

Piyasada Satışa Sunulan *Aloysia citriodora* Palau Örneklerinin Antioksidan Kapasite ve Mikrobiyolojik Kontaminasyon Yönünden İncelenmesi[§]

Ayşegül KÖROĞLU*, Nurten ALTANLAR**, Gülsen KENDİR*, Duygu ŞİMŞEK**

*Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

**Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Ülkemizin farklı illerindeki aktarlardan satın alınan “yalancı melisa, limon kokulu oğulotu” adı ile bilinen *Aloysia citriodora* Palau bitki numunelerinin antioksidan kapasitele-
rinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç kapsamında örnek-
lerin taşıdığı toplam fenolik madde miktarı hesaplanmıştır. Aynı zamanda piyasada satılan örneklerin halk sağlığına
uygunluğu mikrobiyolojik kontaminasyon açısından değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, dört farklı ilden 11 farklı örnek satın alınmıştır. Ayrıca çalışmada standart numune olarak kullanılmak üzere Yalova’ dan örnekler temin edilmiş ve uygun şartlar-
da kurutulmuştur. Bitki örneklerinin antioksidan kapasitesi iki farklı yöntemle çalışılmıştır: 1. Serbest radikal süpürme kapasitesi tayini için kalitatif ve kantitatif DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi, 2. Lipozom lipid peroksidasyonunu tayin etmek için TBA (Tiyobarbitürik asit) yöntemi. Ayrıca içerdikleri toplam fenoller gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Örneklerde mikrobiyolojik kontaminasyon olup olmadığı ise Avrupa Farmakopesine göre belirlenmiştir.

Bulgular: Numunelerde, total fenol içeriği gallik asit eşdeğerliğinde 213-483.56 mg/g kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir. Kalitatif DPPH• yönteminde standart numune belirgin süpürme kapasitesine sahipken, kantitatif DPPH• yönteminde ise propil gallata göre daha düşük kapasite göstermiştir. TBA yönteminde ise İstanbul piyasasından satın alınan 11 lokalitesinde en yüksek lipid peroksidan kapasite saptanmıştır. İncelenen örneklerde patojen mikroorganizma üremesi görülmemiştir, ancak Avrupa Farmakopesinin verdiği sınırlar üzerinde mikroorganizma sayısı saptanmıştır.

Sonuç: Piyasada satılan drogların total fenol içeriği ve antioksidan kapasiteleri farklılık göstermektedir. Avrupa Farmakopesi’ nin kabul ettiği sınırlar üzerinde mikroorganizma varlığı, piyasada satılan limon kokulu oğulotu örneklerinin insan sağlığında kullanılması için uygun olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada, çeşitli illerimizde satılan *Aloysia citriodora* örneklerinin mikrobiyolojik kontaminasyon açısından Avrupa Farmakopesi’ ne uygunluğu ilk defa değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Aloysia citriodora* Palau (syn. *Lippia citriodora* Kunth.), mikrobiyolojik kontaminasyon, total fenol miktarı, antioksidan kapasite

SUMMARY

Investigation of *Aloysia citriodora* Palau Samples in the Market in Terms of Antioxidant Capacity and Microbiological Contamination

Objective: The antioxidant capacity of *Aloysia citriodora* Palau samples also known as “fake balm, lemon scented melissa, lemon balm”, purchased from herbalists in different provinces of our country was aimed to be determined. In this context, total amount of phenolic compounds of the samples were calculated. Additionally, compliance of the samples sold in the market, to the public health was evaluated in terms of microbiological contamination.

Material and Method: In this study, 11 different samples were purchased from four different provinces. Besides standard samples were obtained from Yalova and were dried under suitable conditions. Antioxidant capacity of the samples was examined by two different methods: 1. Qualitative and quantitative DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method for determination of free radical scavenging capacity, 2. TBA (thiobarbituric acid) method for the determination of liposome lipid peroxidation. Total phenol content of the samples was also determined as gallic acid equivalent by using Folin-Ciocalteu method. Microbiological contamination of the samples was examined according to the European Pharmacopoeia.

Results: Total phenol content in the samples was determined as gallic acid equivalence of 213-483.56 mg/g dry weight. In qualitative DPPH• method, standard sample showed significant free radical-scavenging capacity, while in quantitative DPPH• method, this sample showed lower capacity than propyl gallate. In the TBA method, highest lipid peroxidation capacity was determined for the samples purchased from Istanbul market (11). In the studied samples, the growth of pathogenic microorganisms was not observed. However, number of microorganisms have been found to be higher than the limits provided in the European Pharmacopoeia.

Conclusion: Total phenolic content and antioxidant capacity of the drugs sold on the market vary. The samples of lemon balm purchased in the market were found unsuitable for use on human health because of the presence of microorganisms above the limits accepted by European Pharmacopoeia. In this study the compliance to European Pharmacopoeia of *Aloysia citriodora* Palau samples sold in our various provinces in terms of microbiological contamination was assessed for the first time.

Key words: *Aloysia citriodora* Palau (syn. *Lippia citriodora* Kunth.), microbiological contamination, total phenol contents, antioxidant capacity

Alındığı tarih: 01.03.2016

Kabul tarihi: 25.05.2016

Yazışma adresi: Gülsen Kendir, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Tandoğan 06100 Ankara

e-posta: kendir80@hotmail.com

[§] Bu araştırma İVEK Uluslar arası İlaç ve Eczacılık Kongresi (27-29 Kasım 2015, İstanbul)’nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Aloysia citriodora Palau [syn. *Aloysia triphylla* (L'Her.) Kuntze; *Verbena triphylla* L'Her.; *Lippia citriodora* Kunth.] *Verbenaceae* familyasında, kışın yapraklarını döken, özellikle baharat ve tıbbi amaçlı kullanımı olan bir ağaççıktır. Ülkemizde “yalancı melisa veya limon kokulu oğulotu” adıyla tanınır ve sıcak bölgelerimizde süs bitkisi olarak yetiştirilir. Drog olarak kullanılan kısımları yapraklarıdır ve Avrupa Farmakopesinde “Lemon verbena leaf; *Verbenae citriodorateae folium*” adıyla kayıtlıdır. Yapraklar karakteristik limon kokulu, basit, lanseolat, pennat damarlı, sekonder damarlar birbirine paralel ve kısa saplıdır. Drog çay şeklinde tüketilmekle beraber, endüstriyel alanda limon kokusu nedeniyle aromatik amaçlı kullanıma da sahiptir. Bitkinin yapraklarından sindirimi düzenleyici, spazm giderici, ateş düşürücü, yatıştırıcı ve midevi özellikleri nedeniyle halk tıbbında geleneksel olarak yararlanır. Ülkemizde ise iştah açıcı, yatıştırıcı olarak ve şeker hastalığına karşı infüzyon şeklinde tüketilmektedir⁽¹⁻³⁾. Ayrıca Fas'ta yaprakları hipertansiyon tedavisinde⁽⁴⁾, Yunanistan'da ise diyabet, kabızlık, dispepsi, safra bozuklukları, bağırsak hastalıkları, obezite, soğuk algınlığı, böbrek taşları ve menstruasyon bozuklukları gibi rahatsızlıkların giderilmesinde kullanılmaktadır⁽⁵⁾.

Bitkide fenolik bileşikler, özellikle fenolik asit⁽⁶⁾, flavonoid⁽⁶⁻¹³⁾, fenilpropanoid^(8,10,12) varlığı belirlenmiştir. Ayrıca iridoit yapısında bileşikler de izole edilmiştir^(10,12). Bitkininin çeşitli kısımları üzerinde de uçucu yağ analizi çalışmaları yapılmıştır^(8,13-23). Bitki özellikle *in vitro* olarak antioksidan kapasite^(10,16,24-28), antimikrobiyal^(16,25,29), sitotoksik^(25,26) ve antispazmodik^(30,31) etkileri açısından incelenmiştir. *In vivo* çalışmalar ise antiinflamatuvar^(6,30), gastroprotektif⁽³²⁾, antinositif⁽¹¹⁾, antipiretik, analjezik ve antioksidan kapasite⁽⁶⁾ üzerinde yoğunlaşmıştır. Bitkiden elde edilen uçucu yağın ise antioksidan^(17,33),

antimikrobiyal^(21,22,34), antiviral⁽³⁵⁾, sitotoksik⁽³⁶⁾ ve insektisidal etkilere^(19,20) sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Avrupa Farmakopesinde kayıtlı olan ülkemiz piyasasında satışa sunulan, daha çok çay şeklinde tüketilen ve özellikle “yalancı melisa veya limon kokulu oğulotu” adıyla bilinmesine rağmen piyasada “melisa, oğulotu veya limon kokulu oğulotu” adıyla satılan *Aloysia citriodora* bitkisinin yaprakları, antioksidan kapasite açısından incelenmiştir. Bu amaçla, ülkemizde farklı illerdeki aktarlarda her üç yerel isimle satılan örnekler satın alınmış, toplam fenolik madde miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca, genellikle infüzyon şeklinde tüketilen limon kokulu oğulotu örneklerinin, insan sağlığını tehdit eder nitelikte mikroorganizma taşıyıp taşımadığı Avrupa Farmakopesi 2011'e göre değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

İncelemeye alınan örnekler

Ülkemizin dört farklı ilinden aktarlarda “yalancı melisa veya limon kokulu oğulotu” adı ile tanınan 11 farklı örnek, Temmuz-2013 tarihinde satın alınmıştır. Ayrıca çalışmada standart numune olarak kullanılmak üzere de Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden canlı örnekler temin edilmiş, oda sıcaklığında ve gölgede kurutulmuş ve herbaryum örneği hazırlanmıştır. Standart bitki örneği Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumunda saklanmaktadır (AEF 26752). Bitki Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bölümünde görevli Biyolog Yalçın Kaya ve Dr. Gülsen Kendir tarafından tayin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bitki (drog) örneklerinin elde edildiği iller ve bu illerden satın alınan örneklerin kodları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. *Aloysia citriodora* örneklerinin temin edildiği yerler, kodları ve standart örnek bilgileri.

| Lokasyon | <i>Aloysia citriodora</i> örnekleri |
|--|-------------------------------------|
| Ankara | A1 A2 A3 A4 A5 |
| Hatay | H1 |
| İstanbul | İ1 İ2 İ3 |
| Kayseri | K1 K2 |
| Standart (Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yalova) (AEF 26752) | S |

Mikrobiyolojik Kontaminasyon Analizi

Mikrobiyal kontaminasyon çalışmaları, Plate Count Agar (PCA) yöntemi ile yapıldı. Kuru drog örneklerinden aseptik şartlarda 1 g alınarak 9 mL steril serum fizyolojik içeren tüplere aktarılıp 1 dk. süreyle karıştırıldı. Daha sonra örneklerin 10^{-3} 'e kadar seri dilüsyonları hazırlanıp total canlı aerobik bakteri sayısını belirlemek için dilüsyonlardan 0.1'er mL alınarak, Tryptic Soy Agar (Difco, ABD) üzerine yayıldı. Aynı prosedür, total fungus sayısını belirlemek için Sabauroud Dextrose Agar'a (Difco, ABD) uygulandı. Patojen mikroorganizmalar için ise dilüsyon yapmadan önce numunelerden Mac Concey Agar ve Eosin Methylen Blue Agar (EMB)'a ekim yapıldı. Bu işlemler iki kez yineleni. Plaklar bakteriler için 30°C'de 3 gün süreyle, maya ve küfler için ise 25°C'de 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakıldı⁽³⁷⁾.

İnkübasyon sonrası her plakta üreyen koloniler sayıldı. Örneklerde mL'deki total aerob bakteri ve küf sayısı hesaplandı. Koloni sayısı CFU/mL olarak kaydedildi. Sonuçların değerlendirilmesi Avrupa Farmakopesi 2011, 7.0.5.1.4'e göre yapıldı⁽³⁸⁾.

Ekstrelerin Hazırlanması

Bitki numuneleri toz edilerek, 10'ar g tartıldı ve üzerlerine 250 mL metanol eklenerek Soxhlet cihazı'nda 8 saat klasik yöntemle ekstre edildi. Metanol 40°C'ye ayarlanmış rotavaporda uçuruldu. Elde edilen ekstre verimleri Tablo 2'de verildi. Hazırlanan bu ekstreler üzerinde toplam fenolik madde miktar tayini ve in vitro antioksidan kapasite çalışmaları yürütüldü.

Tablo 2. *Aloysia citriodora* aktar örneklerinden ve standart numuneden hazırlanan ekstrelerin % verimleri.

| Numune | % Verim |
|--------|---------|
| A1 | 17.15 |
| A2 | 20.04 |
| A3 | 16.39 |
| A4 | 16.82 |
| A5 | 15.28 |
| H1 | 17.67 |
| İ1 | 9.62 |
| İ2 | 21.28 |
| İ3 | 17.02 |
| K1 | 28.20 |
| K2 | 16.13 |
| S | 14.05 |

Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Metanollü ekstrelerin taşıdığı toplam fenolik madde miktarları, gallik asite eşdeğer olacak şekilde Folin-Ciocalteu yöntemi⁽³⁹⁾ kullanılarak, kolorimetrik olarak tayin edildi. Konsantrasyonu 2 mg/mL olan ekstrelerden, 20 µL numune deney tüpüne alındı, üzerine 1580 µL distile su, 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilip vorteks ile iyice karıştırıldı. 30 sn-8 dk. arasında bekletilerek üzerine 300 µL % 20'lik Na₂CO₃ (Merck) solüsyonu eklenip, tekrar karıştırma işlemi uygulandı ve 40°C'de 30 dk. su banyosunda bekletildikten sonra çözeltilerin absorbans değerleri, spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800) 765 nm'de okundu.

Antioksidan Kapasite

Antioksidan kapasite iki farklı in vitro yöntemle çalışıldı.

Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi

Kalitatif DPPH• Yöntemi

10 mg/mL hazırlanan ekstreler ve 1 mg/mL hazırlanan pozitif kontrol olarak kullanılan propil gallat, Wiretrol II mikropipetler ile 3 µL miktarda İTK plaklarına (MERCK 5554) uygulandı. Oluşan lekeler üzerine DPPH•'in etanol içindeki % 0.2'lik çözeltisi püskürtülerek 20°C'de 30 dk. bekletildi. Bu süre sonunda efla-tun renkli zemin üzerinde oluşan sarı renkli lekeler gözlemlendi⁽⁴⁰⁾.

Kantitatif DPPH• Testi

Yedi değişik konsantrasyonda hazırlanan (10-0.15625 mg/ mL) her bir ekstreten, 0.1 mL numune tüp içine alınarak, üzerlerine 2.9 mL 10⁻⁴ M DPPH• ilave edildi, daha sonra 30°C'lik su banyosunda, 30 dk. bekletildi. Süre sonunda spektrofotometre de 517 nm'de (Shimadzu UV-1800) ölçümleri yapıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan propil gallat, 1 mg/mL ile 6.4x10⁻⁵ mg/mL aralığında değişen yedi konsantrasyonda denendi. Her bir ekstre için ayrı ayrı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile konsantrasyon verilerinden, lineer regresyon analizi kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı⁽⁴¹⁾.

Lipozom Lipit Peroksidasyonu

Tiyobarbitürik Asit (TBA) Testi

Yedi değişik konsantrasyonda hazırlanan (10-0.15625 mg/mL) her bir drog ekstresi üzerine, 0.05 mg/mL beyin ekstresi (Sigma B3635) eklenerek 5 mg/mL fosfat tamponlu ortamda test edildi. Örneklerin peroksidasyonu, 0.1 mL FeCl₃ (1 mM, Sigma F1513) ve 0.1 mL askorbik asit (1 mM, Aldrich 255564) ilavesi ile 37°C'de 20 dk. inkübe edilerek sağlandı. İnkübasyon sonrası karışıma 0.1 mL %2'lik BHT (bütil hidroksi toluen, Sigma B1378), 0.5 mL of %1'lik TBA

(Sigma-Aldrich T5500) ve 0.5 mL %25'lik HCl eklendi. Karışım 85°C'de, 30 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası ise karışım soğutulmuş olarak üzerine 2.5 mL *n*-butanol ilave edildi. Karışım santrifüj edilerek renkli *n*-butanol tabakasının absorbans değerleri spektrofotometre de 532 nm'de okundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan propil gallat da, 1 mg/mL ile 6.4x10⁻⁵ mg/mL aralığında yedi farklı konsantrasyonda test edildi. Her bir ekstre için ayrı ayrı hesaplanan % inhibisyon ve konsantrasyon değerlerinden, lineer regresyon analizi ile IC₅₀ değerleri hesaplandı⁽⁴⁰⁾.

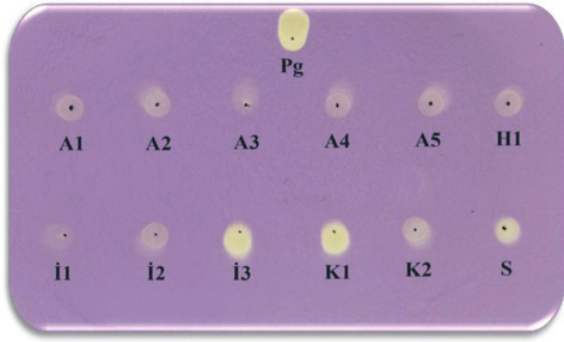
BULGULAR

Ankara'dan 5, Hatay'dan 1, İstanbul'dan 3 ve Kayseri'den 2 örnek olmak üzere 4 ayrı ilden 11 farklı aktardan satın alınan *Aloysia citriodora* örnekleri, mikrobiyolojik kontaminasyon açısından Avrupa Farmakopesi 2011'e göre değerlendirilmiştir (Tablo 3). Total fenol içeriği incelenen örneklerde gallik asit eşdeğerliğinde 213±13.85-483.56±31.62 mg/g kuru ağırlık olarak saptanmıştır. Total fenolik madde miktarı sonuçları Tablo 4'te verilmiştir. Kalitatif DPPH• yönteminde standart numuneyle birlikte Kayseri'den alınan K1 lokalitesi ile İstanbul'dan alınan İ3 lokalitesinde belirgin aktivite gözlenmiştir (Şekil 1). Kantitatif DPPH• yöntemi sonuçlarına göre

Tablo 3. *Aloysia citriodora* örneklerindeki toplam mikroorganizma sayısı.

| Numune | Toplama aerobik bakteri sayısı (CFU/g) | Toplam maya/küf sayısı (CFU/g) |
|--------|--|--------------------------------|
| A1 | 72 x 10 ² | 12 x 10 ² |
| A2 | 2 x 10 ² | 46 x 10 ² |
| A3 | 39 x 10 ² | 8 x 10 ² |
| A4 | - | - |
| A5 | - | - |
| H1 | 222 x 10 ² | 1 x 10 ² |
| İ1 | 2,6 x 10 ² | 1 x 10 ² |
| İ2 | 87 x 10 ² | 2x 10 ² |
| İ3 | 33 x 10 ² | - |
| K1 | 3 x 10 ² | - |
| K2 | 17 x 10 ² | - |
| S | - | - |

*CFU: Koloni oluşturan birim



Şekil 1. *Aloysia citriodora* örneklerinin kalitatif DPPH• bulguları. Pg; Propil gallat

pozitif kontrol olarak kullanılan propil gallat ($0.004 \mu\text{g/mL}$) ile karşılaştırıldığı zaman örneklerde ($0.027 - 0.039 \mu\text{g/mL}$) ve standart numune olarak kullanılan Yalova bitki örneğinde ($0.052 \mu\text{g/mL}$) orta derecede bir antioksidan kapasite gözlenmiştir (Tablo 5). TBA yönteminde İstanbul piyasasından satın alınan örneklerin belirgin ($36.22 \pm 10.30 - 303.98 \pm 7.57 \mu\text{g/mL}$) antilipitperoksidaz kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6). İncelenen örneklerde patojen mikroorganizma üremesi görülmedi, ancak A4 ve A5 örneği dışında bütün piyasa ürünlerinde, Avrupa Farmakopesinin verdiği sınırlar üzerinde mikroorganizma sayısı belirlenmiştir. Standart örnek olarak kullanılan Yalova örneğinde hiçbir mikroorganizmanın üremediği tespit edilmiştir.

Tablo 4. *Aloysia citriodora* aktar örneklerinden ve standart numuneden hazırlanan ekstrelerin total fenolik madde miktarları.

| Numune | Total Fenolik Madde Miktarı ($\text{mg}_{\text{gallik asit}} / \text{g}_{\text{ekstre}} \pm \text{SH}^*$) |
|--------|--|
| A1 | 377.72 ± 46.31 |
| A2 | 353.28 ± 44.67 |
| A3 | 298.56 ± 12.44 |
| A4 | 213.00 ± 13.85 |
| A5 | 274.94 ± 13.77 |
| H1 | 251.61 ± 32.75 |
| İ1 | 367.17 ± 29.79 |
| İ2 | 398.83 ± 83.36 |
| İ3 | 417.17 ± 14.24 |
| K1 | 483.56 ± 31.62 |
| K2 | 428.00 ± 15.19 |
| S | 246.61 ± 17.17 |

* SH: Standart hata

Tablo 5. *Aloysia citriodora* örneklerinden hazırlanan ekstrelerin kantitatif DPPH• radikal temizleme kapasite değerleri.

| Numune | IC ₅₀ değeri ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------|--|
| A1 | 0.030 |
| A2 | 0.029 |
| A3 | 0.030 |
| A4 | 0.032 |
| A5 | 0.027 |
| H1 | 0.037 |
| İ1 | 0.039 |
| İ2 | 0.028 |
| İ3 | 0.033 |
| K1 | 0.029 |
| K2 | 0.032 |
| S | 0.052 |
| Propil gallat | 0.004 |

Tablo 6. *Aloysia citriodora* örneklerinden hazırlanan ekstrelerin tiyobarbitürik asit yöntemi ile elde edilen antioksidan kapasite değerleri.

| Numune | IC ₅₀ değeri ($\mu\text{g/mL}$) \pm SH* |
|---------------|--|
| A1 | 500> |
| A2 | - |
| A3 | 500> |
| A4 | - |
| A5 | 212.54 ± 8.68 |
| H1 | 500> |
| İ1 | 36.22 ± 10.30 |
| İ2 | 96.62 ± 7.66 |
| İ3 | 303.98 ± 7.57 |
| K1 | - |
| K2 | 500> |
| S | 500> |
| Propil gallat | 3.39 ± 1.96 |

* SH: Standart hata

TARTIŞMA

Çalışma genellikle paketlenmiş hâlde, bazen açık şekilde, çuval içinde ve Türkçe “yalancı melisa veya limon kokulu oğulotu” adıyla satılan piyasa örnekleri üzerinde yürütülmüştür. Paket hâlinde satışa sunulan drog örneklerinin hepsinde Türkçe “melisa” ya da “oğulotu”; Latince ise “*Melissa officinalis*” bilimsel adı yazılıdır. Farklı familyalarda yer alan ve ülkemiz florasında doğal olarak yetişen gerçek melisa *M. officinalis* (Lamiaceae, Labiatae) yerine Şili'nin yerli bitkisi olan ancak ülkemizde süs amaçlı kültürü yapılan yalancı melisa *Aloysia citriodora* (Verbenaceae) bitkisinin satıldığı,

daha önce yaptığımız çalışmada da belirlenmiş ve tartışılmıştır. *A. citriodora* bileşiminde bulunan sekonder metabolitler açısından *Melissa officinalis*'ten farklı içeriğe sahiptir. Doğal olarak gerçek melisa (oğulotu)'dan beklenen farmakolojik (antiviral etki yanında, gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında karminatif ve spazmolitik etkileri ile uykusuzluk, huzursuzluk ve gerginlikte sedatif) etkilere sahip değildir⁽⁴²⁾. *Aloysia citriodora* yalnızca kokusu nedeniyle melisaya benzemekte ve bu nedenle tercih edilmektedir. Bitki yukarıda da değinildiği gibi kendisine özgü kimyasal bileşime ve farmakolojik etkilere sahiptir.

Genelde İstanbul ve Kayseri'den alınan örneklerde yüksek total fenolik madde içeriği belirlenmiştir. En yüksek total fenolik madde içeriği K1 lokalitesinde ($483.56 \pm 31.62 \text{ mg}_{\text{gallik asit}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$) belirlenirken, en düşük seviye ise A4 lokalitesinde ($213 \pm 13.85 \text{ mg}_{\text{gallik asit}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$) saptanmıştır. Standart numunede diğer örneklerle göre düşük fenolik madde içeriği ($246.61 \pm 17.17 \text{ mg}_{\text{gallik asit}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$) gözlenmiştir. Ankara ve Kayseriden alınan örnekler kantitatif DPPH yöntemine göre belirgin antioksidan kapasite sergilemiştir. Kalitatif DPPH yönteminde eflatun zemin üzerinde parlak sarı lekeler İ3, K1 ve standart numunede propil gallatla eşit değerde görülmüştür. K1 lokalitesinde total fenolik madde miktarı, kalitatif ve kantitatif DPPH yöntemleri arasında bir paralellik saptanmıştır. TBA yöntemine göre en yüksek antioksidan kapasite İ1 lokalitesinde belirlenirken, A2, A4 ve K1 lokalitelerinde antioksidan kapasite saptanamamıştır. Özellikle İstanbul piyasasından satın alınan örneklerde total fenolik madde içeriği ile kantitatif DPPH ve TBA deneyinden elde edilen sonuçlar arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir.

Daha önce yayınlanmış antioksidan kapasite çalışmalarını incelediğimiz zaman, yapraklardan hazırlanan infüzyon kantitatif DPPH yönteminde yüksek kapasite sergilerken⁽¹⁰⁾, yapraklardan

elde edilen uçucu yağ ise orta derecede kapasite göstermiştir⁽¹⁶⁾. İnfüzyonunun süperoksit radikallerine karşı güçlü, hidroksil radikali ve hipokloröz asite karşı orta derece süpürücü kapasiteye sahip olduğu belirtilmiştir⁽²⁴⁾. Yapraklarından hazırlanan dekoksasyon etkin radikal süpürücü kapasite göstermezken, metanol ekstresi yüksek konsantrasyonda ($1000 \mu\text{g/mL}$) aktif bulunmuştur⁽²⁵⁾. Yapılan in vitro antioksidan aktivite deneylerinde [TRAP (Toplam peroksil radikal yakalama antioksidan parametresi), ABTS (2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) ve DPPH] dekoksasyonu, infüzyonuna göre daha yüksek kapasite göstermiş ve yüksek total fenol içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir⁽²⁶⁾. Yapraklarından aseton, etanol, metanol ve su ile hazırlanan ekstrelerin total fenol içeriği belirlenmiş, Fe (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç, DPPH radikalini süpürücü kapasite, toplam antioksidan kapasite deneyleri yapılmıştır. En yüksek total fenol içeriği ve buna paralel olarak da en yüksek antioksidan kapasite metanol ekstresinde belirlenmiştir⁽²⁷⁾. Yapraklarından metanol:su (80:20) karışımıyla farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstreler hazırlanmış ve dekoksasyonu elde edilmiştir. Total fenol içeriği belirlenerek, DPPH ve ABTS radikallerine karşı süpürücü etkileri değerlendirilmiştir. Dekoksasyonunda daha düşük total fenol içeriği ve antioksidan kapasite saptanmıştır⁽²⁸⁾. Bu sonuçlarda da görüldüğü gibi antioksidan kapasite su ve metanol ile hazırlanan ekstrelerde, hatta infüzyon ve dekoksasyon şeklinde hazırlama yöntemlerinde bile değişiklik göstermektedir. Genel olarak droğun radikal süpürme kapasitesine sahip olduğu elde ettiğimiz sonuçlarla da desteklenmektedir. Drog da bulunan total fenolik madde miktarı $483.56 \pm 31.62 - 213 \pm 13.85 \text{ mg}_{\text{gallik asit}}/\text{g}_{\text{ekstre}}$ arasında değişmektedir. Bulgularımız metanol ekstresi ile daha önce rapor edilen değerlerle uyumlu bulunmuştur. Lipozom lipit peroksidasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar İstanbul'dan temin edilen örnekler ile A5 örneğinde ($36.22 \pm 10.30 - 303.98 \pm 7.57 \mu\text{g/mL}$) standart ola-

rak kullanılan propil gallat ($3.39 \pm 1.96 \mu\text{g/mL}$) ile karşılaştırıldığı zaman zayıf etkili olarak değerlendirilmiştir. Diğer örnekler de kapasite $500 > \mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiş ve antilipit peroksidasyon etki yönünden önemsiz olarak değerlendirilmiştir.

Ülkemiz piyasasında satılan bitki kısımları, ülkemizde kültürden elde edilen örneklerden veya yurt dışı kaynaklardan karşılanmaktadır. Mikrobiyolojik kontaminasyon örneklerin insan sağlığına uygun şartlarda satışa sunulmadığını göstermektedir. Bu çalışmada, aktarlarda satışa sunulmuş olan *Aloysia citriodora* örnekleri mikrobiyolojik kontaminasyon açısından ilk kez incelenmiştir. Mikrobiyal kontaminasyon testlerinden elde edilen sonuçlar Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir. Avrupa Farmakopesi 2011'e göre sulu preparatların oral kullanımında maksimum toplam aerobik mikroorganizma sayısı 10^2 CFU/g olarak verilirken, toplam maya ve küf sayısı da maksimum 10^1 CFU/g olarak belirtilmiştir. Bu veriler ışığında sonuçlarımız değerlendirildiğinde, standart örneğimiz (Yalova) ile A4 ve A5, lokalitelerinden elde edilen örneklerde total aerob bakteri üremesi tespit edilmemiştir. Ayrıca A4, A5, İ3 lokaliteleri ile Kayseriden alınan örneklerde maya ve küf üremesi saptanmamıştır. Tablo 3'te görüldüğü gibi A1, A3, İ2, İ3 ve K2'de limitlerin üstünde total aerob bakteri sayımı yapılmıştır. H1'de ise limitlere göre oldukça yüksek total aerob bakteri sayılmıştır. Numunelerin hiç birinde patojen bakteriye rastlanmamıştır.

Bu sonuçlara göre drogların çoğunda aerobik mikroorganizma ve mantar sayıları Avrupa Farmakopesi'nin steril olmayan ve oral yolla kullanılan farmasötik ürünler için kabul ettiği sınırların üzerinde bulunmuştur. Piyasada satışa sunulmuş örneklerin total fenol içeriği ve antioksidan kapasitelerinin farklılık göstermesi bitkinin elde edildiği kaynakla ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışma, piyasa örnekleri üzerinden yürütülmüş olması açısından önemlidir. Halkın sağlığını korumak/yeniden kazanmak için doğrudan kullanımına sunulmuş olan drogların hem biyoaktivite hem de mikrobiyolojik şartlar açısından uygunluğu tartışılmış ve piyasadaki drogların GMP (İyi İmalat Yöntemleri) kuralları açısından zayıf olduğu sonucuna varılmıştır.

Teşekkür: Çalışmamız sırasında standart numune olarak kullandığımız *Aloysia citriodora*'nın taze örneklerini gönderen Ahmet B. Tınmaz'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Chevallier A.** The Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley Limited, London, 1996.
2. **Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD.** Herbal Medicines-A Guide for Health-care Professionals. The Pharmaceutical Press, London, 1996.
3. **Baytop T.** Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999.
4. **Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H.** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J Ethnopharmacol* 2002; 82:97-103. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00164-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00164-2)
5. **Hanlidou E, Karousou R, Kleftoyanni V, Kokkini S.** The herbal market of Tesseloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. *J Ethnopharmacol* 2004; 91:281-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.01.007>
6. **El-Hawary SS, Yousif MF, Abdel Motaal AA, Abd-Hameed LM.** Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Bull Facult Pharm Cairo Univ* 2012; 50:1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2011.12.001>
7. **Andrade PB, Seabra RM, Valentão P, Areias F.** Simultaneous determination of flavonoids, phenolic acids, and coumarins in seven medicinal species by HPLC/Diode-array detector. *J Liq Chrom & Rel Technol* 1998; 21:2813-20. <http://dx.doi.org/10.1080/10826079808003444>
8. **Carnat A, Carnat AP, Fraisse D, Lamaison JL.** The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia* 1999; 70:44-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(98\)00016-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(98)00016-1)
9. **Valentão P, Andrade PB, Areias F, Ferreres F, Seabra RM.** Analysis of vervain flavonoids by HPLC/

- Diode array detector method. Its application to quality control. *J Agric Food Chem* 1999; 47:4579-82. <http://dx.doi.org/10.1021/jf990444i>
10. **Bilia AR, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri FF.** HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 46:463-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.007>
 11. **Qnais E, Abu-Saffieh K, Abu-Dieyeh MH, Abdulla FA.** Antinociceptive effect of two flavonoids from *Aloysia triphylla* L. *Jordan J Biol Sci* 2009; 2:167-70.
 12. **Quirantes-Piné R, Funes L, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A.** High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *J Chromatog A* 2009; 1216:5391-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.038>
 13. **Stashenko EE, Martínez JR, Cala MP, Durán DC, Caballero D.** Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *J Sep Sci* 2013; 36:192-202. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201200877>
 14. **Özek T, Kirimer N, Başer KHC, Tümen G.** Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton grown in Turkey. *J Essent Oil Res* 1996; 8:581-3. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1996.9700698>
 15. **Argyropoulou C, Daferera D, Tarantilis PA, Fasseas C, Polissiou M.** Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochem Syst Ecol* 2007; 35:831-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2007.07.001>
 16. **Ali HFM, El-Beltagi HS, Nasr NF.** Assessment of volatile components, free radical-scavenging capacity and anti-microbial activity of lemon verbena leaves. *Res J Phytochem* 2008; 2:84-92. <http://dx.doi.org/10.3923/rjphyto.2008.84.92>
 17. **Alavi L, Barzegar M, Jabbari A, Naghdibadi H.** The effect of heat treatment on chemical composition and antioxidant property of *Lippia citriodora* essential oil. *J Med Plants* 2011; 10:65-75.
 18. **Karik Ü, Azkan N.** Farklı dikim aralıklarının limonotu (*Lippia citriodora* L.) bitkisinde herba ve uçucu yağ verimi ile uçucu yağın kalite özelliklerine etkisi. *Bahçe* 2011; 40:23-34.
 19. **Zoubiri S, Baaliouamer A.** Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chem* 2011; 129:179-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.033>
 20. **Khani A, Basavand F, Rakhshani E.** Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil. *J Crop Prot* 2012; 1:313-20.
 21. **Bensabah F, Sbayou H, Amghar S, Lamiri A, Naja J.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of two aromatic plants: *Mentha spicata* and *Lippia citriodora* irrigated by urban wastewater. *Int J Eng Res Technol* 2013; 2:1560-9.
 22. **Parodi TV, Vargas APC, Krewer C, et al.** Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. *Braz Arch Biol Technol* 2013; 56:283-92. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013000200014>
 23. **Shahhoseini R, Hosseini N, Ghorbanpour M.** Study of essential oil content and composition of different parts of lemon verbena (*Lippia citriodora*) grown in Iran. *J Essent Oil Bear Pl* 2014; 17:120-5. <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2013.854505>
 24. **Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, de Lordes Basto M.** Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1324-7. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.25.1324>
 25. **Mothana RA, Abdo SA, Hasson S, Althawab FM, Alaghbari SA, Lindequist U.** Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. *Evid Based Complement Alternat Med* 2010; 7:323-30. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nen004>
 26. **Portmann E, Nigro MM, Reides CG, et al.** Aqueous extracts of *Lippia turbinata* and *Aloysia citriodora* (Verbenaceae): assessment of antioxidant capacity and DNA damage. *Int J Toxicol* 2012; 31:192-202. <http://dx.doi.org/10.1177/1091581812436726>
 27. **Choupani M, Delouee SA, Alami M.** Antioxidant properties of various solvent extracts of lemon verbena (*Lippia citriodora*) leaves. *IJABBR* 2014; 2:1340-6.
 28. **Roidaki A, Zoumpoulakis PG, Proestos C.** Comparison of extraction methods for the determination of antioxidant activity in extracts of *Hippophae rhamnoides* L. and *Lippia citriodora*. The effect of seasonal collection. *Austin J Nutr Food Sci* 2015; 3:1057.
 29. **Bayoub K, Baibai T, Mountassif D, Retmane A, Soukri A.** Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *Afr J Biotechnol* 2010; 9:4251-8.
 30. **Ponce-Monter H, Fernández-Martínez E, Ortiz MI, et al.** Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies. *J Smooth Muscle Res* 2010; 46:309-19. <http://dx.doi.org/10.1540/jsmr.46.309>
 31. **Mamadou G, Meddah B, Limas-Nzouzi N, et al.** Antispasmodic phytochemistry, from traditional utilization to rational formulation: functional approach. *Phytopharmacology* 2011; 1:20-35.
 32. **Tajik J, Kheirandish R, Amanollahi R, Shahabi A.** Gastroprotective effect of aqueous extracts of *Lippia*

- citriodora*, ajowan (*Trachyspermum copticum*), and *Dracocephalum polychaetum* on induced gastric ulcer in rats. *Comp Clin Pathol* 2015; 24:1605-10.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00580-015-2123-y>
33. **Abuhamdah S, Abuhamdah R, Howes MJ, Al-Olimat S, Ennaceur A, Chazot PL.** Pharmacological and neuroprotective profile of an essential oil derived from leaves of *Aloysia citrodora* Palau. *J Pharm Pharmacol* 2015; 67:1306-15.
<http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12424>
34. **Ansari M, Larijani K, Saber-Tehrani M.** Antibacterial activity of *Lippia citriodora* herb essence against MRSA *Staphylococcus aureus*. *Afr J Microbiol Res* 2012; 6:16-9.
35. **Ocazionez RE, Meneses R, Torres FA, Stashenko E.** Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on Dengue virus replication in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105:304-9.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000300010>
36. **Olivero-Verbel J, Güette-Fernandez J, Stashenko E.** Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2009; 8:419-27.
37. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20th Informational Supplement, M100-S20, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2013.
38. European Pharmacopoeia 7.0.5.1.4. Microbiological quality of non-sterile for pharmaceutical use. Strasbourg, 2011.
39. **Slinkard K, Singleton VL.** Total phenols analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enology Viticulture* 1977; 28:49-55.
40. **Güvenç A, Houghton PJ, Duman H, Coşkun M, Şahin P.** Antioxidant activity studies on selected *Sideritis* species native to Turkey. *Pharm Biol* 2005; 43:173-7.
<http://dx.doi.org/10.1080/13880200590919528>
41. **Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Tech* 1995; 28:25-30.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
42. **Şaşkara C, Hürkul MM, Güvenç A.** Aktarlarda satılan *Melissa officinalis* L. (*oğulotu, melisa*) üzerinde morfolojik ve anatomik çalışmalar. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2010; 39:123-43.