marrubiine benzer şekilde bir analjezik profil çizdiği belirtilmiştir. Marrubiinik asitin, prototipi marrubiine kıyasla daha az antinosiseptif etki göstermesine rağmen asetilsalisilik asit ve parasetamol gibi klinik amaçla kullanılan bazı ilaçlara kıyasla daha potent olduğu vurgulanmıştır [4].

2.7.2.4. Vazorelaksan etkiler

El Bardai ve diğerleri (2003) Marrubii herba droğundan elde edilen sulu ekstrenin vazorelaksan etkilerini incelemişlerdir. 60 g bitki materyali 400 mL distile su ile 90 °C’de 15 dakika boyunca ekstre edilmiştir. Ekstre sulu fraksiyon ve siklohekzan fraksiyonu olmak üzere 2 kısma ayrılmıştır. Sıçan aortunda KCl ile indüklenmiş kasılmada siklohekzan fraksiyonu ile doza bağımlı bir inhibisyon oluşturulurken sulu fraksiyonda bir etki gözlemlenmemiştir. Marrubenol ve marrubiin izole edilmiş ve sıçan aortunda konsantrasyona bağımlı bir şekilde kasılma inhibisyonu oluşturduğu belirtilmiştir. Marrubenolün marrubine kıyasla biraz daha potent olduğu bulunmuştur (IC₅₀ değerleri sırasıyla 7,7 ve 24 µM). Her iki bileşenin de verapamile kıyasla belirgin derecede daha az potent olduğu ortaya koyulmuştur [6].

El Bardai ve diğerleri (2003) başka bir araştırmada marrubenolün relaksan aktivite mekanizmasını açığa çıkarmak amacıyla çalışma yapmıştır. Marrubenolün; sıçanların arterlerindeki kasılmaları, düz kas hücrelerindeki L tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını bloke ederek inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Marrubenolün sıçan aortundaki relaksan etkisi endotelyumun alınmasından etkilenmemiştir (IC₅₀ değeri 11,8±0,3 µM ve maksimum gevşeme 93,4±0,6 µM). Marrubenol, noradrenalin (1 µM) ile indüklenmiş kasılmaları inhibe ederken; Ca kanal blokleri olan nimodipin varlığında (1 µM) noradrenalin ile indüklenmiş kasılmaları inhibe edememiştir [83].

2.7.2.5. Antioksidatif etkiler

Martin-Nizard ve diğerleri (2003) bir çalışmada, *M. vulgare* bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen 5 tane doğal polifenol bileşiğin, büyükbaş hayvan aort endotel hücrelerinde okside olmuş LDL ile indüklenmiş sitotoksositeye karşı etkilerini incelemişlerdir. 4 adet fenilpropanoit glikozitleri (akteosid, forsynthoside B, arenariosid, ballotetrosid) ve bir non-glikozit türevi (kafeoil-1-malik asit) bu amaçla incelenmiştir. Bu bileşiklerin *in vitro* LDL oksidasyonunu engellediği ve hücrelerdeki morfolojik görünümü inkübasyon döneminde koruduğu görülmüştür [84].

Martin-Nizard ve diğerleri (2004) başka bir çalışmada *M. vulgare* bitkisinin toprak üstü kısımlarından izole edilen 4 adet doğal polifenol bileşiğin (akteosid, forsynthoside B, arenariosid, ballotetrosid) büyükbaş hayvan aort endotel hücrelerinde, bakır ile okside edilmiş LDL (Cu-LDL) tarafından indüklenen endotelin-1 (ET-1) sekresyonuna karşı etkilerini araştırmışlardır. ET-1 sekresyonu hücreler Cu-LDL ile inkübe edildiğinde artmıştır ancak bu polifenolik bileşikler bu artışı inhibe etmişlerdir. Sonuç olarak bu bileşiklerin ateroskleroz gelişimini engellemek konusunda faydalı etkilerinin olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır [85].

2.8. Toksikolojik Veriler

2.8.1. Genel toksisite

Jaouhari ve diğerleri (1999) fareler üzerinde *M. vulgare* sulu ekstresinin akut toksisitesi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Ekstre 1 g kuru bitkinin 50 mL distile suda (DEO 1:50) infüzyon ile hazırlanması ile elde edilmiştir. Ekstre oral olarak 1 g/kg dozunda uygulanmıştır. Hayvanlar 7 gün boyunca gözlemlenmiş ve vücut ağırlığındaki değişimler ve davranışları not edilmiştir. 8. günde hayvanlar kesilmiş ve anatomik ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Ekstre uygulanan farede 1 saat sonrasında taşikardi ve 3 saat sonrasında iştah kaybı gözlenirken, histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir [86].

De Oliveira ve diğerleri (2011) *M. vulgare* ekstresini (1,5 kg bitki materyalinin 4 litre metanol ile 7 gün masere edilmesi ile elde edilen) 2,000 mg/kg ekstre dozunda 5 adet dişi sıçana uygulayarak akut toksisite çalışması gerçekleştirmişlerdir. 14 gün boyunca hayvanlar gözlemlenmiştir. Deri, tüy, göz, nazal mukoz membran, merkezi sinir sistemi ve otonom sinir sistemi incelenmiş ve bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bulguların *M.*

vulgare metanollü ekstresinin toksik dozunun 2000 mg/kg'dan daha yüksek olduğunu gösterdiği belirtilmiştir [63].

2.8.2. Üreme ve gelişimsel toksisite

Kchouk ve Chadli (1962) *M. vulgare*'den elde edilen dekoksasyon ile 2 sıçan, 2 kobay ve 2 fare üzerinde (yaklaşık 2 mL/kg bukal ya da subkütan) bir toksisite çalışması gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlarda sıçanlarda ciddi abortif aktivite görülürken, *M. vulgare*'nin kobay ve farelerde abortif etki gösterdiğine dair yeterli kanıya ulaşılamamıştır. Araştırmacılar bu bulguların insanlar üzerindeki abortif etki konusunda bir kanıya varmaya imkân vermediğini belirtmişlerdir [87].

Aouni ve diğerleri *M. vulgare* hidro-etanollü ekstresinin dişi sıçanlar üzerindeki hematolojik etkilerini incelemişlerdir. Normal ve gebe sıçanlardaki hematolojik değerlerde ciddi bir düşüş olduğu ve fetüs implantasyonunda ve boyutlarında gözle görülür şekilde bir azalmaya yol açtığı belirtilmiştir. Gebe sıçanların uterusu incelendiğinde plasental ve embriyo dokularında zedelenme olduğu ve gebeliğin sonlanması sonucunda ciddi histolojik değişimlerin meydana geldiği belirtilmiştir. Araştırmacılar; çalışmanın sonucunda elde edilen bulguların, *M. vulgare*'nin abortif etkileri olduğu hipotezini desteklediğini belirtmişlerdir [88].

2.9. Klinik Çalışmalar

Herrera-Arellano ve diğerleri (2004) randomize, çift körlü ve kontrollü bir araştırma ile *Cecropia obtusifolia* ve *M. vulgare* sulu ekstrelerinin kan glukoz ve serum lipid değerleri üzerindeki etkilerini tip 2 diyabet ve bilinen ilaçlarla yapılan tedaviye zayıf yanıt veren hastalarda incelemişlerdir. 43 adet hasta, 2 gruba ayrılmış ve günde 3 kere her öğünden önce 1 bardak kaynar su içinde 1 g poşetler halinde (günde toplam 3 g drog) infüzyon hazırlayarak içmişlerdir. 21 günlük tedavinin sonunda açlık kan glukoz değerinde %0,64, kolesterol ve trigliserit değerlerinde ise sırasıyla %4,16 ve %5,78 oranında bir düşüş gözlemlenmiştir. Tedavi renal fonksiyonları ölçen parametrelerde önemli değişiklikler gerçekleştirmezken kreatinin ve üreye ait serum değerlerinde patolojik değişimler gözlenmemiştir. Bazı hastalarda tedaviyi kesmeyi gerektirmeyecek ölçüde orta şiddette geçici yan etkiler ortaya çıkmıştır. Bunlar; bulantı, ağız kuruluğu, siyalore, baş dönmesi ve anoreksiyadır [89].

2.10. Pozoloji

Avrupa İlaç Kurumu (EMA) tarafından yayınlanan bir raporda [45] Marrubii herba'nın farmakopelere ve fitoterapi kitaplarına dayanılarak 30 yıldan daha fazla süre ile kullanıldığı için bu droğun geleneksel bitkisel tıbbi ürün sınıfına alındığı belirtilmiştir ve çeşitli preparatlar için farklı dozları kabul edilmiştir:

- Sıkılmış suyu (DEO 1:0,70-0,90): 10-20 mL, günde 3 defa
- Sıvı ekstre (DEO 1:0,9-1,1), ekstraksiyon çözücüsü %30 etanol (h/h): 1,5-2 mL, günde 3 defa
- HMPC monografı için ise farmakopelerde [2, 51] yer alan 30 yıllık geleneksel kullanımına dayanılarak, şu dozlar tavsiye edilmiştir:
- Bitkisel çay için drog: 1-2 g, günde 3 defa
- Sıvı ekstre (DEO 1:1), ekstraksiyon çözücüsü %20 etanol (h/h): 2-4 mL, günde 3 defa

Aynı raporda toz haline getirilmiş droğun katı dozaj şekillerinde oral olarak kullanılmasının da monograflara eklenebileceği belirtilmiştir. BHP farmakopesinde 1983'ten beri droğun günde 3 defa 1-2 g olarak kullanımının yer aldığı ve 1992'den beri İspanya'da piyasada olan bir preparatın pozoloji bilgisinin (toz haline getirilmiş drog, günde 3 defa 225-450 mg) bulunduğu vurgulanmıştır.

Çeşitli farmakope, monograf ve literatür bilgilerine dayanılarak; farklı dozaj formları için farklı kullanım ve dozaj bilgilerine Tablo 2.3., 2.4., 2.5. ve 2.6.'da yer aldığı şekilde verilmiştir.

Tablo 2.3. Bitkisel çay preparatı için önerilen dozaj ve kullanım

Dozaj	Kullanım	Kaynak
Günlük doz: 4,5 g bitkisel drog	Oral kullanım için çay preparatı	[48]
Başka şekilde reçete edilmediği takdirde: Kurutulmuş bitki, 1-2 g	Oral	[2]
Günde 3 defa: Kurutulmuş bitki, 1-2 g	Oral	[50]
Günlük doz: 4,5 g bitkisel drog	Oral	[55-57]
Kurutulmuş bitki: İnfüzyon olarak 1,5 g tek doz halinde	İnfüzyon şeklinde oral	[58-60, 90]
Ufalanmış bitki İnfüzyon olarak: 1-2 g bitkisel drog günde 3 defaya kadar		[1]

Tablo 2.3. (Devam) Bitkisel çay preparatı için önerilen dozaj ve kullanım

Ufalanmış bitki İnfüzyon olarak: tek doz 1,5 g; günlük doz: 4,5 g	Koleretik olarak çay yemeklerden 30 dakika önce alınmalıdır; Ekspektoran olarak çay günde birkaç defa kullanılmalıdır.	[91-94]
---	---	---------

Tablo 2.4. Bitkinin sıkılmış suyunun (DEO 1:0,70-0,90) dozu ve kullanımı

Dozaj	Kullanım	Kaynak
12 yaşından büyük yetişkinlerde: günde 3 defa 10-20 mL	Oral	Avrupa ülkelerinde ruhsat
Başka şekilde reçete edilmediği takdirde günlük doz: 2-6 yemek kaşığı sıkılmış su ya da eşdeği preparat	Oral	[48]
Sıkılmış su: günlük doz 30-60 mL		[1]
Sıkılmış su: günlük doz 2-6 yemek kaşığı		[91-94]

Tablo 2.5. Bitkiden elde edilen ekstraksiyon çözünüsü %30 etanol (h/h) olan sıvı ekstrenin (DEO 1:0,9-1,1) dozu ve kullanımı

Dozaj	Kullanım	Kaynak
12 yaşından itibaren	Oral	Avrupa ülkelerinde ruhsat için yetkilendiren kurumlar

Tablo 2.6. Bitkiden elde edilen ekstraksiyon çözünüsü %30 etanol (h/h) olan sıvı ekstrenin (DEO 1:1) dozu ve kullanımı

Dozaj	Kullanım	Kaynak
Başka şekilde reçete edilmediği takdirde, günde 3 defa 1-2 mL	Oral	[2]
2-4 mL günde 3 defa	Oral	[50, 51]
2-4 mL günde 3 defa	-	[1]

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu bölümde tez çalışmasında kullanılan bitkisel materyaller ve kaynakları, standart bileşenler, cihazlar, apareyler, kimyasal maddeler, çözücüler, reaktifler, gereçler ve yöntemler sunulmuştur.

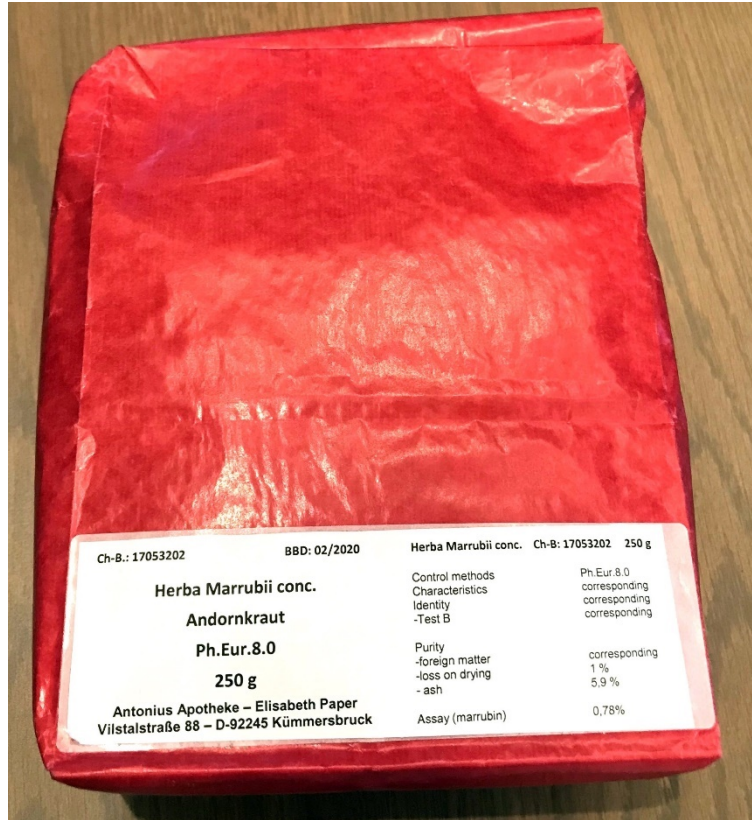
3.1. Bitkisel Materyal

Bu tez çalışması kapsamında 3 farklı bitkisel örnek temin edilmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan droglar ve kaynakları

Örnek	Durumu	Kaynak
MV1	Ambalajlı, parçalanmış drog	Kümmersbruck, Almanya (Şubat 2018)
MV2	Taze örnek, kültür	Kütahya (Nisan 2018)
MV3	Ambalajlı, yaklaşık 5 cm'lik parçalara ayrılmış drog	Nativital, İstanbul (Mayıs 2018)

MV1 kodlu Avrupa Farmakopesi (8.0)'ne uygun olduğu belirtilen Herba Marrubii droğu Almanya Kümmersbruck bölgesinde yer alan bir eczaneden temin edilmiştir. Kırmızı kâğıt ambalajının üzerinde ilgili droğa ait bilgilerin yer aldığı bir etikete sahiptir (Görsel 3.1.).

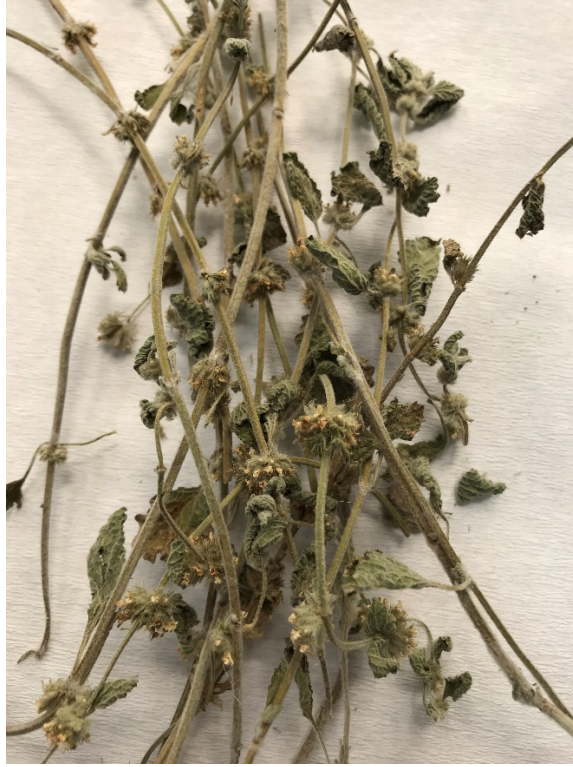


Görsel 3.1. MV1 numunesinin ambalajı



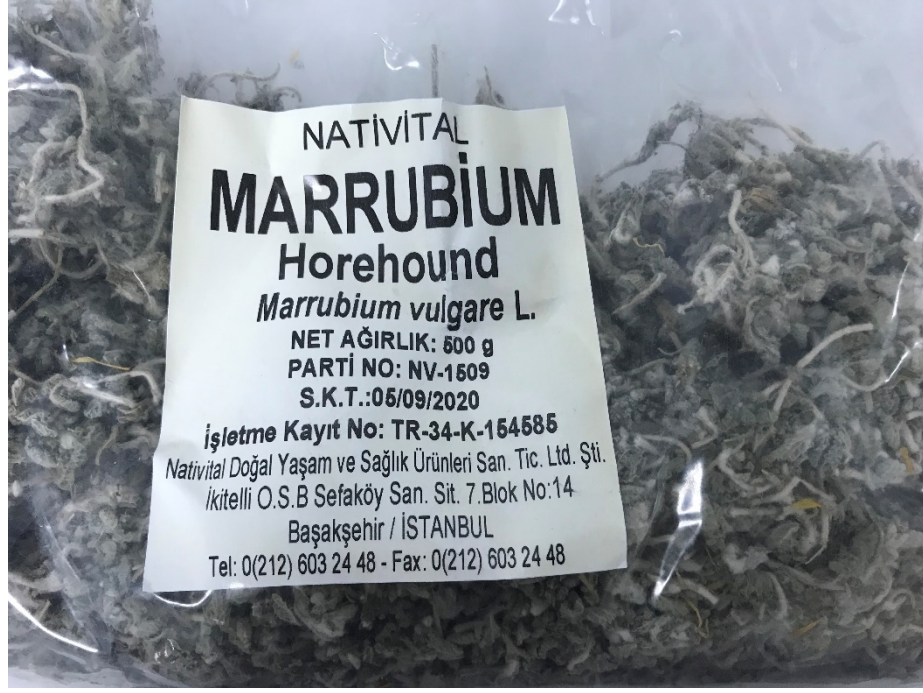
Görsel 3.2. *MV1 numunesi*

MV2 kodlu bitki örneği ise Kütahya’da yer alan Kütahya Belediyesi Hekim Sinan Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi’nden temin edilmiş ve tarafımızca toplanılarak gölgede kurumaya bırakılmıştır (Görsel 3.3.). Temin edilen bu bitki, Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu’na “ESSE 15525” numarası ile kaydedilmiştir.



Görsel 3.3. *MV2 numunesi*

MV3 kodlu örnek ise Nativital (Türkiye) firmasından tedarik edilen ticari bir drogtur (Görsel 3.4.). Şeffaf, naylon bir ambalaj içerisinde yer alan droğun tamamen kurutulmadığı gözlenmiştir ve tez çalışmaları için gölgede bir süre daha kuruması sağlanmıştır.



Görsel 3.4. *MV3 numunesine ait ambalaj*



Görsel 3.5. *MV3 numunesi*

Bütün numuneler tez çalışmaları esnasında ağzı kapalı ambalajlarda, serin ve kuru bir şekilde dolaplarda muhafaza edilmiştir.

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Standart Maddeler

Tez çalışmalarında kullanılan kimyasal madde ve çözücüler ile bunların marka ve saflık dereceleri Tablo 3.2’de sunulmuştur. Bu tabloda yer alan çözücü ve kimyasal maddeler, standart maddelerin çözülmesinde, örnek hazırlanmasında, ekstraksiyonda, reaktiflerin hazırlanmasında, ince tabaka kromatografisi (İTK) hareketli faz hazırlanmasında, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (YBSK) hareketli faz hazırlanmasında kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan çözücü ve kimyasal maddeler

Çözücü/Kimyasal Madde	Marka	Saflık %
Asetonitril	Merck	≥ 99.9
Marrubiin	Phyproof	≥98
Etanol	Merck	≥99
Hekzan	Merck	≥ 96
Metanol	Merck	≥99
Metanol (extra pure)	Tekkim	≥99.5
Resazurin	Sigma-Aldrich	~80
Vanilin	Merck	≥99

3.3. Kullanılan Kimyasal Reaktifler

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

Vanilin sülfürik asit reaktifi: vanilin R’nin 20 kısım etanol (%96) R ve 80 kısım sülfürik asit R karışımındaki 5 g/L’lik çözeltisi hazırlanmıştır.

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

3.4. Kullanılan Materyal, Cihaz ve Apareyler

Deneylerde kullanılan materyal, cihaz ve apareylere ait bilgiler Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Tez çalışmasında kullanılan cihaz/aparey ve markaları

Çözücü/Kimyasal Madde	Model/Marka
Clevenger apareyi	İldam
UV Lambası	Camag
Gaz kromatografisi/Alev iyonlaşma dedektörü	Agilent 6890N

Tablo 3.3. (Devam) Tez çalışmasında kullanılan cihaz/aparey ve markaları

Gaz kromatografisi/Kütle spektrometresi	Agilent 5975 GC-MSD
Etüv	Incucell - MMM
Tek kanallı pipet seti	Reference - Eppendorf
Çok kanallı otomatik pipet seti	Transferpette 8 - Brand
Mikrobiyolik Kabin	Laminar Flow Class Bio II-Heal Force
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Shimadzu LC-20A
pH-Metre	Starter 3100M - Ohaus
Bakteriyolojik etüv	MMM-Incucell
Rota vapor	Heidolph
Otoklav	Hirayama HV-50
Su banyosu	Wise Clean
Mikroplate okuyucu	Biotek, Synergy, H1
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf
Çalkayıcı	SI-600 - Lab. Companion
Karıştırıcı	Vortex Genius 3 - IKA
Türbidometre	DEN-1B - Biosan
İnce tabaka kromatografi plağı	TLC Silica Gel 60 - Merck
Işık mikroskopu ve kamera	Leica DM 750 / ICC50 HD
Hassas terazi	AS 310 R2 - Radwag

3.5. Deneysel Çalışmalar ve Yöntemler

3.5.1. Mikroskobik inceleme

Örnekler toz haline getirildikten sonra, Avrupa Farmakopesi 8.0'de yer aldığı üzere klorak hidrat R reaktifi kullanılarak, bek alevinde buharı solunmadan dikkatlice kaynatılmış ve soğuduktan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. Leica DM750 binoküler ışık mikroskopuna entegre ICC50 HD kamera ile mikroskop görüntüleri dijital olarak kaydedilmiştir. Mikroskobik inceleme aşamasında toz drogların ayırımında önemli karakterlerden örtü tüyleri, salgı tüyleri, Lamiaceae familyasına özgü diasitik stoma ve yaprağa ait önemli kısımlar dikkate alınmıştır. Görüntüsü kaydedilen bazı yapılar, mikroskopa entegre kamera sistemi ile mikroskoptaki merceğin değerine göre kalibre edilmiş ölçümlendirme şablonu yerleştirilerek ölçülmüştür.

3.5.2. Kurutmada kayıp

Avrupa Farmakopesi 8.0'de tarif edildiği üzere 3 örnek için de yaklaşık 1 g kuru toz drog hassas terazi ile tartılarak, etüvde 2 saat boyunca 105 °C'de kurumaya

bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda droglar tekrar hassas terazi ile tartılarak kurutmada kayıp yüzdesi hesaplanmıştır.

3.5.3. Ekstrelerin hazırlanması

3.5.3.1. İnce tabaka kromatografisinde (İTK) kullanılan ekstrelerin hazırlanması

Avrupa Farmakopesi 8.0’da anlatıldığı üzere her numune için test çözeltisi (a) ve (b) çözeltileri aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b şeklinde numaralandırılarak İTK çalışması yapılncaya kadar ağzı kapalı tüplerde buzdolabında saklanmıştır.

Test çözeltisi (a). 1 gram toz drog üzerine 2 mL seyreltik hidroklorik asit R ve 8 mL metanol R ilave edildi. Geri çeviren soğutucu altında 30 dk ısıtıldı, soğutuldu ve süzüldü.

Test çözeltisi (b). 1 gram toz drog üzerine 10 mL metanol R ilave edildi. Geri çeviren soğutucu altında 30 dakika ısıtılıp, soğutulup ve süzölmüştür.

3.5.3.2. Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan ekstrelerin hazırlanması

Farklı kaynaklardan temin edilen 3 bitki örneği yaklaşık 10 g olarak hassas terazi ile tartılarak erlene alınmıştır. Üzerine 100 mL metanol (extra püre) ilave edilerek, 24 saat boyunca 150 rpm hızında 24 °C sıcaklığa ayarlanmış çalkalayıcı ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon süresi tamamlandığında, süzölerek vakum altında uçucunun tamamı uzaklaştırılmıştır. Darası alınan balonun hassas terazi ile tartım yapılarak ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. Balonda kalan ekstre az miktarda metanol ile sonik banyo içerisinde çözölerek santrifüj tüplerine alınmıştır. Santrifüj tüplerine alınan ekstreler, vakumlu santrifüj cihazında çözücülerinden uzaklaştırılarak aktivite analizleri yapılncaya dek ağızları kapalı şekilde buzdolabında +4 °C’de saklanmıştır. Ekstraksiyon işlemine tabi tutulan drog miktarları ve ekstraksiyon sonrası kuruluğa kadar uçurulan ekstrenin hassas tartımı yapılarak ekstraksiyon verimleri hesaplanarak Tablo 3.4’te sunulmuştur.

3.5.3.3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (YBSK) kullanılan ekstrelerin hazırlanması

Avrupa Farmakopesi 8.0’da Bozotu bitkisindeki marrubiin miktarının tayin edilmesi için sıvı kromatografisi metodu açıklanmıştır. Bu amaçla bitkisel droglardan 1 g hassas terazi ile tartılarak balona alınmış ve üzerine 3 mL seyreltik hidroklorik asit R ve 12 mL metanol (extra pure) ilave edilerek yaklaşık 30 dakika geri çeviren soğutucu

altında ısıtılmıştır. Ardından oda sıcaklığına kadar soğuması beklenilerek pamuktan 25 mL’lik balon jojelere süzölmüştür. Balon metanol (extra pure) ile çalkalanarak yıkanarak, balon jojedeki çözelti 25 mL’ye seyreltilmiştir. Elde edilen çözeltiler ağzı kapalı tüplere alınarak, analiz yapılınca dek buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.5.4. İnce tabaka kromatografisi (İTK)

Her 3 örnek için de önceki başlıkta anlatıldığı şekilde 2’şer ekstre hazırlanmıştır. Bu ekstreler 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b şeklinde numaralandırılarak İTK çalışması yapılınca kadar ağzı kapalı tüplerde buzdolabında saklanmıştır. İTK çalışmasının şartları aşağıda açıklanmıştır:

Hareketli faz: metanol R, toluen R (5:95 h/h)

Uygulama: 5 µL test (a) ve (b) çözeltileri, bant halinde

Sürüklenme: 6 cm sürüklenme, silika jel 60 plak üzerinde

Kurutma: havada

Tespit: Vanilin R’nin 20 hacim etanol (%96) R ve 80 hacim sülfürik asit R’deki 5g/L’lik çözeltisi püskürtüldü, 130 °C’de 5 dk ısıtıldıktan hemen sonra gün ışında ve UV lamba altında incelendi.

3.5.5. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK)

Avrupa Farmakopesi 8.0’da bozotun tayin metodu olarak verilen YBSK analizi, hazırlanışı daha önce açıklanan bitkisel ekstre ile Tablo 3.4’te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.4. YBSK çalışmasının koşulları

Koşul/materyal	Açıklama
Şahit çözelti:	0,2 mg marrubiin R, 1 mL metanol R’de çözüldü.
Kolon:	boyut: L =0,25 m; Ø=4 mm; sabit faz: uç kaplı-oktadesilsilil silika jel kromatografi için R (5 µm)
Hareketli faz:	hareketli faz A: asetonitril hareketli faz B: 0,5 mL fosforik asit R, su R ile 1000 mL’ye ile seyreltilir.
Akış hızı:	1,5 mL/dk
Tespit:	spektrofotometrede 217 nm’de.
Uygulama:	20 µL.

Elde edilen marrubiin doruğu, şahit çözelti ile elde edilen kromatogramdaki doruk ile kıyaslandı.

Marrubiin yüzdesi aşağıdaki denklemle (3.1) hesaplandı:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 2,5}{A_2 \times m_1} \quad (3.1.)$$

A_1 = test çözeltisi ile elde edilen kromatogramda marrubiin'e karşı gelen doruk alanı;

A_2 = şahit çözelti elde edilen kromatogramda marrubiin'e karşı gelen doruğun alanı;

m_1 = incelenen droğun gram olarak ağırlığı;

m_2 = marrubiin R'nin gram olarak ağırlığı;

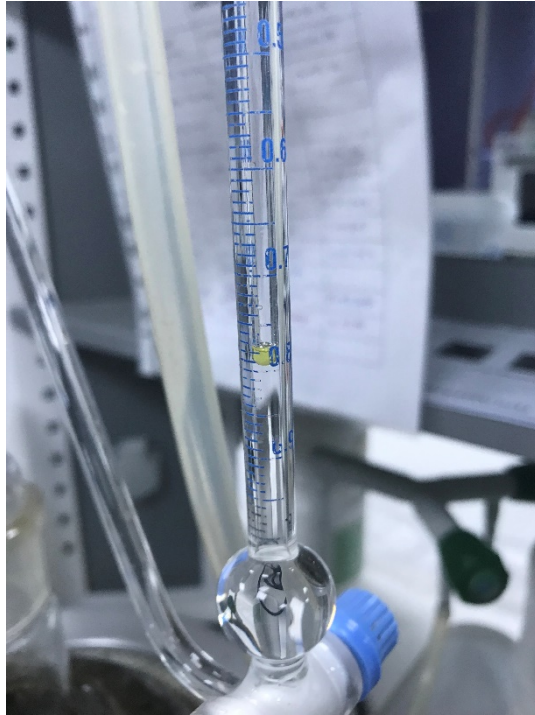
p = marrubiin R içindeki marrubiin yüzdesi.

3.5.6. Uçucu yağ eldesi

Bitkisel materyallerden uçucu yağ eldesi amacıyla laboratuvar ölçekte Clevenger apareyinde (Görsel 3.1.) 50 g kuru drog 2 L'lik balona konulduktan sonra üzerine 1000 mL distile su ilave edilmiştir. 3 saat süre ile distilasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sürenin sonunda apareyin soğuması beklenmiş ve ölçekli kısımdan uçucu yağlar toplanmıştır. Bitkisel materyaller çok az miktarda uçucu yağ içerdiği için (Görsel 3.2.) örneklerden elde edilen uçucu yağlar Clevenger apareyinden hekzan ile alınarak aynı şartlarda eş zamanlı olarak Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometre (GK-KS) ve Gaz Kromatografisi - Alev İyonlaşma Dedektörü (GK-AİD) cihazlarına verilmiştir.



Görsel 3.6. *Uçucu yağ eldesinde kullanılan Clevenger apareyi düzeneği*



Görsel 3.7. *Distilasyon işlemi sonucunda elde edilen uçucu yağ*

3.5.7. Gaz kromatografisi

Elde edilen uçucu yağların kromatografik analizlerinde Demirci ve diğerleri (2017) ve Göger ve diğerlerinin (2018) yaptıkları çalışmalarda metotlardan yararlanılmış olup yöntem aşağıda detaylı olarak belirtilmiştir [95, 96].

3.5.7.1. GK analiz koşulları (GK-AİD)

Agilent 6890N sistemi kullanılarak yapılmıştır. Agilent 6890N sisteminde FID Detektör (Flame Ionization Detector-Alev iyonlaşma dedektörü) sıcaklığı 300 °C'dir. GC-KS sistemi ile uyumlu tutunma zamanları elde edilebilmesi için Agilent 6890N sisteminde 60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 µm film kalınlığında HP-Innowax polar kolon kullanılmış ve aşağıda verildiği gibi aynı sıcaklık programı uygulanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum (0,8 mL/dk. akış hızı) kullanılmıştır. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250 °C'dir

3.5.7.2. GK-KS analiz koşulları

GC-KS analizlerinde Agilent 5975 GC-MSD sistemi kullanılmıştır. GK sisteminde kullanılan tipte kolon kullanılarak taşıyıcı gaz akış hızı 0.8 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklık programı şu şekildedir. 60 °C'de 10 dak, 4 °C/dak artışla 220 °C'ye, 220 °C'de 10 dk, 1 °C/dk artışla 240 °C'ye ve 240 °C'de 20 dk. Split oranı 30:1'dir. Enjeksiyon portu sıcaklığı 250°C olarak set edilmiştir. Kütle spektrumları (KS) 70 eV elektron enerjisi uygulanarak ve m/z 35 ile 450 kütle aralığında alınmıştır. Değerlendirme işlemlerinde “Başer Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi” ve Wiley GK/KS, Adams ve MassFinder 3.0 Kütüphane Tarama Yazılımları kullanılmıştır.

3.5.8. Biyolojik aktivite analizleri

3.5.8.1. Mikrobiyal aktivite analizi

3.5.8.1.1. Besiyeri ve kimyasalların hazırlanışı

Deneysel çalışmada bakteri suşlarını aktive etmek için Mueller Hinton Agar (MHA) ve maya suşlarında ise Potato Dextrose Agar (PDA) besiyerleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite ve kombinasyon testlerinde bakteri suşları için katyon ilaveli Mueller Hinton broth II (MHB-II) ve maya suşları için RPMI 1640 sıvı besiyerleri kullanılmıştır.

-MHA besiyeri; toz halindeki 17 g Mueller Hinton agar (MHA) 500 mL distile suda çözülerek hazırlanmış ve 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek soğutulup Petri kaplarına dökülmüştür.

-PDA besiyeri; toz halindeki 19,5 g Potato dekstroz agar (PDA) 500 mL distile suda çözülerek hazırlanmış ve aynı şekilde steril edilerek Petri kaplarına alınmıştır.

-MHB-II besiyeri; toz halindeki 11 g katyon ilaveli Mueller hinton broth II 500 mL distile suda çözülerek hazırlanmış ve 121 °C’de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir ve kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.5.8.1.2. Agar kuyucuk difüzyon metodu

Çalışma CLSI’in (Clinical and Laboratory Standards Institute) M02-A11 standardına göre Agar Difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Bacillus subtilis* (NRRL-B4378), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC-13311) bakterileri ve *Candida albicans* (ATCC 10231) mayası seçilmiştir. Bakteri ve mayalar çalışmanın 24 saat öncesinden inkübe edilerek genç kültürler kullanılmıştır. Bakteri ve maya yoğunluğu, densitometresi ile serum fizyolojik (%0,9 NaCl çözeltisi) içerisinde 0,5 McFarland’a ayarlanmıştır. Seyreltilmiş mikroorganizmalardan 100’er µL alınarak bakteriler için 25 mL Mueller Hinton Agar (MHA) içeren maya için Potato Dextrose Agar (PDA) petrilere Yayma Plak Yöntemi ile mikroorganizmaların ekimi gerçekleştirilmiştir. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra 6 mm çapındaki steril agar delici ile petri yüzeylerine açılan bloklara 20 µL test numuneleri eklenmiştir. 24 saat 35±2 °C inkübasyonun sonunda oluşan inhibisyon zonları (İZ) denklem (3.2) kullanılarak ölçülmüştür. Referans antimikrobiyal ajan olarak bakteriler için Siprofloksasin ve *Candida albicans* (ATCC 10231) için Amfoterisin B kullanılmıştır [97].

$$İZ = \text{ölçülen değer} - \text{disk çapı} \quad (3.2)$$

3.5.8.1.3. Mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Deneysel çalışma kapsamında Agar Difüzyon Metodu’nda sonuç veren MV-3 kodlu numunenin *Escherichia coli* (NRRL B-3008), *Bacillus subtilis* (NRRL-B4378), *Corynebacterium striatum* (ATCC-1293) *Salmonella typhimurium* (ATCC-13311) bakterilerine karşı etkili olduğu görüldüğü için, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standardı (M27-A2) kullanılarak Mikrodilüsyon Yöntemi ile bu bakterilere

karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmeye çalışılmıştır. [98, 99]. Referans antimikrobiyal ajan olarak Kloramfenikol tercih edilmiştir.

24 saat öncesinden pasajlanarak 35 ± 2 °C’de geliştirilen genç ve aktif suşlar geliştirilmiştir. Geliştirilen suşlar, serum fizyolojik (%0,9 NaCl çözeltisi) içerisinde McFarland 0,5 olacak şekilde türbidometre ile konsantrasyonu ayarlanmıştır. Buna her bir analize, analizin geçerliliğinin tespiti için besiyeri kontrolü ve mikroorganizma kontrolü eklenmiş olup, geçerliliği onaylanan analizler üzerinden MİK değeri hesaplama yapılmıştır. Her bir kuyucukta takriben 5×10^5 cfu/mL Cfu mikroorganizma olacak şekilde 96’lık steril plate’in ilgili kuyucuklarına enjeksiyon yapılmıştır. Maddeler, ilk kuyucuğa enjeksiyon yapılarak kademeli olarak seyreltme gerçekleştirilmiştir. Buna göre numune konsantrasyonu olarak $10 - 1.95 \times 10^{-2}$ mg/mL aralığında çalışılmıştır. 24 saat 35 ± 2 °C’de inkübasyon sonrasında 20’şer µL %0,01 (a/h) Resazurin çözeltisi ilavesi ile tekrardan aynı koşullarda 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonuçlar renk değişimine göre değerlendirilmiştir.

3.5.8.2. Antioksidan aktivite analizi

Hazırlanışı daha önce açıklanmış olan bitkisel ekstrelerin DPPH (2,2 difenil -1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü etkisi, Kumarasamy ve diğerleri (2002) tarafından geliştirilen, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) anyon süpürme aktivitesi ise, Re ve diğerleri (1999) tarafından geliştirilen metoda göre gerçekleştirilmiştir [100, 101].

3.5.8.2.1. DPPH (2,2 difenil -1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü etkisi

DPPH radikal süpürücü etkinin tayini için maddelerin konsantrasyon aralığı olarak $1 \times 7.81 \times 10^{-3}$ mg /mL olarak belirlenmiştir. Standardize edilmiş DPPH• çözeltisi hazırlanarak numunelere 100 µl ilave edilip oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 517 nm’de UV Spektrofotometresinde absorbans değerleri okunmuştur. Troloks pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. % inhibisyon değerleri (3.3) formülüne göre hesaplanmıştır. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir [100, 102].

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.3)$$

A_{kontrol} : Kontrol absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: Test numunesinin absorbansı

3.5.8.2.2. ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) anyon süpürme aktivitesi

ABTS anyon süpürme aktivitesi tayini için maddelerin konsantrasyonu 1 mg/mL seçilmiştir. Standardize edilmiş ABTS⁺• çözeltisi hazırlanarak numunelere 990 µl eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 734 nm'de UV Spektrofotometresinde absorbans değerleri okunmuştur. Standart olarak troloks kullanılmış olup, % inhibisyon değerleri (3.1) formülüne göre hesaplanmıştır [101].

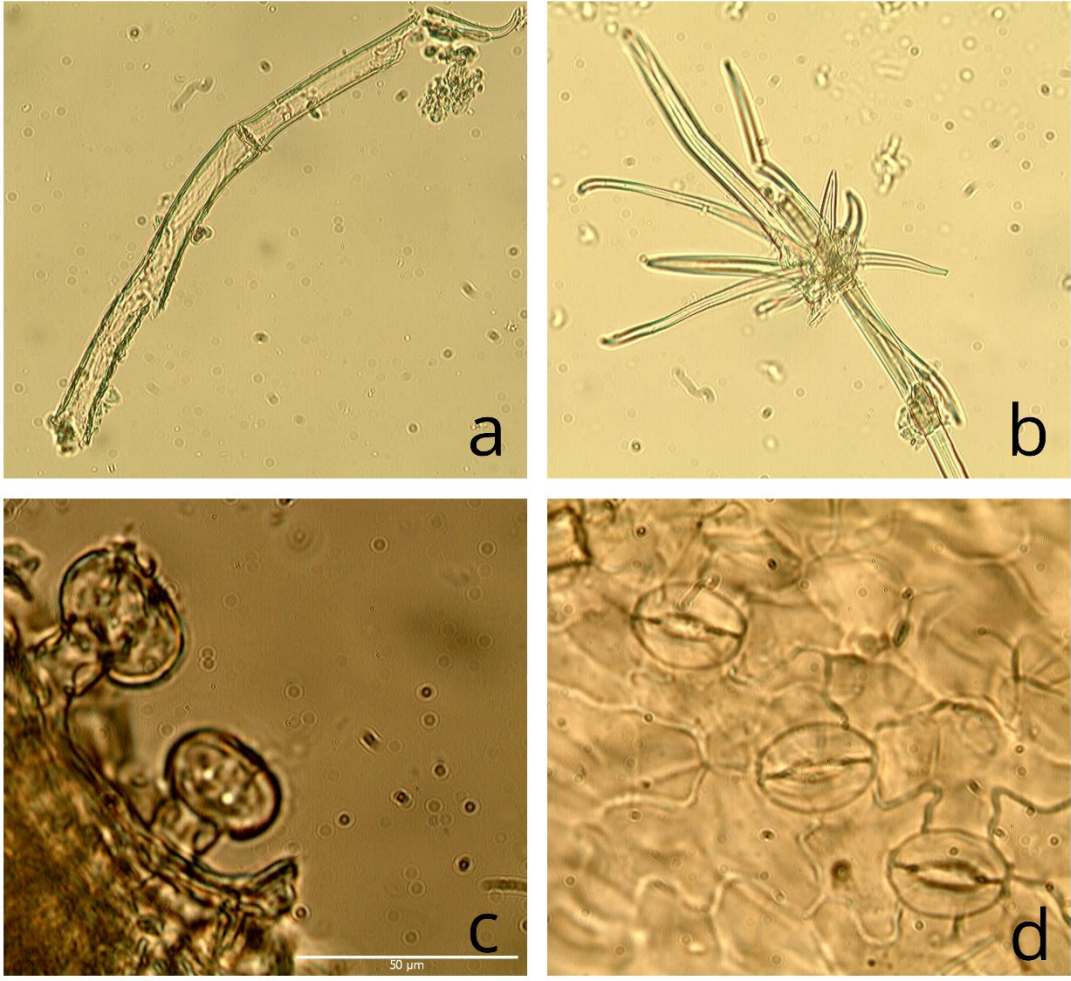
4. BULGULAR VE YORUMLAR

4.1. Makroskobik İnceleme

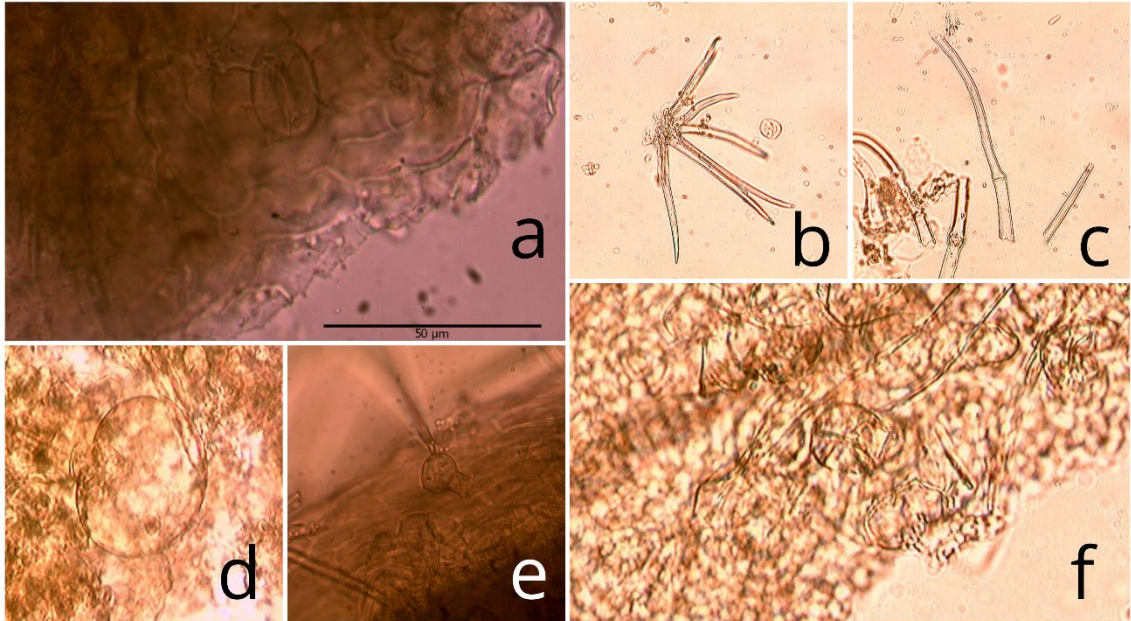
Farklı yerlerden temin edilen örnekler incelenirken tunç havanda ince toz haline getirilmiştir. Grimsi yeşil renkte, tüylü bir yapıya sahip olan bitkilerin toprak üstü kısımları, keskin ve aromatik bir kokuya ve hafif acı bir tada sahiptir.

4.2. Mikroskobik İnceleme

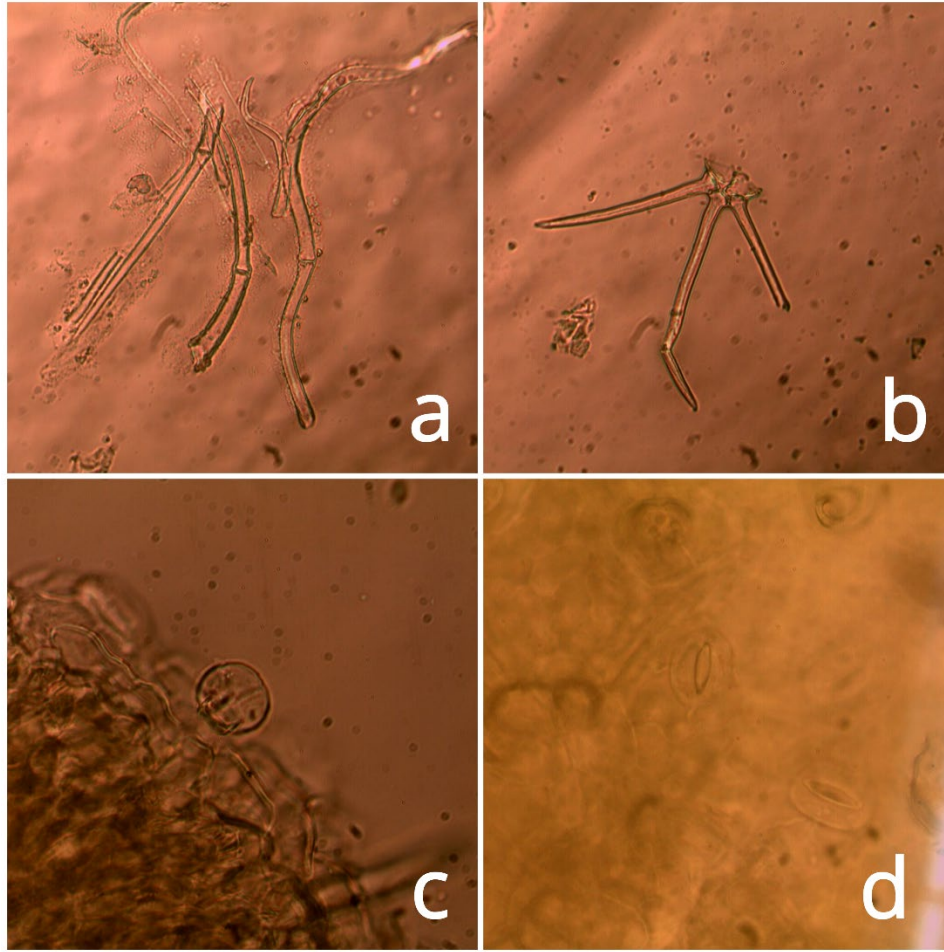
Temin edilen bitki örneklerinin hepsi ortak özellikler taşımaktadır. Farklı morfolojik yapılara rastlanılmamıştır. Mikroskop preparatları kloralhidrat reaktifi ile ısıtılarak hazırlanarak incelenmiş ve çok köşeli epiderma hücreleri, diasitik stoma içeren epiderma hücreleri, mezofilde kalsiyum oksalat kristalleri ve Lamiaceae tipi salgı tüylerinin varlığı görülmüştür. Ayrıca tek ve çok hücreli örtü tüyleri ile yıldız tüylerin varlığı saptanmıştır. Kamera entegreli mikroskop ile yapılan incelemeler sonucunda elde edilen görüntüler Görsel 4.1., 4.2. ve 4.3.'te gösterilmiştir.



Görsel 4.1. *MV1 numunesinin mikroskop görüntüleri*
(a-örtü tüyü, b-yıldız tüyü, c-salgı tüyü, d-diasitik stoma)



Görsel 4.2. *MV2 numunesinin mikroskop görüntüleri*
(a-diasitik stoma, b-yıldız tüyü, c-örtü tüyü, d,e-salgı tüyü, f-kalsiyum oksalat kristalleri)



Görsel 4.3. MV3 numunesinin mikroskop görüntüleri
(a-örü tüyü, b-yıldız tüyü, c-salgı tüyü, d-diasitik stoma)

4.3.Kurutmada Kayıp

Avrupa Farmakopesi 8.0’da kurutmada kayıp oranının maksimum %10 olması gerektiği belirtilmiştir.

Numunelerin kurutulmadan önceki tartımları ile, kurutulduktan sonraki tartımları arasındaki fark hesaplanarak kurutmada kayıp değeri % olarak bulunmuştur ve sonuçlar Tablo 4.1.’de paylaşılmıştır.

Tablo 4.1. Kurutmada kayıp deneyi sonuçları

Numune	Kurutmadan Önceki Tartım (mg)	Kurutmadan Önceki Tartım (mg)	Kurutmada kayıp (%)
MV1 (Standardize drog, Almanya)	2051,1	1913,6	6,70
MV2 (Kültür, Kütahya)	1017,8	955,2	6,15
MV3 (Nativital, İstanbul)	3510,9	3109,8	11,42

4.4. Ekstre Verimi

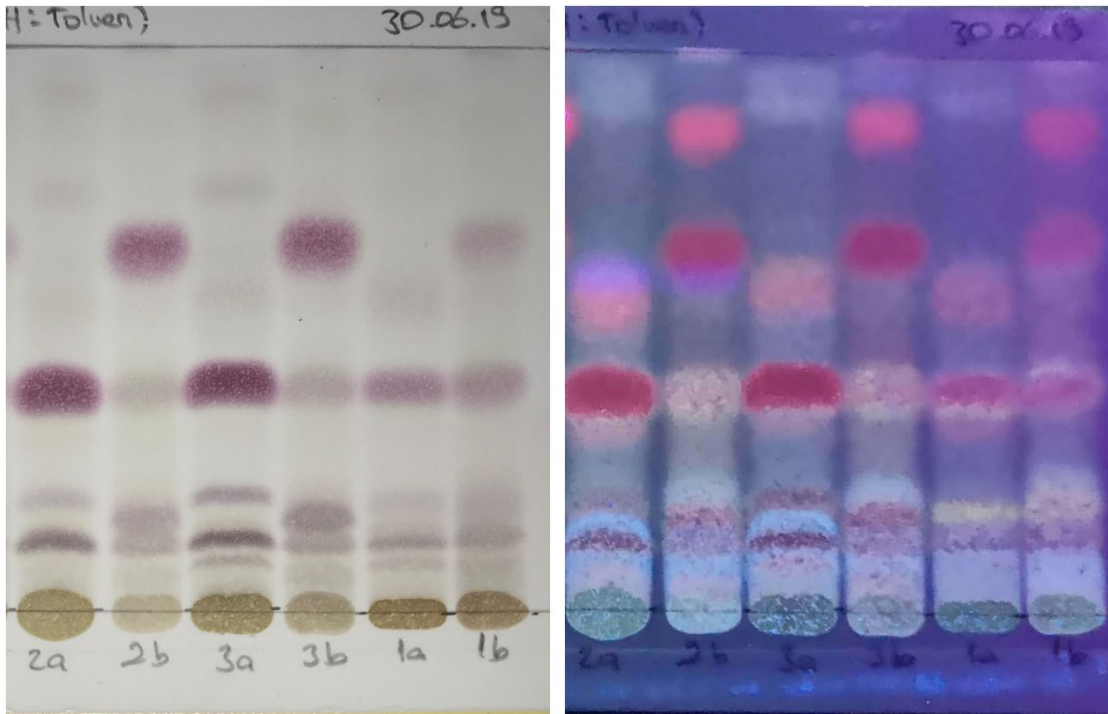
Farklı yerlerden temin edilen üç farklı bitki örneğinden elde edilen ekstrelerin çözücülerini tamamen uzaklaştırıldıktan sonra tartılarak elde edilen değerler, başlangıç tartımlarına oranlanarak ekstraksiyon verimi hesaplanmış ve Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. *Biyolojik aktivite analizlerinde kullanılan bitkisel ekstrelerin verimi*

Örnek	Başlangıç tartım (g)	Verim (%)
MV1 (Standardize drog, Almanya)	10,14	11,1055
MV2 (Kültür, Kütahya)	8,00	9,8562
MV3 (Nativital, İstanbul)	10,03	12,8833

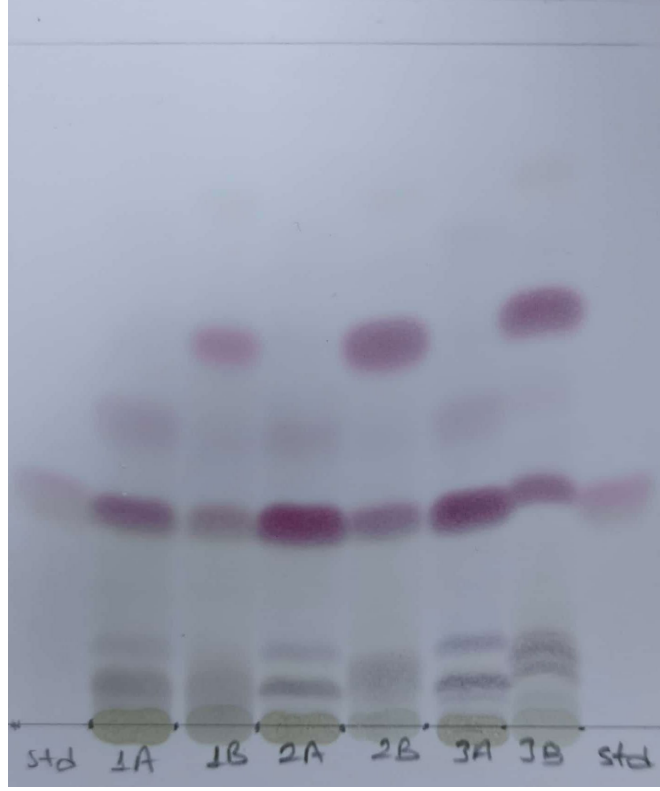
4.5. İnce Tabaka Kromatografisi

3 adet numunun önceki bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan 2'şer farklı ekstrelerinin, farmakopede tarif edildiği şekilde İTK analizleri yapılmıştır. Vanilin R reaktifi püskürtülerek hem güneş ışığı altında hem de UV ışığı (364 nm) altında incelenmiştir. Elde edilen 6 farklı ekstrenin karşılaştırılması amacıyla Görsel 4.4'deki kromatogram görüntüleri elde edilmiştir.



Görsel 4.4. *Elde edilen 6 farklı ekstrenin kromatogram görüntüleri (sırası ile gün ışığı ve UV 364 nm altında)*

Ayrıca elde edilen 6 farklı ekstrenin, marrubiin maddesi ile aynı plakta İTK analizi yapılarak, ekstrelerin marrubiin içeriği hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır (Görsel 4.5).



Görsel 4.5. Standart madde olarak marrubiin ve 6 farklı ekstrenin birlikte yer aldığı kromatogram görüntüsü

Sonuçlara bakıldığında, Test çözeltisi (a)'ya göre hazırlanan ekstrelerdeki marrubiin lekelerinin, Test çözeltisi (b)'ye göre hazırlanan ekstrelere oranla daha yoğun olduğu görülmektedir. Ayrıca Görsel 4.5.'te yer alan kromatogram sonuçlarına göre, her 3 bitki numunesinde marrubiin maddesinin olduğu ortaya konmuştur.

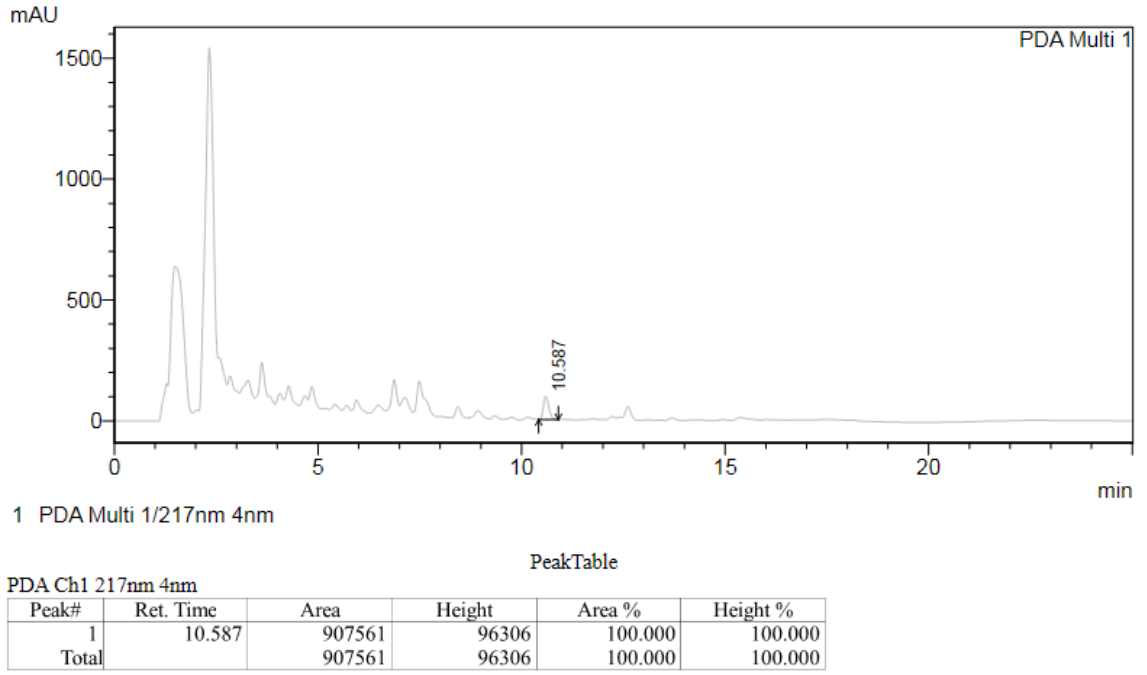
4.6. Sıvı Kromatografisi

Bitki numunelerinin Avrupa Farmakopesi 8.0'de yer alan monografa göre yapılan YBSK analizlerine göre içerdikleri marrubiin miktarı belirlenmiştir. Ekstrelerin içerdiği marrubiin yüzdesi %0,21-0,99 arasında değiştiği görülmüştür. Ekstreler ile yapılan analiz sonuçları Tablo 4.3'te, elde edilen kromatogramlar ise Görsel 4.6., 4.7., 4.8. ve 4.9.'da sunulmuştur.

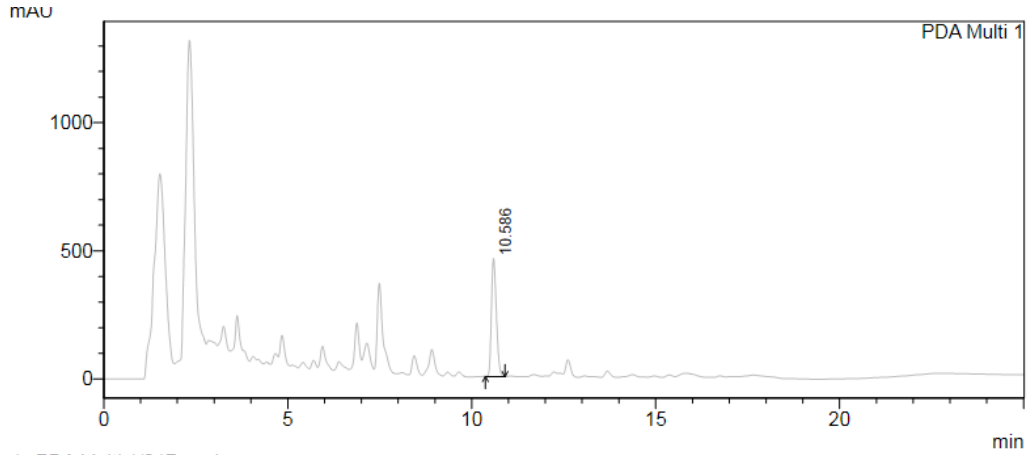
Tablo 4.3. YBSK analizi sonucunda elde edilen marrubiin miktarları

Örnek	Marrubiin (%)
MV1	0,21
MV2	0,99
MV3	0,94
Farmakope*	0,7

*: Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen, droğun içermesi gereken minimum marrubiin yüzdesi



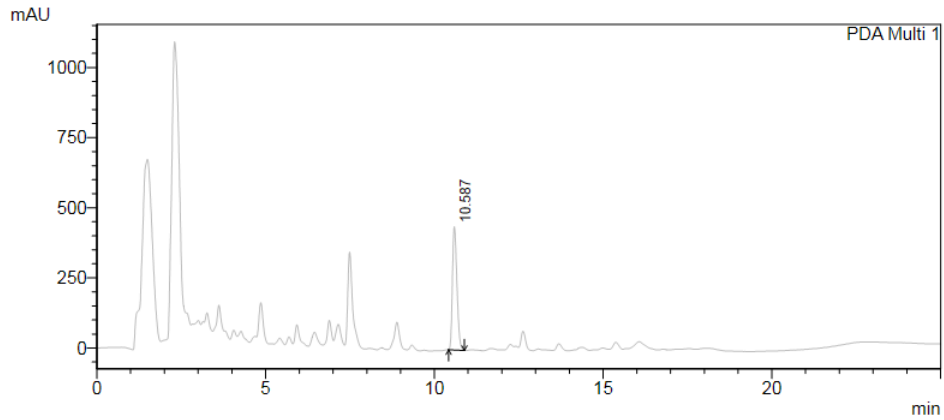
Görsel 4.6. MV1 örneğine ait kromatogram



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.586	4299510	461613	100.000	100.000
Total		4299510	461613	100.000	100.000

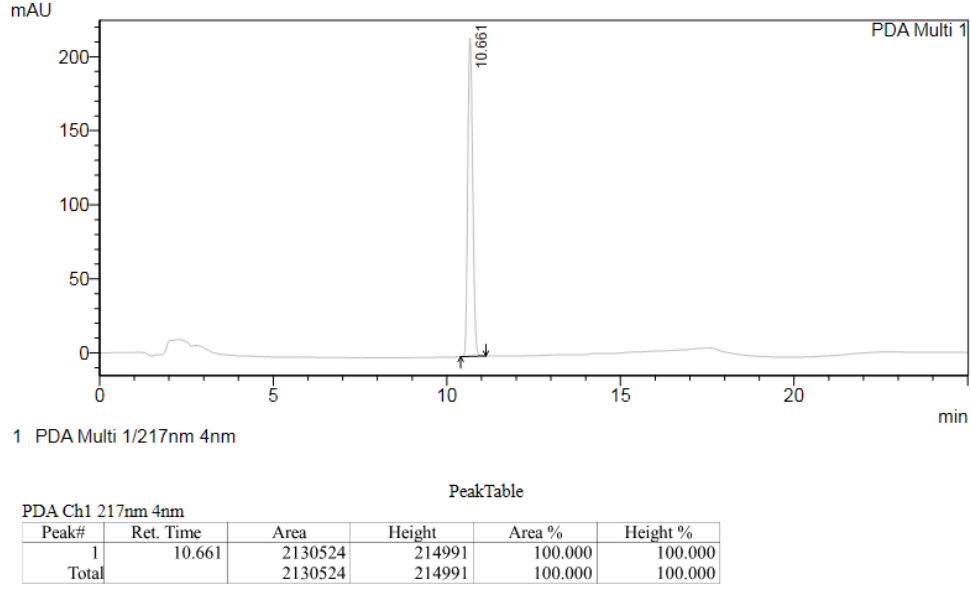
Görsel 4.7. *MV2 örneğine ait kromatogram*



PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	10.587	4075975	439698	100.000	100.000
Total		4075975	439698	100.000	100.000

Görsel 4.8. *MV3 örneğine ait kromatogram*



Görsel 4.9. Marrubiin'e ait kromatogram

4.7. Gaz Kromatografisi

M. vulgare numunelerinden elde edilen uçucu yağların kimyasal kompozisyonları GK-KS ve GK-AİD sistemleri ile analiz edilmiş ve kütüphane yardımıyla teşhis edilen bileşenlerin bağıl % değerleri Tablo 4.4. ile sunulmuştur. Analiz sonuçlarına göre; MV1 numunesinden elde edilen uçucu yağda timol (%21,2), karvakrol (%19,5) ve γ -terpinen (%7,4); MV2 numunesinin uçucu yağında germakren D (%7,1) ve β -karyofillen (%6,2); MV3 numunesine ait uçucu yağda ise β -karyofillen (%28,7), germakren D (%25,6) ve δ -kadinen (%7,7) teşhis edilebilen ana bileşikler olarak bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. *M. vulgare* uçucu yağlarının bileşimleri

RRI	Bileşik	Uçucu yağlar		
		MV1	MV2	MV3
1032	α -Pinen	0,5	-	-
1132	Sabinen	0,2	-	-
1174	Mirsen	0,4	-	-
1188	α -Terpinen	0,8	-	-
1203	Limonen	1,1	-	-
1213	1,8-Sineol	0,5	-	-
1244	2-Pentil furan	0,1	-	0,1
1255	γ -Terpinen	7,4	-	0,2
1280	<i>p</i> -Simen	4,6	-	0,1
1393	3-Oktanöl	0,2	-	-
1400	Nonanal	-	-	0,6
1452	1-Okten-3-öl	1,1	-	-
1466	α -Kubeben	-	-	0,1

Tablo 4.4. (Devam) *Marrubium* uçucu yağlarının bileşimleri

1497	α -Kopaen	0,9	1,5	-
1528	α -Burbonon	0,1	-	e
1532	Kafur	1,1	-	-
1535	β -Burbonon	-	0,3	1,3
1549	β -Kubeben	-	-	0,4
1553	Linalol	0,6	0,8	-
1562	Izopinokamfon	0,5	-	-
1565	Linalil asetat	-	0,5	-
1572	α -Bergamoten	-	-	0,1
1600	β -Elemen	-	-	0,4
1612	β -Karyofillen	3,4	6,2	28,7
1668	(Z)- β -Farnesen	-	-	0,9
1669	Seskuisabinen	-	-	1,1
1687	α -Humulen	0,8	1,3	5,7
1704	γ -Murolen	-	-	0,4
1719	Borneol	0,5	-	-
1726	Germakren D	2,1	7,1	25,6
1740	α -Murolen	-	-	0,6
1751	Karvon	4,2	-	0,4
1755	Bisiklogermakren	-	-	0,4
1773	δ -Kadinen	1,5	2,7	7,7
1776	γ -Kadinen	-	-	0,3
1845	(E)-Anetol	2,2	-	-
1868	(E)-Geranil aseton	0,3	0,8	0,1
1957	Kubebol	-	-	0,2
1958	(E)- β -Ionon	0,4	0,3	-
2008	Karyofillen oksit	2,7	-	0,9
2050	(E)-Nerolidol	1,4	-	5,4
2071	Humulen epoksit II	0,5	-	-
2104	Viridiflorol	1,0	-	-
2131	Hekzahidrofarnesil aseton	1,7	2,2	0,8
2178	T-Kadinol	-	-	0,1
2186	Öjenol	0,7	-	0,2
2198	Timol	21,2	1,4	0,6
2200	Dokosan	-	1,3	-
2202	Germakren D-4-ol	-	-	0,6
2209	T- Murolol	0,7	-	0,3
2239	Karvakrol	19,5	5,7	0,6
2246	(2Z,6E)-Farnesal	-	0,5	-
2255	α -Kadinol	-	-	1,0
2316	Karyofilladienol I	-	-	0,2
2324	Karyofilladienol II	e	-	-
2384	Farnesil aseton	-	0,7	-
2551	Geranil linalol	-	-	1,0
2931	Hekzadekanoik asit	1,2	4,0	2,0

Tablo 4.4. (Devam) Marrubium uçucu yağlarının bileşimleri

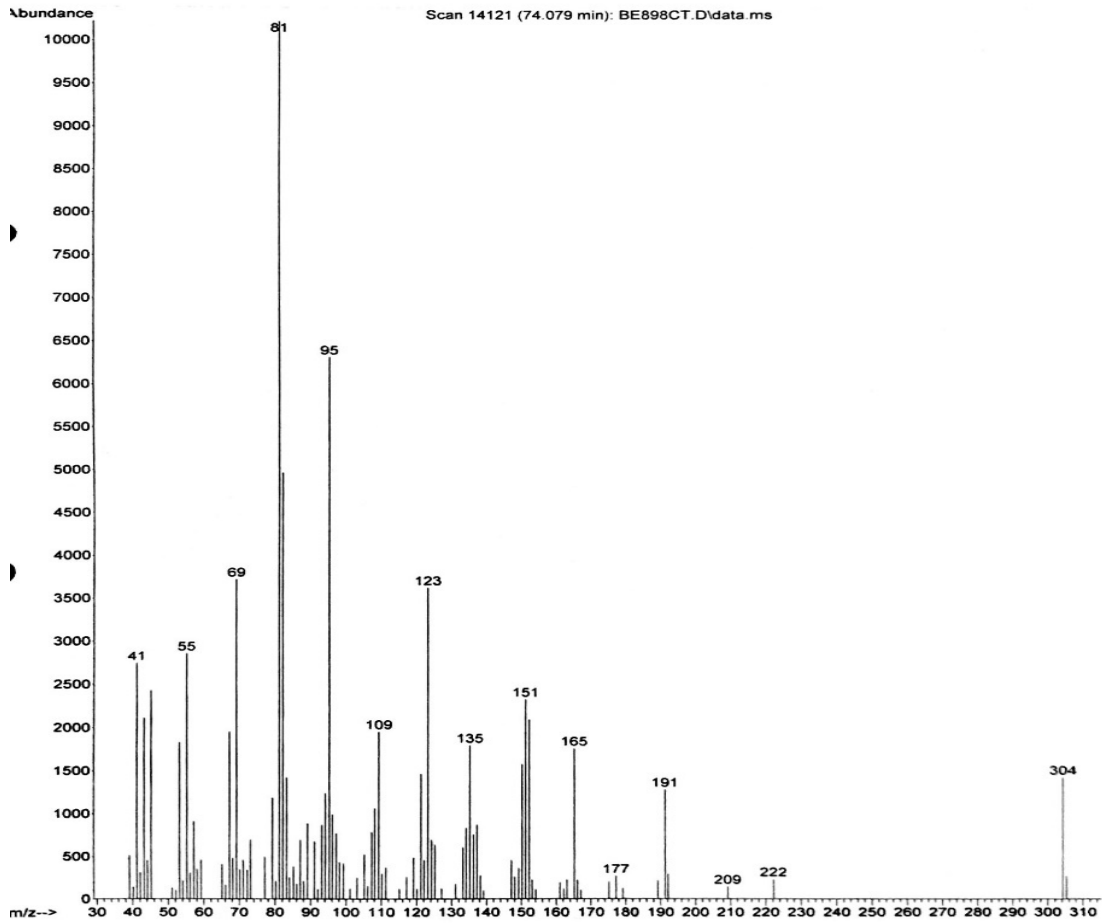
Bilinmeyen *	-	10,1	-
Bilinmeyen **	2,3	12,2	-
Toplam	88,4	59,6	89,1

RRI: n-alkan serisine göre hesaplanmış Relatif tutunma indisleri; **e:** Eser (< 0.1 %)

***:** Kütüphanelerden teşhis edilemeyen bileşen, BP: 167, M_A: 306

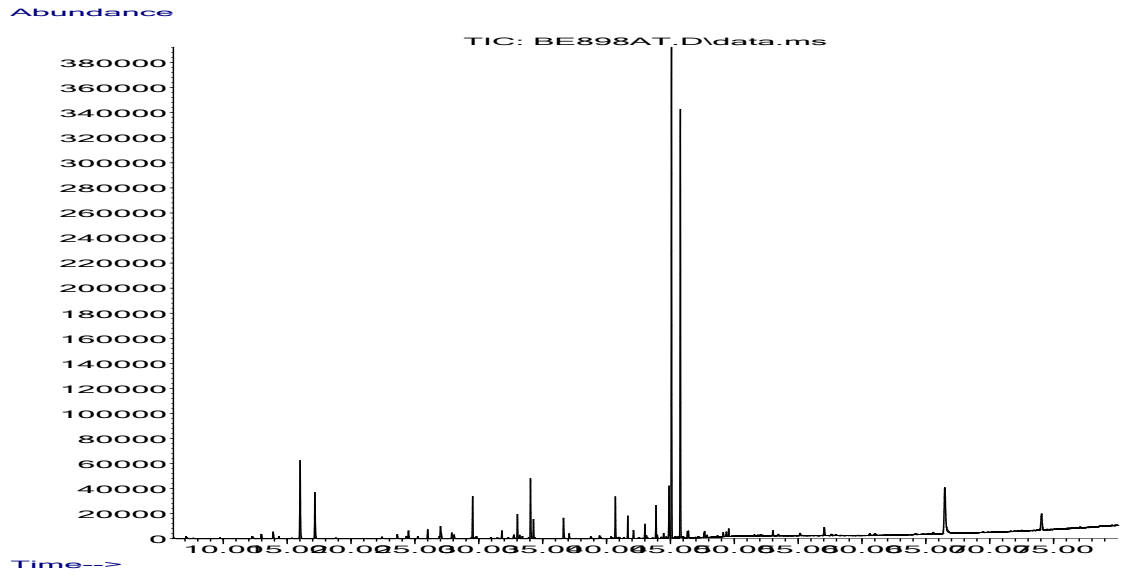
****:** Kütüphanelerden teşhis edilemeyen bileşen, BP:81, M_A: 304

MV2 numunesinden elde edilen uçucu yağının analizi sonucunda sırasıyla %12,2 ve %10,1 oranında bulunduğu belirlenen, ancak taranan kütüphane verileriyle teşhis edilemeyen 2 bileşen olduğu görülmüştür. Bu bileşene ait kütle spektrumu Görsel 4.10. ile sunulmuştur.

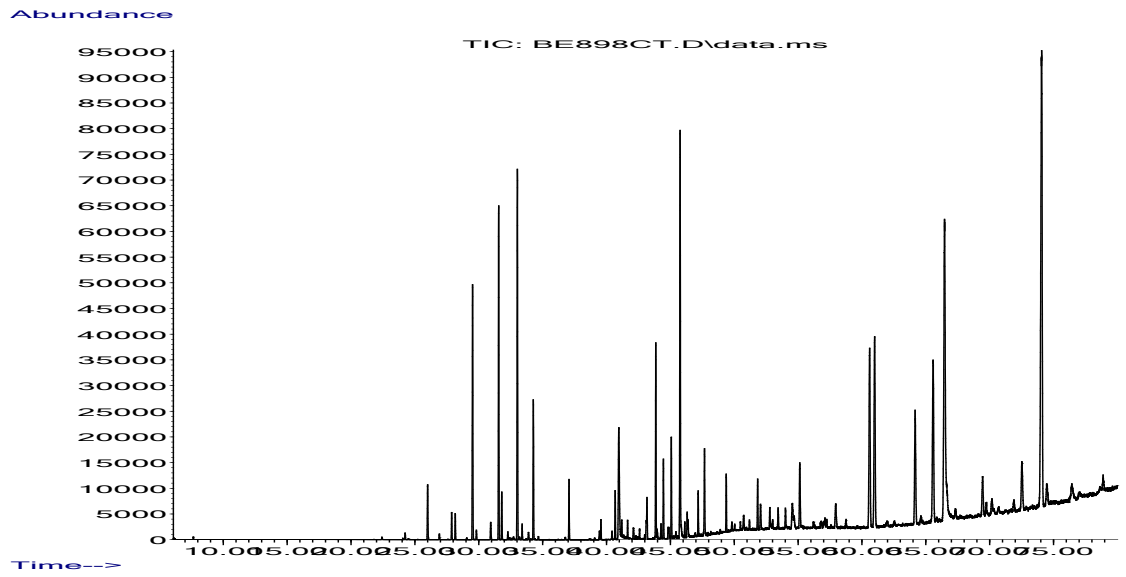


Görsel 4.10. Tanımlanamayan bileşenin kütle spektrumu
(Moleküler ağırlığı 304, BP değeri 81)

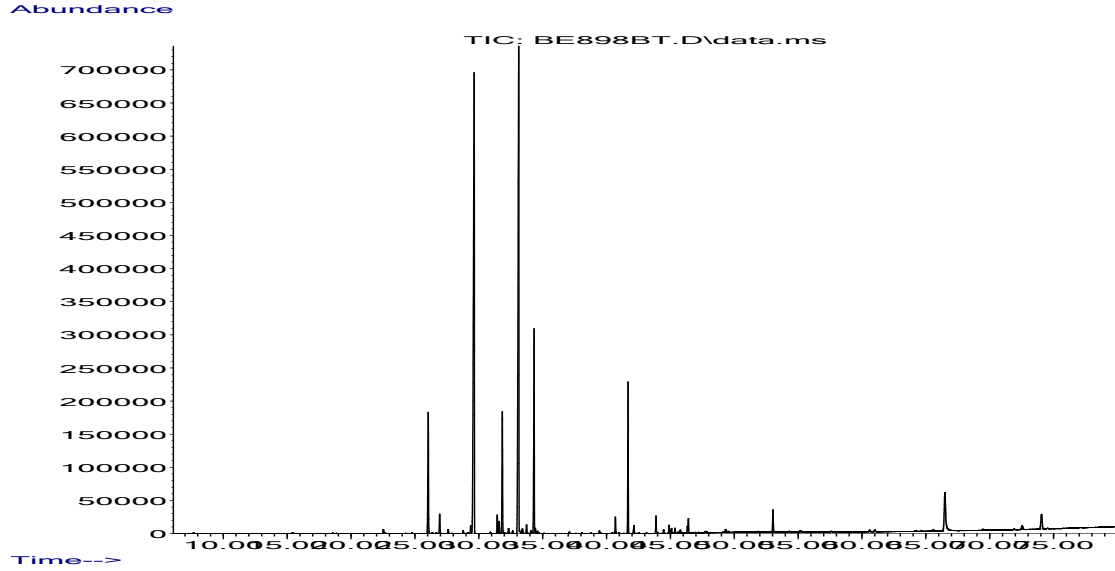
Uçucu yağlar ile yapılan GK-KS analizlerinde elde edilen kromatogramlar Görsel 4.11., 4.12. ve 4.13.'te gösterilmiştir.



Görsel 4.11. MV1 örneğine ait GK-KS kromatogramı



Görsel 4.12. MV2 örneğine ait GK-KS kromatogramı



Görsel 4.13. MV3 örneğine ait GK-KS kromatogramı

4.8. Biyolojik Aktivite Analizleri

4.8.1. Ekstrenin mikrobiyal aktivite analizi

Hazırlanışı önceki bölümde açıklanan bitkisel ekstratlar ile mikrobiyal aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Agar kuyucuk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan aktivite analiz sonuçları Tablo 4.5. ve 4.6.'da gösterilmiştir.

Bu sonuçlara göre yalnızca MV3 kodlu bitkisel numunede, çalışmada kullanılan mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bulunmuştur ve MİK değeri hesaplanmıştır (Tablo 4.6.).

Tablo 4.5. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile yapılan mikrobiyal aktivite analiz sonuçları

Numune	<i>Escherichia coli</i> (NRRL B-3008)	<i>Bacillus subtilis</i> (NRRL-B4378)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC-13311)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
MV1	0	0	0	0	0
MV2	0	0	0	0	0
MV3	12	6	0	2	0
Siprofloksasin	24	14	-	19	12
Amfoterisin B	-	-	12	-	-
İnhibisyon Zon Çapı (mm)					

Tablo 4.6. Mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan mikrobiyal aktivite analiz sonuçları

Numune	<i>Escherichia coli</i> (NRRL B-3008)	<i>Bacillus subtilis</i> (NRRL-B4378)	<i>Corynebacterium striatum</i> (ATCC-1293)	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC-13311)
MV3	0,625	1,25	5	-
Kloramfenikol	0,00625	0,0125	0,0125	0,003125
MİK değeri (mg/mL)				

4.8.2. Ekstrenin antioksidan aktivite analizi

Numunelerden elde edilen ekstrelerin antioksidan aktivite analizleri için hem DPPH radikali hem de ABTS anyon süpürücü etkileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre antioksidan aktivite en fazla MV1 kodlu bitki örneğinde görülürken, onu sırasıyla MV2 ve MV3 kodlu örnekler izlemiştir (Tablo 4.7. ve 4.8.). ABTS anyon süpürme aktivitesine bakıldığında MV3 kodlu örneğin etki göstermediği görülmüştür.

Tablo 4.7. DPPH radikal süpürücü etki sonuçları

Numune	IC ₅₀	İnhibisyon (%)	Standart sapma	Konsantrasyon (mg/L)
MV1	0,0622	67,53	3,70	1
MV2	0,124	60,14	1,68	1
MV3	0,247	58,55	1,93	1
Trolaks	0,102	70,57	1,79	0,1

Tablo 4.8. ABTS anyon süpürme aktivite sonuçları

Numune	%ABTS ^{•+} inhibisyonu
MV1	31,48
MV2	13,67
MV3	0
Trolaks	75,78

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

.Lamiaceae familyasında *Marrubium* cinsinin tıbbi olarak kullanılabilen türlerinden biri olan *M. vulgare*, bu tez çalışması kapsamında farmakognozik olarak incelenmiştir. Bu amaçla farklı yerlerden temin edilen numunelerin makroskobik ve mikroskobik incelemeleri yapılarak bitkinin teşhisi yapılarak; kurutmada kayıp, İTK ve YBSK analizleri ile de drogların Avrupa Farmakopesi monografında belirtilen kriterlere uygun olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun yanı sıra droglardan distilasyon yolu ile elde edilen uçucu yağların GK-KS ve GK-AİD cihazları ile kimyasal kompozisyonları incelenmiş ve bileşenleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen bitkisel ekstrelerin mikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri *in vitro* olarak incelenmiştir.

Drogların mikroskobik incelemeleri sonucunda karakteristik yapılar bütün numunelerde teşhis edilerek farklı yapılara rastlanılmamıştır.

Kurutmada kayıp deneylerinde değerler sırası ile MV1, MV2 ve MV3 kodlu drog için %6,7; %6,15; ve %11,42 olarak bulunmuştur. Avrupa Farmakopesi'ne göre droglarda bu değerlerin en fazla %10 olması gerektiği belirtilmiştir. MV3 numaralı numune bu koşulu sağlamamaktadır. Bu nedenle MV3 örneği, diğer çalışmalarda kullanılmak üzere elde edilen bitkisel ekstreler ve çözeltiler için bir miktar daha kurutulularak kullanılmıştır.

Biyolojik aktivite analizlerinde kullanılmak için hazırlanan ekstrelerin verimleri karşılaştırıldığında bu değerler MV1, MV2 ve MV3 kodlu numuneler için sırası ile %11,1; %9,85 ve %12,88 olarak, birbirlerine oldukça yakın değerler bulunmuştur.

Bitki örneklerinin kimyasal kompozisyonu hakkında bilgi veren incelemelerden biri olan İTK analizi ile; bozotda bulunan ana etken madde olan marrubiin ile birlikte bitki numunelerinden elde edilen ekstreler karşılaştırılmıştır. Bu incelemenin sonucunda kromatograma bakıldığında, numunelerden elde edilen (a) çözeltilerinde elde edilen lekelerin (b) çözeltilerine kıyasla daha yoğun olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin (a) çözeltileri hazırlanırken çözücüye ilave edilen derişik HCl nedeniyle pre-marrubiin'in marrubiin'e dönüşümünün artması olarak yorumlanmıştır. İTK kromatogram sonuçları karşılaştırıldığında, her 3 numunenin de benzer bileşenleri barındırdığı görülerek farklı lekeler içermediği görülmüş ve her 3 numunede de marrubiin varlığı ortaya konmuştur.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile bitki numunelerinin içerdiği marrubiin miktarı, elde edilen kromatogramlardaki marrubiin piklerinin alanı hesaplanarak, Avrupa Farmakopesi monografında yer alan formül ile belirlenmiştir. Bu

değerler MV1, MV2 ve MV3 kodlu numuneler için sırası ile %0,21; %0,99 ve %0,94 olarak bulunmuştur. Marrubiin yüzdesi monografda en az %0,7 olarak istenmiştir. Etiketinde Avrupa Farmakopesi'ne uygun olduğu yazan ve marrubiin miktarı %0,78 olarak belirtilen MV1 kodlu drog; farmakope monografındaki değerin altında kalmıştır.

Farmakopede yer almamasına rağmen bu teze özgü deneysel çalışmalardan biri olarak droglardan uçucu yağ elde edilmiş ve GK-KS ve GK-AİD cihazları ile kimyasal kompozisyonları incelenmiş ve bileşenleri karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre; MV1 numunesinden elde edilen uçucu yağda timol (%21,2), karvakrol (%19,5) ve γ -terpinen (%7,4); MV2 numunesinin uçucu yağında germakren D (%7,1) ve β -karyofillen (%6,2); MV3 numunesine ait uçucu yağda ise β -karyofillen (%28,7), germakren D (%25,6) ve δ -kadinen (%7,7) teşhis edilebilen ana bileşenler olarak bulunmuştur (Tablo 4.4.). Sonuçlara göre her 3 numunenin de farklı ana bileşenler içerdiği görülmektedir.

Bitki örneklerinden elde edilen ekstrelerin *in vitro* biyolojik aktivite çalışma sonuçlarına göre, incelenen mikroorganizmalar çerçevesinde sadece MV3 kodlu örneğin antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur. Daha önce yapılmış literatür taramalarında *Corynebacterium striatum* suşu ile *M. vulgare* bitki ekstralarının bir arada yer aldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tezin özgün değerlerinden biri olarak seçilen *Corynebacterium striatum* suşuna MV3 kodlu örnek zayıf antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ancak MV3 kodlu örneğin *Escherichia coli* üzerinde güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur.

Biyolojik aktivite çalışmalarından bir diğeri olan antioksidan aktivite analizi için 2 farklı metod kullanılmıştır. Bazı radikallere karşı antioksidan aktivite gösteren bileşenler, bir diğere karşı antioksidan aktivite göstermeyebilmektedir. Bu amaçla hem DPPH radikal süpürücü etki hem de ABTS anyon süpürme etkisi araştırılmıştır. Antioksidan aktivite sonuçlarına bakıldığında % inhibisyon değerleri sırası ile DPPH[•] ve ABTS^{•+} analizleri için MV1 (67,53; 31,48); MV2 (60,14; 13,67) ve MV3 drogları için (58,55; 0) olarak ölçülerek antioksidan aktivitesi en yüksek olan drog MV1 olarak bulunmuş ve bunu sırası ile MV2 ve MV3 drogları takip etmiştir.

Bitkiler aynı türe ait olmasına rağmen bazı analiz sonuçlarında farklılıklar olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin bitkilerin menşelerinin, toplanma zamanlarının ve toplanma sonrası işlemlerin (kurutulma, parçalanma ve ambalajlanma gibi) farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Dünyada farklı ülkelerde yer almasına rağmen Türkiye’de henüz tıbbi preparatı olmayan, Anadolu’nun büyük bir kesiminde yetişebilen bozotun daha fazla bilimsel araştırmaya tabi tutularak özellikle klinik çalışmalar hedeflenerek farklı farmasötik formlardaki preparatlarının her yaşa uygun ve geniş bir spektrumda yapılması, ülkemize bitkisel ilaçlar ve fitoterapi konusunda katma değer sağlaması adına önemlidir.

KAYNAKÇA

1. Gruenwald, J., T. Brendler, C. Jaenicke, T. Fleming, M. Deutsch, and M. Hamid, *PDR for Herbal Medicines*. Montvale, NJ: Medical Economics Company. 1998, Inc.
2. Bradley, P., *British herbal compendium: a handbook of scientific information on widely used plant drugs/published by the British Herbal Medicine Association and produced by its Scientific Committee*. Bournemouth, Dorset: The Association, 1992.
3. Bardai, S.E., B. Lyoussi, M. Wibo, and N. Morel, *Pharmacological evidence of hypotensive activity of Marrubium vulgare and Foeniculum vulgare in spontaneously hypertensive rat*. Clinical and experimental hypertension, 2001. 23(4): p. 329-343.
4. Meyre-Silva, C., R. Yunes, V. Schlemper, F. Campos-Buzzi, and V. Cechinel-Filho, *Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in Marrubium vulgare (Lamiaceae)*. Il Farmaco, 2005. 60(4): p. 321-326.
5. Elberry, A., F. Harraz, S. A. Ghareib, S. A. Gabr, A. Nagy, and E. Abdel-sattar, *Methanolic extract of Marrubium vulgare ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats*. Vol. 3. 2011.
6. El Bardai, S., N. Morel, M. Wibo, N. Fabre, G. Llabres, B. Lyoussi, and J. Quetin-Leclercq, *The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from Marrubium vulgare*. Planta Medica, 2003. 69(01): p. 75-77.
7. Kadri, A., Z. Zarai, A. Békir, N. Gharsallah, M. Damak, and R. Gdoura, *Chemical composition and antioxidant activity of Marrubium vulgare L. essential oil from Tunisia*. African Journal of Biotechnology, 2011. 10(19): p. 3908-3914.
8. Boudjelal, A., C. Henchiri, L. Siracusa, M. Sari, and G. Ruberto, *Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian Marrubium vulgare L. infusion*. Fitoterapia, 2012. 83: p. 286-292.
9. Amri, B., E. Martino, F. Vitulo, F. Corana, L.B. Kaab, M. Rui, D. Rossi, M. Mori, S. Rossi, and S. Collina, *Marrubium vulgare L. Leave Extract: Phytochemical Composition, Antioxidant and Wound Healing Properties*. Molecules, 2017. 22(11).
10. Bouterfas, K., Z. Mehdadi, M. Maliha Elaoufi, L. Aouad, A. Latreche, and W. Benchiha, *In vitro antibacterial activity of flavonoids extracts from three Algerian horehound (Marrubium vulgare L.) leaves*. 2017.
11. Béjaoui, A., I.B. Salem, and A. Boulila, *Chemical Variation and in vitro Antibacterial Properties of Volatiles from Tunisian Marrubium vulgare L.(Lamiaceae)*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2017. 20(5): p. 1244-1253.
12. Tupec, M., V. Hýsková, K. Bělonožníková, J. Hraníček, V. Červený, and H. Ryšlavá, *Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements*. Food Bioscience, 2017. 20: p. 43-50.
13. Haq, F., H. Ahmad, and M. Alam, *Traditional uses of medicinal plants of Nandiar Khuwarr catchment (District Battagram), Pakistan*. Journal of Medicinal Plants Research, 2011. 5(1): p. 39-48.

14. De Souza, M., R. De Jesus, V. Cechinel-Filho, and V. Schlemper, *Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from Marrubium vulgare*. Phytomedicine, 1998. 5(2): p. 103-107.
15. Paula de Oliveira, A., J.R. Santin, M. Lemos, L.C. Klein Júnior, A.G. Couto, C. Meyre da Silva Bittencourt, V.C. Filho, and S. Faloni de Andrade, *Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of Marrubium vulgare L. (Lamiaceae)*. The Journal Of Pharmacy And Pharmacology, 2011. 63(9): p. 1230-1237.
16. De Vincenzi, M., E. Mancini, and M. Dessi, *Monographs on botanical flavouring substances used in foods. Part IV*. Fitoterapia, 1995. 66: p. 203-210.
17. Pukalskas, A., P.R. Venskutonis, S. Salido, P.d. Waard, and T.A. van Beek, *Isolation, identification and activity of natural antioxidants from horehound (Marrubium vulgare L.) cultivated in Lithuania*. Food Chemistry, 2012. 130(3): p. 695-701.
18. Davis, P.H.P.H. and P. Davis, *Flora of Turkey and the East Aegean islands. Vol.7*. 1982: Edinburgh University Press.
19. *Integrated Taxonomic Information System on-line database: Marrubium L*. 25.04.2017].
20. Bakış, Y., M.T. Babaç, and E. Uslu. *Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES)*. in *Health Informatics and Bioinformatics (HIBIT), 2011 6th International Symposium on*. 2011. IEEE.
21. Babaç, M.T., *Possibility of an information system on plants of South-West Asia with particular reference to the Turkish plants data service (TUBIVES)*. Turkish Journal of Botany, 2004. 28(1-2): p. 119-127.
22. *Distribution of the genus Marrubium L.* 26.04.2017]; Available from: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:21001-1#distribution-map>.
23. *GBIF Backbone Taxonomy. Georeferenced data of Marrubium L.* 2016 24.04.2017]; Available from: <http://www.gbif.org/species/2927068>.
24. *Distribution of The Taxon (Marrubium vulgare L.) Over Turkey*. 25.04.2017]; Available from: http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=7624.
25. 8.0, E.P., *European Pharmacopoeia 8.0*. 2014.
26. Henderson, M. and R. McCrindle, *Premarrubiin. A diterpenoid from Marrubium vulgare L.* Journal of the Chemical Society C: Organic, 1969(15): p. 2014-2015.
27. Amer, M., *Constituents of the aerial parts of Marrubium vulgare. L.* J Pharm Sci, 1993. 9(1): p. 92-8.
28. Kowalewski, Z. and I. Matlawska, *Flavonoid compounds in the herb of Marrubium Vulgare L.* Herba Pol, 1979. 24: p. 183-186.
29. Popa, D., G. Pasechnik, and P. Thuc Anh, *Marrubiol—A new diterpenoid from Marrubium vulgare*. Chemistry of Natural Compounds, 1968. 4(6): p. 291-293.
30. Popa, D. and G. Pasechnik, *The structure of vulgarol—A new diterpenoid from Marrubium vulgare*. Chemistry of Natural Compounds, 1975. 11(6): p. 752-756.
31. Nawwar, M.A., A.M. El-Mousallamy, H.H. Barakat, J. Buddrus, and M. Linscheid, *Flavonoid lactates from leaves of Marrubium vulgare*. Phytochemistry, 1989. 28(11): p. 3201-3206.
32. Popa, D. and L. Salei, *Diterpenoids of the genus Marrubium L.* Rastitel'nye resursy, 1973.

33. Sahpaz, S., N. Garbacki, M. Tits, and F. Bailleul, *Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from Marrubium vulgare*. Journal of ethnopharmacology, 2002. 79(3): p. 389-392.
34. Duke, J.A., *Handbook of phytochemical constituent grass, herbs and other economic plants*. 1992: CRC press.
35. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 1992-2016. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases.
36. Said-Al Ahl, H.A., A.S. Gendy, A.A. Mahmoud, and H.F. Mohamed, *Essential Oil Composition of Marrubiumvulgare L. Cultivated in Egypt*. International Journal of Plant Research, 2015. 1(4): p. 138-141.
37. Abadi, A. and A. Hassani, *Essential oil composition and antioxidant activity of Marrubium vulgare L. growing wild in Eastern Algeria*. International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy, 2013. 9(1): p. 17.
38. *Lawrence Review of Natural Products*, Jun-88.
39. Albert T. Leung and S. Foster, *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*, ed. 2. . 1996, New York: John Wiley & Sons.
40. Newall, C.A., L.A. Anderson, and J.D. Phillipson, *Herbal Medicines: A Guide for Health-care Professionals*. 1996: Pharmaceutical Press.
41. Morteza-Semnani, K., M. Saeedi, and E. Babanezhad, *The Essential Oil Composition of Marrubium vulgare L. from Iran*. Journal of Essential Oil Research, 2008. 20(6): p. 488-490.
42. Bisset, N.G., *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. 1994: Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers xvi, 566p. ISBN 3887630254 En Originally published in German (1984).(EBBD, 190000550).
43. Williamson, E.M. and F.J. vans, *Potter's New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations*. 1988, Essex UK: the C. W. Daniel Co., Ltd.
44. ANON. 1948-1976. *The Wealth of India raw materials. Publications and Information Directorate, CSIR, New Delhi. 11 volumes*.
45. *Assessment report on Marrubium vulgare L., herba*. 2013, European Medicines Agency.
46. Blaschek, W., S. Ebel, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, K. Keller, J. Reichling, and V. Schulz, *HagerROM 2006. Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. . 2006, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
47. *Avis aux fabricants. Les médicaments à base de plantes. Avis aux Fabricants concernant les demandes d'autorisation de mise sur le marché, Agence du Médicament, Paris 1998, 50 + 58*.
48. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T et al., editors. *The Complete German Commission E Monographs. Horehound herb*. American Botanical Council, Austin Texas 1998, 148.
49. *Indikationsliste § 109a AMG; 23.12.2005, Nr. 129, 793 und 1070*.
50. BHP (British Herbal Pharmacopoeia). *Marrubium*. British Herbal Medicine Association, Cowling 1976, 139-139a.
51. BHP (British Herbal Pharmacopoeia). *Marrubium*. British Herbal Medicine Association, Bournemouth 1983, 137-138.
52. BHP (British Herbal Pharmacopoeia). *White Horehound-Marrubii herba*. British Herbal Medicine Association, Bournemouth 1996, 180-181.

53. BHP (British Herbal Pharmacopoeia). *White Horehound-Marrubii herba*. British Herbal Medicine Association, Bournemouth 1990, 84-85.
54. British Pharmaceutical Codex. *Marrubium, Infusum Marrubii, Concentratum und Syrupus Marrubii*. The Pharmaceutical Press, London 1934, 632, 1277, 1446.
55. DAC (Deutscher Arzneimittel-Codex). *Andornkraut*, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart 1995.
56. DAC (Deutscher Arzneimittel-Codex). *Andornkraut*, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart 1997.
57. DAC (Deutscher Arzneimittel-Codex). *Andornkraut*, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart 2003.
58. Österreichisches Arzneibuch (ÖAB) - Pharmacopoeia Austriaca. 9th ed. *Herba Marrubii - Andornkraut*. Österreichische Staatsdruckerei, Wien 1960, Vol 1: 815-816.
59. Österreichisches Arzneibuch (ÖAB) - Pharmacopoeia Austriaca. *Herba Marrubii - Andornkraut*. Österreichische Staatsdruckerei, Wien 1981, 606-607.
60. Österreichisches Arzneibuch (ÖAB) - Pharmacopoeia Austriaca. *Herba Marrubii - Andornkraut*. Österreichische Staatsdruckerei, Wien 1990, Vol 2: A-J.
61. Schlemper, V., A. Ribas, M. Nicolau, and V. Cechinel Filho, *Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of Marrubium vulgare on isolated tissues*. Phytomedicine, 1996. 3(2): p. 211-216.
62. Kanyonga, P., M. Faouzi, B. Meddah, M. Mpona, E. Essassi, and Y. Cherrah, *Assessment of methanolic extract of Marrubium vulgare for antiinflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities*. J Chem Pharm Res, 2011. 3(1): p. 199-204.
63. Paula de Oliveira, A., J.R. Santin, M. Lemos, L.C. Klein Júnior, A.G. Couto, C. Meyre da Silva Bittencourt, and S. Faloni de Andrade, *Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of Marrubium vulgare L.(Lamiaceae)*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011. 63(9): p. 1230-1237.
64. Diaz R., Quevedo-Sarmiento J., Ramos-Cormenzana A., Cabo P., and C. J., *Phytochemical and antibacterial screening of some species of Spanish Lamiaceae*. Fitoterapia, 1988(59): p. 330-333.
65. Keles, O., T. Bakirel, S. Ak, and A. Alpmar, *The antibacterial activity of some plants used for medicinal purposes against pathogens of veterinary importance*. Folia veterinaria, 2001. 45(1): p. 26-31.
66. Al-Bakri, A.G. and F.U. Afifi, *Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration*. Journal of Microbiological Methods, 2007. 68(1): p. 19-25.
67. Kunduhoglu, B., S. Pilatin, and F. Caliskan, *Antimicrobial screening of some medicinal plants collected from Eskisehir, Turkey*. Fresenius Environmental Bulletin, 2011. 20(4): p. 945-952.
68. Ramos-Guerra, M., B. Mata-Cárdenas, J. Vargas-Villarreal, A. Sampayo-Reyes, F. González-Salazar, M. Morales-Vallarta, and S. Said-Fernández, *In vitro activity of organic leaf/stem extracts from Marrubium vulgare and Mentha spicata against Entamoeba histolytica and Giardia lamblia*. Pharmacol Pharm, 2007. 1: p. 108-112.
69. Robles-Zepeda, R.E., C.A. Velázquez-Contreras, A. Garibay-Escobar, J.C. Gálvez-Ruiz, and E. Ruiz-Bustos, *Antimicrobial activity of Northwestern*

- Mexican plants against Helicobacter pylori*. Journal of Medicinal Food, 2011. 14(10): p. 1280-1283.
70. F, K.-R., D. Z, G. L, D. I, M.-D. H, B. C, and H.-P. Y, *Chemical Characterization and Antibacterial Activity of Phases Obtained from Extracts of Artemisia herba alba, Marrubium vulgare and Pinus pinaster*. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 2015. 7(2): p. 270-274.
 71. Aligiannis, N., E. Kalpoutzakis, S. Mitaku, and I.B. Chinou, *Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species*. Journal of agricultural and food chemistry, 2001. 49(9): p. 4168-4170.
 72. Quave, C. and M. Smeltzer, *Anti-Biofilm Activity of Marrubium vulgare L. (Lamiaceae) Extract on MRSA*. Vol. 75. 2009.
 73. Roman, R.R., F. Alarcon-Aguilar, A. Lara-Lemus, and J. Flores-Saenz, *Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics*. Archives of medical research, 1991. 23(1): p. 59-64.
 74. Novaes, A.P., C. Rossi, C. Poffo, E. Pretti Junior, A.E. Oliveira, V. Schlemper, R. Niero, V. Cechinel-Filho, and C. Burger, *Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants*. Therapie, 2001. 56(4): p. 427-30.
 75. Ihcen, K., B. Hadjer, D. Amar, B. Abir, B. Noussiba, and Y. Mohamed, *α -Glucosidase Inhibitory Effect and Antioxidant Activity of the Extracts of Eighteen Plant Traditionally Used in Algeria for Diabetes*. Current Enzyme Inhibition, 2017. 13(1): p. 67-78.
 76. VanderJagt, T.J., R. Ghattas, D.J. VanderJagt, M. Crossey, and R.H. Glew, *Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico*. Life Sci, 2002. 70(9): p. 1035-40.
 77. Berrougui, H., M. Isabelle, M. Cherki, and A. Khalil, *Marrubium vulgare extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage*. Life Sci, 2006. 80(2): p. 105-112.
 78. Yamaguchi, K., J.L. Liggett, N.-C. Kim, and S.J. Baek, *Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells*. Oncology reports, 2006. 15(1): p. 275-282.
 79. Paunovic, V., M. Kotic, S. Djordjevic, A. Zugic, N. Djalina, U. Gasic, V. Trajkovic, and J. Harhaji-Trajkovic, *Marrubium vulgare ethanolic extract induces proliferation block, apoptosis, and cytoprotective autophagy in cancer cells in vitro*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2016. 62(11): p. 108-114.
 80. Krejčí, I. and R. Zadina, *Die gallentreibende Wirkung von Marrubiin und Marrubiinsäure*. Planta Medica, 1959. 7(01): p. 1-7.
 81. Stulzer, H.K., M.P. Tagliari, J.A. Zampirolo, V. Cechinel-Filho, and V. Schlemper, *Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from Marrubium vulgare*. Journal of ethnopharmacology, 2006. 108(3): p. 379-384.
 82. De Jesus, R.A.P., V. Cechinel-Filho, A.E. Oliveira, and V. Schlemper, *Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from Marrubium vulgare*. Phytomedicine, 2000. 7(2): p. 111-115.
 83. El Bardai, S., M. Wibo, M.C. Hamaide, B. Lyoussi, J. Quetin-Leclercq, and N. Morel, *Characterisation of marrubenol, a diterpene extracted from Marrubium vulgare, as an L-type calcium channel blocker*. British journal of pharmacology, 2003. 140(7): p. 1211-1216.

84. Martin-Nizard, F., S. Sahpaz, C. Furman, J.-C. Fruchart, P. Duriez, and F. Bailleul, *Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity*. *Planta Medica*, 2003. 69(03): p. 207-211.
85. Martin-Nizard, F., S. Sahpaz, A. Kandoussi, M. Carpentier, J.C. Fruchart, P. Duriez, and F. Bailleul, *Natural phenylpropanoids inhibit lipoprotein-induced endothelin-1 secretion by endothelial cells*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2004. 56(12): p. 1607-1611.
86. Jaouhari, J.T., H.B. Lazrek, and M. Jana, *Acute toxicity of 10 Moroccan plants reported to be hypoglycemic agents*. *Therapie*, 1999. 54(6): p. 701-6.
87. Kchouk, M. and A. Chadli, *On the abortive properties of White Horehound (Marrubium vulgare L.)*. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 1963. 40: p. 129-132.
88. Aouni, R., M. Ben Attia, M.H. Jaafoura, A. Bibi-Derbel, and M. Haouari, *Effects of the hydro-ethanolic extract of Marrubium vulgare in female rats*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2017. 10: p. 160-164.
89. Herrera-Arellano, A., L. Aguilar-Santamaria, B. Garcia-Hernandez, P. Nicasio-Torres, and J. Tortoriello, *Clinical trial of Cecropia obtusifolia and Marrubium vulgare leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics*. *Phytomedicine*, 2004. 11(7): p. 561-566.
90. *EB 6 (Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch) 6th ed. Herba Marrubii – Andornkraut*. *Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart* 1953, 261.
91. *Wichtl M. Teedrogen – Ein Handbuch für Apotheker und Ärzte. Andornkraut. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart* 1984, 48-49.
92. *Wichtl M. Teedrogen und Phytopharmaka - Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Marrubii herba - Andornkraut. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart* 1997, 370-371.
93. *Wichtl M. Teedrogen und Phytopharmaka - Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Marrubii herba - Andornkraut. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart* 2002, 364-365.
94. Schilcher, H., S. Kammerer, and T. Wegener, *Pflanzenprofile, in Leitfaden Phytotherapie (Third Edition)*. 2007, Urban & Fischer: Munich. p. 39.
95. Demirci, B., H.S. Yusufoglu, N. Tabanca, H.E. Temel, U.R. Bernier, N.M. Agramonte, S.I. Alqasoumi, A.J. Al-Rehaily, K.H.C. Başer, and F. Demirci, *Rhanterium epapposum Oliv. essential oil: Chemical composition and antimicrobial, insect-repellent and anticholinesterase activities*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017. 25(5): p. 703-708.
96. Göger, G., B. Demirci, S. Ilgın, and F. Demirci, *Antimicrobial and toxicity profiles evaluation of the Chamomile (Matricaria recutita L.) essential oil combination with standard antimicrobial agents*. *Industrial Crops and Products*, 2018. 120: p. 279-285.
97. CLSI, *M02-A11 Reference Method for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*. 2012, Clinical and Laboratory Standards Institute.
98. CLSI, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition*. 2002, Clinical and Laboratory Standards Institute.
99. CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 27th ed*. 2017, Clinical and Laboratory Standards Institute.

100. Kumarasamy, Y., M.E. Fergusson, L. Nahar, and S.D. Sarker, *Bioactivity of moschamindole from Centaurea moschata*. Pharmaceutical Biology, 2002. 40(4): p. 307-310.
101. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free radical biology and medicine, 1999. 26(9-10): p. 1231-1237.
102. Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. Nature, 1958. 181(4617): p. 1199.

http-1 <http://www.freenatureimages.eu/Plants/Flora%20J-N/Marrubium%20vulgare%2C%20White%20Horehound/index.html>

(Erişim tarihi: 21.07.2019)

http-2 <https://www.ricola.com/en/experience/herbs/horehound>

(Erişim tarihi: 21.07.2019)