



**Çay Olarak Kullanılan Bazı Bitkilerde
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -DAD
Yöntemi ile Flavonoid Miktar Tayini Çalışmaları**

Yüksek Lisans Tezi

ELAF AFTAN

Eskişehir 2023

**Çay Olarak Kullanılan Bazı Bitkilerde
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -DAD Yöntemi ile
Flavonoid Miktar Tayini Çalışmaları**

ELAF AFTAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Farmakognozi Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Haziran 2023**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elaf AFTAN'nın “ Çay Olarak Kullanılan Bazı Bitkilerde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -DAD Yöntemi ile Flavonoid Miktar Tayini Çalışmaları “ başlıklı tezi 19/06/2023 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.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye	(Tez Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK	
Üye	Prof. Dr. Dilek AK	
Üye	Prof. Dr. Ülkü Dilek UYSAL	

Prof. Dr Gülşen AKALIN- ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Çay Olarak Kullanılan Bazı Bitkilerde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - DAD Yöntemi ile Flavonoid Miktar Tayini Çalışmaları

Elaf AFTAN

Farmakognozi Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2023

Danışman: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

Bu çalışmanın amacı, geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılan bazı bitkisel materyallerden hazırlanan infüzyonların flavonoid içeriklerinin değerlendirilmesinde etkili bir ters faz-YBSK-DAD yöntemi geliştirmektir. Bu amaçla seçilmiş mirisetin, kersetin, rutin, luteolin ve apigenin gibi flavonoidlerin ters faz C18 kolon (4.6 mm, 100 mm, 3 µm), 1,0 mL/dk akış hızı ve 360 nm’de DAD dedektör ile gradient elüsyon sisteminde ayırımı gerçekleştirilmiştir. Yöntemin kesinliği, doğruluğu ve tekrarlanabilirliği validasyon çalışmaları ile gösterilmiştir.

Bunun yanında infüzyonların içerdiği fenolik asit miktarları ise farklı bir ters faz-YBSK-DAD ve gradient elüsyon yöntemi ile tayin edilirken, toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Ayrıca, infüzyonların antioksidan aktiviteleri DPPH• ve ABTS•⁺ radikalleri üzerinden tayin edilmiştir. ABTS•⁺ radikal renksizleştirme testine göre en yüksek antioksidan aktivite en fazla klorojenik asit içeren *Hypericum perforatum* ve *H. thymopsis* ile, en fazla o-kumarik asit içeren *Achillea millefolium* infüzyonlarında gözlenirken, en düşük aktivite *Lycium depressum* meyva infüzyonlarında görülmüştür. DPPH• radikal süpürücü aktivite tayininde ise en yüksek aktivite *Hypericum perforatum* (% inh.44.99), *H. thymopsis* (% inh.31.89) ve *Malabaila secacul* meyva ve herba (MSM ve MSH, % inh 35.32-38.81, sırasıyla) infüzyonlarında tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bitkisel çaylar, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi -DAD flavonoid, fenolik asit, antioksidan aktivite, validasyon.

ABSTRACT

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-DAD METHOD FOR DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN SOME PLANTS USED AS TEA

Elaf AFTAN

Department of Pharmacognosy

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2023

Supervisor: Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK

The aim of this study is to develop an effective reverse phase-solid phase extraction (RP-SPE)-diode array detection (DAD) method for the evaluation of flavonoid contents in infusions prepared from some herbal materials commonly used in traditional treatments. For this purpose, selected flavonoids such as myricetin, quercetin, rutin, luteolin, and apigenin were separated using a reverse phase C18 column (4.6 mm, 100 mm, 3 μ m), a flow rate of 1.0 mL/min, and a DAD detector at 360 nm in a gradient elution system. The accuracy, precision, and repeatability of the method were demonstrated through validation studies.

Furthermore, the amounts of phenolic acids present in the infusions were determined using a different reverse phase-SPE-DAD and gradient elution method, while the total phenolic content was determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method. Additionally, the antioxidant activities of the infusions were determined through DPPH• and ABTS•+ radical assays. According to the ABTS•+ radical decolorization test, the highest antioxidant activity was observed in *Hypericum perforatum* and *H. thymopsis* infusions, which contained the highest amounts of chlorogenic acid, while *Achillea millefolium* infusions containing the highest amount of o-coumaric acid exhibited the highest activity. The lowest activity was observed in *Lycium depressum* fruit infusions. In the DPPH• radical superscript activity assay, the highest activity was detected in *Hypericum perforatum* (44.99 % inh.), *H. thymopsis* (31.89 % inh.), and *Malabaila secacul* fruit and herb (MSM and MSH, 35.32-38.81% inh, respectively) infusions.

Keywords: Herbal teas, High Performance Liquid Chromatography –DAD, Flavonoid, Antioxidant activity, Validation.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, bana sağladığı tüm destek ve yardımlar için tez danışmanım Prof. Dr. Nilgün Öztürk hocam'a

Kalibrasyon ve Validasyon çalışmalarım sırasında büyük özveri ile yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Dilek Ak hocam'a

Bitkisel materyallerimi temin eden Dr. Öğr. Üye. Ö. Koray Yaylacı hocam'a

Deneyisel çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üye. H. Tuba Kıyan hocam'a

Bilim hayatım boyunca bana destek olan tüm aileme ve dostlarıma saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

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.

Elaf AFTAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
GÖRSELLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bitkisel Çaylar	4
2.2. Bitkisel çayların içeriği	5
2.2.1. Polifenoller	4
2.2.2. Flavonoidler	5
2.2.3. Fenolik Asitler	8
2.2.4. Lignanlar	10
2.2.5. Ligninler	11
2.2.6. Tanenler	11
2.2.7. Terpenoidler	11
2.2.8. Kumarinler	11
2.2.9. Poliasetilenler	11
2.3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK)	12
3. Materyal ve Yöntem	14

3.1. Kimyasal Maddeler	14
3.2. Cihazlar	15
3.3. Bitkisel Materyal	16
3.4. Ekstraksiyon	17
3.5. Fitokimyasal Analizler	17
3.5.1. Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini	18
3.5.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)-DAD Yöntemi ile Flavonoidlerin Belirlenmesi ve Miktar Tayini.....	18
3.5.2.1 Validasyon	20
3.5.2.2. Tayin ve gözlenebilirlik sınırı	20
3.5.2.3. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik.....	21
3.6. YBSK-DAD Yöntemi ile Fenolik asitlerin Belirlenmesi ve Miktar Tayini.	21
3.7. Biyoaktivite Çalışmaları	22
3.7.1. Antioksidan Aktivite Tayini	22
3.7.2. DPPH* üzerinden Radikal Süpürücü Etki.....	22
3.7.3. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi	23
4. BULGULAR VE YORUM	25
4.1. Ekstraksiyon Verimleri ve Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini.	25
4.2. YBSK-DAD yöntemi ile Flavonoid Miktar Tayini	26
4.3. Doğrulama Çalışmaları	28
4.3.1. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	29
4.3.2. Doğrusallık (Linearity)	29
4.3.3. Validasyon	30
4.3.4. Geliştirilen ters faz YBSK-DAD yönteminin infüzyonlara uygulanması	34
4.4. Ters faz YBSK-DAD Yöntemi ile Fenolik asitlerin Miktar Tayini...	36
4.5. Antioksidan Aktivite Tayini.....	41
4.5.1. DPPH* üzerinden radikal süpürücü etki	41
4.5.2. ABTS●+ radikal katyon renksizleştirme kapasitesi	43
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	45

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Benzoik asit türevleri.....	9
Tablo 2.2. Sinnamik asit türevleri.....	10
Tablo 3.1. Kullanılan bitkisel materyaller, lokaliteleri, toplanma zamanları ve Herbarium numaraları	16
Tablo 4.1. Ekstrelerinin % verim ve toplam fenolik madde (TFM) miktarları.....	25
Tablo 4.2. Çalışılan flavonoidlerin molekül ağırlıkları ve stok çözelti konsantrasyonları.....	27
Tablo 4.3. Standart karışım çözeltisindeki flavonoidlerin Konsantrasyonları.....	27
Tablo 4.4. Standart flavonoid karışımından hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin derişimleri	28
Tablo 4.5. Çalışılan flavonoidlerin kesinlik testi sonuçları (PN oranı olarak) (n=3)	29
Tablo 4.6. 360 nm'de flavonoidlerin kalibrasyon parametreleri (Korelasyon katsayısı (r), LOD ve LOQ değerleri (n = 4))	30
Tablo 4.7. Çalışılan Flavonoid bileşiklerine ait gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi	31
Tablo 4.8. İnfüzyonların YBSK_DAD sisteminde tayin edilen flavonoid miktarları.....	35
Tablo 4.9. Çalışılan ekstrelerin ters-faz YBSK ile tespit edilen fenolik asit miktarları.....	40
Tablo 4.10. Çalışılan ekstrelerin DPPH •serbest radikali üzerinden % inhibisyon değerleri	43
Tablo 4.11. Çalışılan infüzyonların ABTS• % inhibisyon değerleri	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Flavonoid yapısı ve sınıflandırması.....	5
Şekil 2.2. Apigenin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3. Rutin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.4. Luteolin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.5. Kersetin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.6. Mirisetin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 3.1. Gallik asit kalibrasyon eğrisi	18
Şekil 4.1. İnfüzyonların toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/ g Ekstre)	27
Şekil 4.2. Çalışılan flavonoidlerin kalibrasyon grafikleri	28
Şekil 4.3. Standart flavonoid karışımı YBSK-DAD kromatogramı.....	32
Şekil 4.4. APH infüzyonunun flavonoid YBSK-DAD kromatogramı.....	33
Şekil 4.5. MSM infüzyonunun flavonoid YBSK-DAD kromatogram	33
Şekil 4.6. HTH infüzyonunun flavonoid YBSK-DAD kromatogram	34
Şekil 4.7. Standart fenolik asit karışımı YBSK-DAD kromatogramı.....	36
Şekil 4.8. AMH infüzyonunun flavonoid YBSK-DAD fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı	37
Şekil 4.9. HPH infüzyonunun fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı.....	37
Şekil 4.10. MSM infüzyonunun fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı.....	38
Şekil 4.11. NCH infüzyonunun fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı...	38
Şekil 4.12. İnfüzyonların serbest radikal süpürücü aktivite (%inhibisyon) grafiği.....	42
Şekil 4.13. İnfüzyonların ABTS• radikal süpürücü aktivite (% inhibisyon) grafiği.....	44

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. Gallik asit konsantrasyonları.....	18
---	-----------



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	mikrogram
A	Pik alanı
ABTS	[2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit)]
Aİ	Apigenin
AKH	<i>Achillea ketenogli</i>
AMH	<i>Achillea millefolium</i>
APH	<i>Achillea Phrygia</i>
BHT	Butilenmiş Hidroksi Toluol
DAD	Diode Array Detector (Diyot Dizi Dedektörü)
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EP	Avrupa Farmakopesi
ESSE	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
FA	Ferulik Asit
GA	Gallik asit
GC	Gaz kromatografisi
H	Tepe yüksekliği
HPH	<i>Hypericum perforatum</i>
HTH	<i>Hypericum thymopsis Boiss.</i>
HÜEF	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
IBS	İrritabl Bağırsak Sendromu
KA	Kafeik Asit
KER	Kersetin
KLA	Klorojenik Asit
LBM	<i>Lycium barbarum L.</i>
LDM	<i>Lycium depressum</i>

LSM	<i>Lycium shawii</i>
LUT	Luteolin
Mg/GAE	mg gallik asite eşdeğ
mgGAE	mg gallik asite eşdeğer
MİR	Mirisetin
ml	mililitre
MSH	<i>Malabaila secacul</i> Herba ABTS
MSM	<i>Malabaila secacul</i> Meyve
NCH	<i>Nepeta congesta</i>
o-KU	o-kumarik asit
OPLC	Orta Basınçlı İnce Tabaka Kromatografisi
p-KU	<i>Para</i> -Kumarik Asit
protoKA	Proto-kateşik Asit
RA	Rosmarinik asit
ROS	Reactive Oxygen Species
Rt	Alıkonma Zamanı
RU	Rutin
Sİ	Sirinjik Asit
SS	Standart Sapma
TAC	Toplam antioksidan kapasitenin
TFM	Toplam Fenolik Madde
<i>t-SİN</i>	<i>Trans</i> - Sınnamik Asit
UV	Ultraviyole
VA	Vanillik Asit
WHO	Dunya Sağlık Orgutu
YBSK	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitki çayları veya bitki infüzyonları yüzyıllardır geleneksel tıbbın birçok formunda terapötik araçlar olarak kullanılan bitki türlerinin yaprak, çiçek, tohum, meyve, gövde ve köklerinden demlenerek hazırlanan popüler bir küresel içecektir (Poswal vd., 2019). Araştırmalar, küresel yaşam beklentisi arttıkça, yaşamın herhangi bir dönemindeki diyet ve yaşam tarzı değişikliklerinin vasküler, metabolik ve bilişsel sağlığı iyileştirebileceğini ve dolayısıyla bulaşıcı olmayan hastalıkların yükünü azaltabileceğini gösteriyor.

Dünya Sağlık Örgütü, 2014-2023 stratejisinde, ilaca etkili ve uygun fiyatlı alternatiflere erişim sağlayarak toplumları sağlıklı tutmak ve insanların kültürel uygulamalarıyla tutarlı sağlık seçenekleri sunmak amacıyla bitkisel ilaçlar da dahil olmak üzere geleneksel ilaçların kullanımından yararlanmaya çalışmaktadır (Poswal vd. 2019). Bu stratejiler küresel ve ulusal sağlık politikalarına daha entegre hale geldikçe, kanıta dayalı yaklaşımlar oluşturarak etkinlik, güvenlik ve kalite güvencesi gibi önemli konuları inceleme ihtiyacı da artmıştır. *Camelia sinensis* dışında farklı tıbbi bitkilerden hazırlanan bitkisel çaylar fitoterapide genellikle günlük rahatsızlıklar olarak nitelendirilen hastalıkların tedavisinde; ateş veya öksürükle seyreden grip ve soğukalgınlığı, bağışıklık sistemi problemleri, hazımsızlık, anoreksiya, mide bulantısı, gastrit, diyare, konstipasyon gibi sindirim sistemi hastalıkları, uykusuzluk, huzursuzluk, duygu durum bozuklukları, stres ve kaygı gibi sinir sistemi problemleri, sistit gibi üriner sistem bozuklukları, menopoza ve mensturasyon sırasında yaşanan bazı sıkıntılar, en çok da zayıflama amacıyla dahilen, egzama, ürtiker gibi bazı cilt hastalıklarında ise haricen kullanılmaktadır (Elmas vd., 2019)

Gelecekteki araştırmalarda göz ardı edilmemesi gereken bir alan, tıbbi bitkilerin yüksek bir standartta tedarik edilmesini ve üretilmesini sağlamak için kalite güvence süreçlerinin geliştirilmesidir. Günümüzde dünya genelinde bitki çayı tüketiminin artmasıyla birlikte, etkinlik, güvenlik ve kalite güvencesi gibi bir dizi halk sağlığı sorunu endişe yaratmakla birlikte, bugüne kadar bitki çaylarına odaklanan çalışma oldukça azdır. Bu bağlamda, bitki çayının kimyasal bileşimini araştırmak ve kaliteyi sağlamak için önemli bir adım olan fitokimyasal analiz oldukça önemlidir.

Tıbbi bitkilerin biyolojik aktivitelerinden içerdikleri polifenoller, terpenler, alkaloidler, fenolik asitler, stilbenler, steroller, müsilaj, ligninler, kumarinler ve uçucu yağlar gibi

birçok önemli bileşik grubu sorumludur. Antioksidan özelliklere sahip flavonoidler ve fenolik asitler gibi polifenoller ve kronik hastalık riskini azaltmaya yardımcı olurlar (Williamson vd., 2017). Ayrıca terpenler antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal (Saroglou vd., 2006), alkaloidler ise antipiretik, analjezik, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özelliklere sahiptir (Gibbons, 2004).

Bitki çaylarının tüketimine atfedilen sağlık yararları, flavonoidler gibi biyoaktif bileşenlerin yüksek içeriği ile ilişkilendirilmektedir. Flavonoidler, heterosiklik C-halkadaki ayrımlarına göre flavonoidler, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar ve antosiyanidinlerin altı alt sınıfında sınıflandırılabilen ikincil bitki metabolitleridir (Hollman, 2004). Flavonoidlerin analizinde ince tabaka kromatografisi (TLC) kolon kromatografisi ve orta basınçlı ince tabaka kromatografisi (OPLC), kapiler elektroforez (CE) gibi çok farklı teknikler kullanılsa da, en başarılı yöntem yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniğinin çeşitli varyasyonları (YBSK-DAD, YBSK-MS gibi) olarak bilinir (Zhao, vd., 2013). Bu bileşiklerin antioksidan, antiviral ve antiinflamatuvar aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir , Ayrıca bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve α - tokoferolden daha güçlü antioksidan aktivite göstermişlerdir . Ancak, bitki çayları hakkında fitokimyasal çalışmalar ve terapötik kullanımı ile ilgili araştırmalar hala sınırlıdır ve bitki çayları çok az aktif madde içerdikleri için herhangi bir hastalığı tedavi etmek için yeterli olabilecekleri konusunda kuşku vardır. Bununla birlikte, bitki çayları düzenli bir diyetin bir parçası olarak tüketildiğinde, sağlık açısından yararlı olabilirler (Re vd.,1999).

Bu çalışmanın amacı, öncelikle geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılan bazı bitkisel materyallerden hazırlanan infüzyonların flavonoid içeriklerinin değerlendirilmesinde etkili bir ters faz-YBSK-DAD yöntemi geliştirmek, ardından hazırlanan infüzyonların polifenolik içeriği ile fenolik asitlerini belirlemek ve antioksidan aktivilerini tayin etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkisel Çaylar

Ülkemizin 1994'den beri üye olduğu Avrupa Farmakopesi (E.P. Pharmacopeia, 2017) bitkisel Çaylar (Plantae ad ptisanam) monografında bulunan tarif; ağızdan kullanım niyeti ile infüzyon, dekoksiyon veya maserasyonla hazırlanarak kullanılan bir veya birden fazla drogdan ibaret karışımlardır.

Bitkisel çaylar, infüzyon, maserasyon veya dekoksiyon yoluyla hazırlanan oral sulu müstahzarlar için amaçlanan bir veya daha fazla bitkisel maddeden oluşur (European Medicines, 2021)

Bitkisel çaylar genellikle dökme formda veya küçük poşetler halinde sağlanır. Genellikle yapraklar, çiçekler ve hassas kısımlar için infüzyon uygunken, kökler, rizomlar ve kabuklar için dekoksiyon veya maserasyon uygundur.

Öte yandan, hızlı ve kolay hazırlanabilen bitkisel çaylar uzun zamandan beri tıbbi sistemlerde terapötik araç olarak kullanılmaktadır. In vitro araştırmalarla ilişkili düşük maliyetler nedeniyle, fitobileşenler ve bunların farmakolojisi hakkında çok sayıda preklinik bilgi vardır. Dünya Sağlık Örgütü, 2014-2023 stratejisinde, ilaca etkili ve uygun fiyatlı alternatiflere erişim sağlayarak toplumları sağlıklı tutmak ve insanların kültürel uygulamalarıyla tutarlı sağlık seçenekleri sunmak amacıyla bitkisel ilaçlar da dâhil olmak üzere geleneksel ilaçların kullanımından yararlanmayı amaçlamaktadır. (World Health Organization, 2012).

Bu stratejiler küresel ve ulusal sağlık politikalarına daha entegre hale geldikçe, kanıta dayalı yaklaşımlar oluşturarak etkinlik, güvenlik ve kalite güvencesi gibi önemli konuları inceleme ihtiyacı da artmıştır (Zhang vd., 2011).

Son yıllarda, bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanan küresel ölüm oranı, en yaygın iskemik kalp hastalığı olmak üzere bulaşıcı hastalıkları geride bıraktımtır ve bunama ve diyabet artık ilk 10 neden arasında yer almaktadır (World Health Organization, 2012). Araştırmalar, küresel yaşam beklentisi arttıkça, yaşamın herhangi bir döneminde diyet ve yaşam tarzı değişikliklerinin vasküler, metabolik ve bilişsel sağlığı iyileştirebileceğini ve dolayısıyla bulaşıcı olmayan hastalık yükünü azaltabileceğini göstermektedir (Calder vd., 2008).

2.2. Bitkisel çayların içeriği

Bitkisel çaylar diğerleri arasında karotenoidler, fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler, alkaloidler, poliasetilenler, saponinler ve terpenoidler gibi doğal biyoaktif bileşikler açısından zengin kaynaklardır. Bilimsel kanıtlar, bu biyoaktif bileşiklerin, diğerlerinin yanı sıra antioksidan, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antialerjik, antitrombotik ve damar genişletici etkinin yanı sıra antimutajenite, antikanserojenite ve yaşlanma karşıtı etkiler gibi sayısız biyolojik etki sağladığını göstermektedir.

2.2.1. Polifenoller

Fenolik bileşikler, bitkinin tüm organlarında bulunan, farklı derecelerde hidroksilasyona sahip aromatik bir halkadan oluşan sekonder metabolitlerdir. Pentoz fosfat, shikimate ve fenilpropanoid metabolizma yollarını izleyerek piruvat, asetat, fenilalanin ve tirozin gibi aromatik amino asitler, asetil CoA ve malonil CoA gibi biyosentetik prekürsörlerden meydana gelirler. Bitkisel çaylarda görülen fenolik bileşikler arasında fenolik asitler, kumarinler, flavonoidler, tanenler, lignanlar ve ligninler bulunur. Bitkilere renk, tat ve koku veren polifenolik bileşikler, sayısız biyolojik aktivitenin de sorumlusudur (Chandrasekara ve Shahidi, 2018).

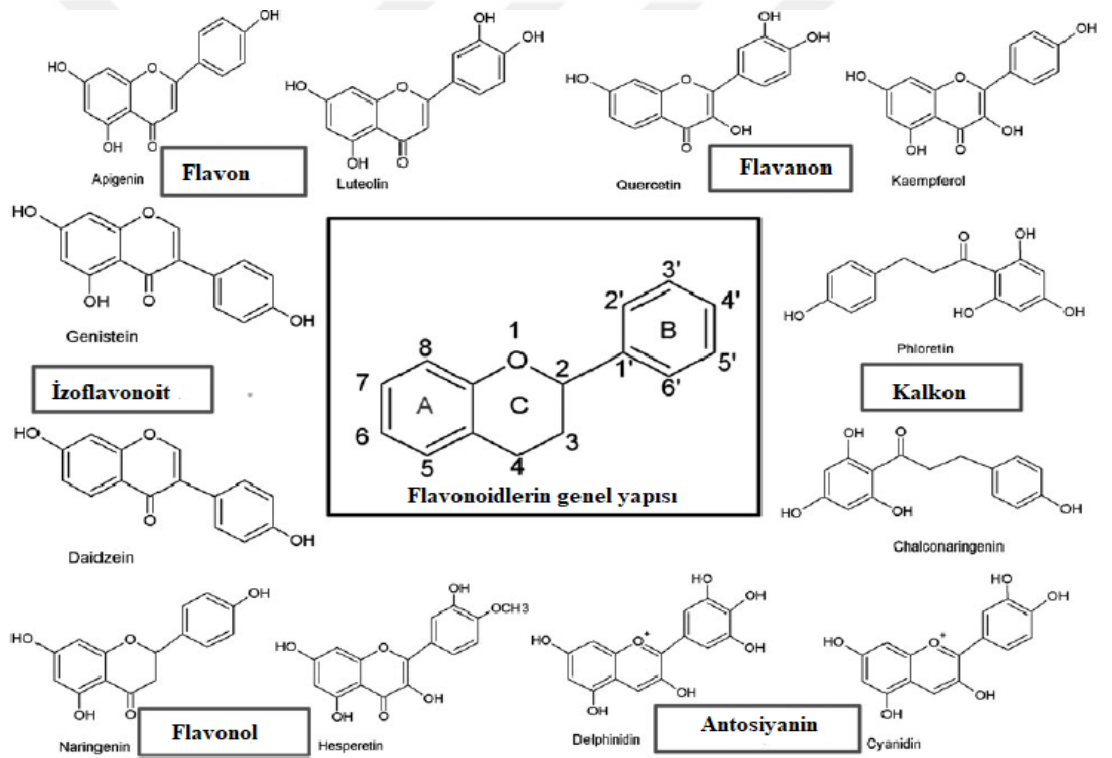
2.2.2. Flavonoidler

Bitkilerde en yaygın bulunan polifenol sınıfı, flavonoidler, bir fenilpropanoid bileşiğinin üç molekül malonil koenzim A ile kondensasyonu ile oluşurlar. Bu reaksiyon, kalkon oluşumuna yol açan kalkon sentaz enzimi tarafından katalize edilir. Kalkonlar daha sonra flavonoidler oluşturmak için asidik koşullar altında siklize edilir.

Bitkileri ultraviyole radyasyondan veya patojenlerin saldırısından korumakla görevli flavonoidler, çiçeklerin renginden ve biyolojik aktivitelerinde de sorumludurlar. Şekil 2.1'de görüldüğü gibi flavonoidlerin pekçok alt sınıfı bulunmaktadır: flavonlar, flavonoller, flavononlar, izoflavonlar, antosiyanidinler ve flavanollerdir. Flavonlar ve flavonoller gıdalarda aglikonlar olarak bulunurlar ve 2-3 pozisyonlarında bir çift bağ ile benzer C halkası yapılarına sahiptirler. Flavonoller (kuersetin, kaempferol ve mirisetin), flavonlar (luteolin, apigenin ve krisin), flavanoller (kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallokateşin gallat),

flavanonlar (naringenin, hesperitin ve eriodictyol), antsiyanidinler (siyanidin, malvidin, peonidin, petunidin, pelargonidin ve definidin) ve izoflavonlar (genistein, daidzein ve glisitin) bitkilerin çeşitli kısımlarında yaygın olarak bulunan flavonoidlerdir (Chandrasekara ve Shahidi, 2018).

Flavonoidler, antienflamatuar, antioksidatif, antikarsinojenik, kalp sağlığını destekleme, kanser riskini azaltma gibi bir dizi sağlık yararı sağlama potansiyeline sahiptir (Panche vd., 2016).

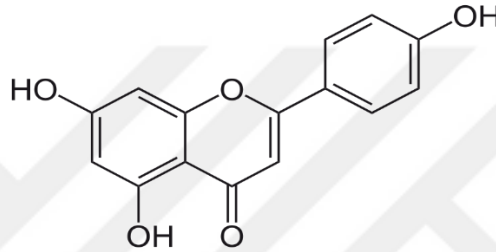


Şekil 2.1. Flavonoid yapısı ve sınıflandırması

Apigenin

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) maydanoz, kereviz gibi bitkilerde en yaygın flavonoidlerden biridir ve papatya çayı en yaygın kaynaklardır.

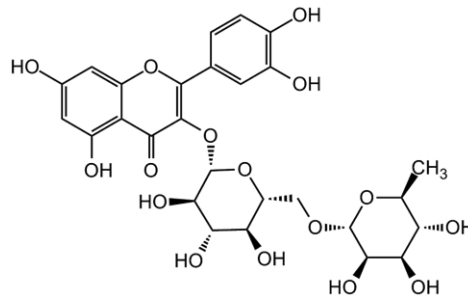
Apigenin kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_5$ ve bağıl moleküler moleküler ağırlığı 270.0528 g/mol'dür Apigenin, anti-oksidasyon, anti-kanser, anti-inflamasyon, antiviral aktiviteler ve kan basıncını düşürme dâhil olmak üzere birçok biyoaktivite sergiler (Harborne vd.,1975).



Şekil 2.2. Apigenin kimyasal yapısı

Rutin

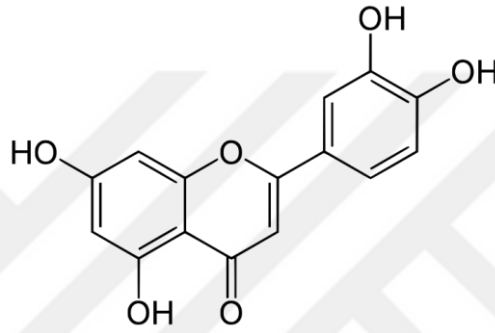
Rutin (3',4',5,7-Tetrahidroksi-3-[α -L-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukopiranosiloksi]) flavon bir flavonoid ve kuersetin ile disakkarit rutinozun bir glikozididir, glikoz ve ramnozdan oluşur. Rutin, ıhlamur ağacı çiçekleri, karabuğday, mürver çiçekleri, sedef otu, St. John's Wort, Ginkgo, elma ve diğerlerinde bulunur. Rutin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilere sahip olabilir. Rutin, çeşitli nutrasötiklerin ana bileşenidir ve özellikle kan damarlarını ve bağırsağı hedefler. Rutin kimyasal formül $C_{27}H_{30}O_{16}$ ve molekül ağırlığı 610.517 g/mol'dür (Gokhale vd., 2004).



Şekil 2.3. Rutin kimyasal yapısı

Luteolin

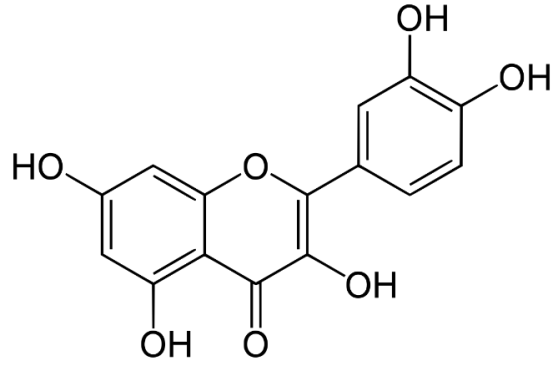
Luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon) birçok meyve, sebze ve şifalı bitkide bulunan flavonoiddir. En iyi luteolin kaynakları, diyet takviyeleri yerine doğal bitki besinlerini içerir. Bir kaşık zeytinyağı veya bir parça kekik, zengin luteolin kaynakları sunar. Besin kaynaklarına ek olarak, yapraklar, kabuklar ve kanarya otu poleni bol miktarda luteolin içerir. Luteolin'in kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_6$ ve molekül ağırlığı 286.24 g/mol'dür (Mann, 1992).



Şekil 2.4. Luteolin kimyasal yapısı

Kersetin

Kersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksifavon) birçok sebze, meyve ve kuruyemişte bulunan bir flavonoiddir. Kersetin Hiperkolesterolemi, kardiyovasküler hastalık, romatizmal hastalıklar dâhil olmak üzere birçok hastalığı tedavi etmek veya önlemek için kullanılmıştır. Kersetinin antioksidan, yaşlanma karşıtı, antitümöral, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antiviral özellikler gösterdiği bildirilmiştir. Kersetin kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_7$ ve moleküler ağırlığı 302.236 g/mol'dür (Boots vd.,2008).

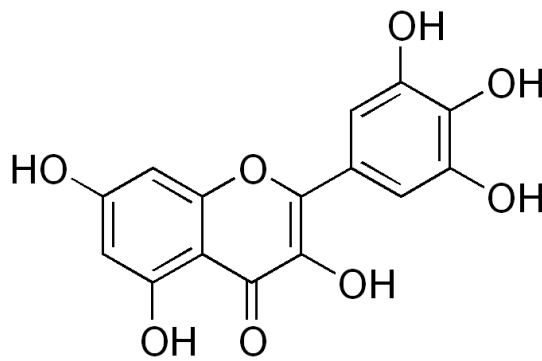


Şekil 2.5. kersetin kimyasal yapısı

Mirisetin

Mirisetin (3, 5, 7, 3', 4', 5'-hekzahidroksiflavonol, MİR) orijinal olarak *Myrica rubra* ağacının kabuğundan izole edilmiştir. Mirisetin metanol, etanol ve diğer polar solventlerde kolayca çözünür. Kimyasal formülü $C_{15}H_{10}O_8$ ve molekül ağırlığı 318.24 g/mol'dür. Myricaceae, Vitaceae, Primulaceae, Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Fagaceae gibi birçok familyaya ait bitkilerde bulunmaktadır.

Çilek gibi meyvelerde, sebzelerde ve bal gibi günlük yiyeceklerde bulunan mirisetin antioksidan ve antitümör özelliklerine sahiptir (Wang vd.,2021).

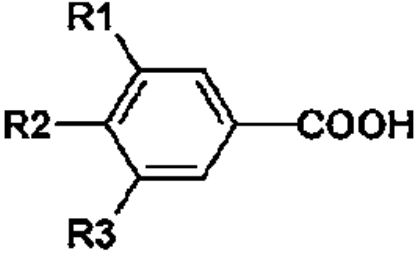


Şekil 2.6. Mirisetin kimyasal yapısı

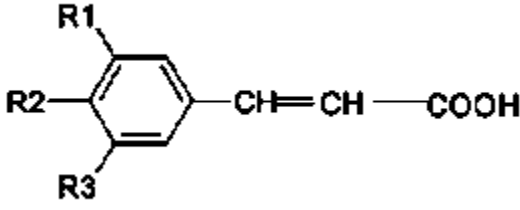
2.2.3. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, doğada yaygın olarak bulunan ve birçok bitki bazlı gıdada bulunan bir organik asit türüdür. Bir karboksilik asit grubuna bağlı bir fenol fonksiyonel grubu ile karakterize edilirler ve bu onlara benzersiz özelliklerini verir. Fenolik asitler, potansiyel sağlık yararlarının yanı sıra antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri açısından incelenmiştir. Kalp ve damar hastalıkları, diyabet ve belirli kanser türleri gibi kronik hastalıklara karşı koruyucu bir etkiye sahip oldukları bulunmuştur. Fenolik asitler ayrıca birçok geleneksel ilacın önemli bileşenleri arasında olup tıbbi özellikleri nedeniyle yüzyıllardır kullanılmaktadır. Genel olarak, önemli biyolojik aktiviteye ve potansiyel sağlık yararlarına sahip fenolik asitler benzoik asit ve sinamik asit türevleri olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.1, 2.2).

Tablo 2.1. Benzoik asit türevleri

			
	R1	R2	R3
Gallik asit	OH	OH	OH
Proto-kateşik asit	OH	OH	H
<i>p</i> -hidroksi benzoik asit	H	OH	H
Vanillik asit	CH ₃ O	OH	H

Tablo 2.2.*Sinnamik asit türevleri*

			
	R1	R2	R3
Kafeik asit	H	OH	OH
Klorojenik asit	OH	OH	H
Sinapik asit	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Ferulik asit	CH ₃ O	OH	H
p-kumarik asit	H	OH	H

2.2.4. Lignanlar

Lignanlar, yan zincirlerinin merkezi karbonları ile birbirine bağlı iki fenilpropanoid biriminden oluşan bileşiklerdir. Bitkilerde bulunan yaygın bitki lignanları arasında sekoizolarisirezinol, matairezinol, larisirezinol ve pinorezinol bulunur, insan bağırsağındaki bağırsak mikroflorası tarafından sırasıyla nammalian lignanlar, enterodiol ve enterolakton'a kolayca dönüştürülürler ve güçlü antioksidan ve östrojenik aktiviteler sergiledikleri bilinmektedir (Chandrasekara ve Shahidi, 2018).

2.2.5. Ligninler

Ligninler, üç monolignolün, yani p-kumaril, sinapil ve koniferil alkollerin bir karışımının polimerizasyonu ile oluşurlar. Ayrıca koniferaldehit, sinapaldehit, dihidrokoniferil alkol, 5-hidroksikoniferil alkol, tiramin ferulat ve p-hidroksi-3-metoksibenzaldehit de ligninlere dâhildir (Chandrasekara ve Shahidi, 2018).

2.2.6. Tanenler

Tanenler, proteinleri bağlama ve çökeltme yeteneğine sahip yapı olarak çok çeşitli bir grup bileşikten oluşur. Tanenler, yoğunlaştırılmış tanenler, hidrolize edilebilir tanenler ve kompleks tanenler olmak üzere üç gruba ayrılır (Chandrasekara ve Shahidi, 2018).

2.2.7. Terpenoidler

Terpenoidler bitkilerin uçucu yağlarında bulunurlar. Terpenoidlerin çeşitli türleri vardır ve bitkilerde farklı fonksiyonlara sahiptirler. Papatya çayı ve melisa çayı gibi bitki çaylarında bulunan terpenoidlerin yatıştırıcı etkilere sahip olabileceği gösterilmiştir. Bu bitki çayları genellikle stresin azaltılması, uyku kalitesinin iyileştirilmesi ve gevşeme sağlanması gibi amaçlarla tüketilir. Terpenoidlerin, sinir sistemi üzerindeki etkileri nedeniyle bu tür etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir. Ancak, terpenoidlerin etkileri bireysel olarak değişebilir ve herkes üzerinde aynı etkileri göstermeyebilir (Cases vd.,2011).

2.2.8. Kumarinler

Kumarinler, cis-O-hidroksisinnamik asit türevlerinin laktonlarıdır ve serbest formda veya glikozitler olarak bulunurlar. Bitkilerde basit kumarinler, furanokumarinler (psoralenler) ve piranokumarinler bulunur (Chandrasekara ve Shahidi, 2018).

2.2.9. Poliasetilenler

Poliasetilenler, karbon-karbon üçlü bağı veya alkinil fonksiyonel grubundan oluşan bir grup biyoaktif bileşiktir. Falkarinol ve falkarindiol gibi falkarinol tipi alifatik C17-poliasetilenler, Apiaceae ve Araliaceae familyalarında yaygın olarak bulunur. Falkarinol tipi poliasetilenler, daha sonra β -oksidasyon üzerine C17-asetilenlere dönüştürülen C18-asetilen krepininik asit ve dehidrokrepininik asidin oluşumuna yol açan dehidrojenasyon yoluyla oleik asitten oluşurlar (Chandrasekara ve Shahidi, 2018).

2.3. Flavonoidlerin Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile tayini

Flavonoidlerin YBSK ile tayini ilk olarak 1976'da Fisher ve Wheaton tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitki bazlı gıdaların flavonoid içeriğinin bilinmesi, bitki fizyolojisi ve insan sağlığındaki rollerini anlamak için çok önemlidir. Ayrıca, bu tür bilgiler, gıda sektöründe gıdaların ve içeceklerin taşıdığı yanısıra kemotaksanomik ayrımlar içinde kullanılmıştır (Merken ve Beecher, 2000).

Kapiler elektroforez ve miselli elektrokinetik kapiler kromatografi gibi diğer modern ayırma sistemleri, bitkilerdeki flavonoidlerin tayini için sınırlı bir ölçüde kullanılmış olsa da bugüne kadar en yaygın kullanılan teknik YBSK olmuştur (Merken ve Beecher, 2000).

En sık kullanılan kolonlar, ters faz C18 kolon malzemesi ile doldurulmuş 5-25 cm uzunluğunda ve 3-4.6 mm iç çaplı olanlardır. C8 tipi kolonlar, izoflavonların aglikon ve glikoziti gibi biraz daha polar flavonoidlerin ayrılmasında kullanılmıştır (Çam ve Hışıl, 2004).

Gıdalardaki flavonoidler için kullanılan ayırma sistemler, tek bir gıdada (şarap, çay, elma vb.) öne çıkan flavonoidlerin tümünü ölçebildiği gibi, birkaç gıdada birkaç alt sınıfı ölçebilecek prosedüre de sahiptir. Bu analitik sistemlerin çoğu, çevresel değişikliklere tepki, türler ve/veya kùltivarlar arasındaki farklılıklar, olgunlaşma sırasındaki değişiklikler vb. dâhil olmak üzere bitki fizyolojisiyle ilgili çeşitli yönleri araştırmak için kullanılmıştır (Merken ve Beecher, 2000).

Genel olarak, ters faz YBSK için kullanılan mobil fazlar, fosforik asit, asetik asit veya formik asit gibi zayıf asitli su ile kombinasyon halinde asetonitril ve/veya metanolden oluşan gradient elüsyon sistemleri kullanılır. Nadiren tetrahidrofuran ve 2-propanol de polar olmayan çözücü olarak kullanılmıştır. Son zamanlarda Mobil fazlarda pik kuyruklanmasını önlemek için düşük pH da fosfat tamponu, amonyum asetat, sitrik asit ve trifloroasetik asit (TFA) kullanılmıştır (Çam ve Hışıl, 2004).

Analizler çoğunlukla 1-1.5 ml/dak akış hızında gerçekleştirilmektedir. Analiz süresi yaklaşık 20-60 dak, kolon sıcaklığı genellikle 25 °C, enjeksiyon hacmi 10-50 µL olarak tercih edilmektedir.

UV bölgede absorbans veren Flavonoidler için iki karakteristik band vardır. 240-285 nm arası absorbans veren Band II flavon çekirdeğinin A halkasından, 300-550 nm arası

absorbans veren Band I flavon çekirdeğinin B halkasından ileri geldiği bilinmektedir. Bu nedenle flavonoid analizlerinde UV dedektörler veya diyot dizinli dedektör (DAD) kullanılmaktadır (Çam ve Hışıl, 2004).

Genellikle 260-280 nm 'de izoflavonlar; 270-280 nm'de flavonlar ve flavonoller; 280-290 nm de flavononlar; 210-280 nm'de kateşinler; 510-520 nm'de antosiyaninler absorbans vermektedir. (Çam ve Hışıl, 2004)



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler

ABTS●+	SigmaAldrich, Almany
Butilhidroksi toluol (BHT)	SigmaAldrich, Almany
DPPH•	SigmaAldrich, Almany
Etanol	SigmaAldrich, Almany
Formik asit	SigmaAldrich, Almany
Ferulik asit	SigmaAldrich, Almany
Folin-Ciocalteu reaktifi	SigmaAldrich, Almany
Gallik asit	SigmaAldrich, Almany
Klorojenik asit	SigmaAldrich, Almany
Metanol	SigmaAldrich, Almany
<i>o</i> -Kumarik asit	SigmaAldrich, Almany
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	SigmaAldrich, Almany
<i>p</i> -Kumarik asit	SigmaAldrich, Almany
Sirinjik asit	SigmaAldrich, Almany
Sodyum karbonat	SigmaAldrich, Almany
<i>tr</i> -sinnamik asit	SigmaAldrich, Almany
Rosmarinik asit	SigmaAldrich, Almany
<i>proto</i> -kateşik asit	SigmaAldrich, Almany
Vanillik asit	SigmaAldrich, Almany
Askorbik asit	SigmaAldrich, Almany

3.2. Cihazlar

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YBSK) sistemi ve SPD DAD dedektör	Shimadzu Kyoto, Japonya
UV- Spektrofotometre	Shimadzu Kyoto, Japonya
Su banyosu	Nüve BM 302, Türkiye
Vorteks	IkaGenius 2, Almanya
Ultrasonik Banyo	Elmasonic, Almanya
Santrifüj	Eppendorf, Almanya
Hassas Terazı	Radwag, Polonya
Otomatik pipetler (0.1mL- 1mL,5mL)	Eppendorf, Almanya
LiyofilizatörL	Labconco, ABD
Rotavapor	Buchi, Labortechnik AG, Almanya

3.3. Bitkisel Materyal

Tablo 3.1. Kullanılan bitkisel materyaller, lokaliteleri, toplanma zamanları ve Herbaryum numaraları

Bitki Adı	Familyası	Drog	Lokale-Herbaryum No
<i>Achillea ketenoglui</i> H.Duman	Asteraceae	Herba	Eskişehir; Yazırköyü-Günyüzü arası Temmuz 2018 ESSE 15798
<i>Achillea millefolium</i> L.	Asteraceae	Herba	Eskişehir; Yazırköyü-Günyüzü arası Temmuz 2018
<i>Achillea phrygia</i> Boiss. Et. Bal	Asteraceae	Herba	Alpu - Mihalıçık yolu 23. km Temmuz 2018 ESSE 11257
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Clusiaceae	Heba	Ankara Kızılcahamam Kurtboğazi barajı 15447 20 Temmuz 2015 HÜEF 14028
<i>Hypericum thymopsis</i> Boiss.	Clusiaceae	Herba	Sivas: Kangal -Gürün Ayrımı 5 Temmuz 2014 TEKİN 1625
<i>L. shawii</i> Roemer et Schultes	Solanaceae	Meyva	Şanlıurfa-Birecik-Halfeti yolu, Surtepe köyü Haziran 2012 ESSE15066
<i>Lycium barbarum</i> L.	Solanaceae	Meyae	Eskişehir: Odunpazarı mezarlığı Ağustos 2012 ESSE14619
<i>Lycium depressum</i> L	Solanaceae	Meyva	Nizip-Saray köyü (Birecik tarafı) - Otoban kum ocakları civarı 27 Haziran 2012 ESSE 15065

<i>Malabaila secacul</i> Banks Et Sol	Apiaceae	Meyve	Eskişehir -Ankara yolu Beylikova sapağı 26 Haziran 2020 ESSE 15806
<i>Malabaila secacul</i> Banks Et Sol	Apiaceae	Herba	Eskişehir -Ankara yolu Beylikova sapağı 25 Haziran 2020 ESSE 15806
<i>Nepeta congesta</i> Fisch. & Mey. var. <i>congesta</i> Fisch. & Mey.	Lamiaceae	Herba	Eskişehir -Ankara yolu Beylikova sapağı 25 Haziran 2020 ESSE 15805

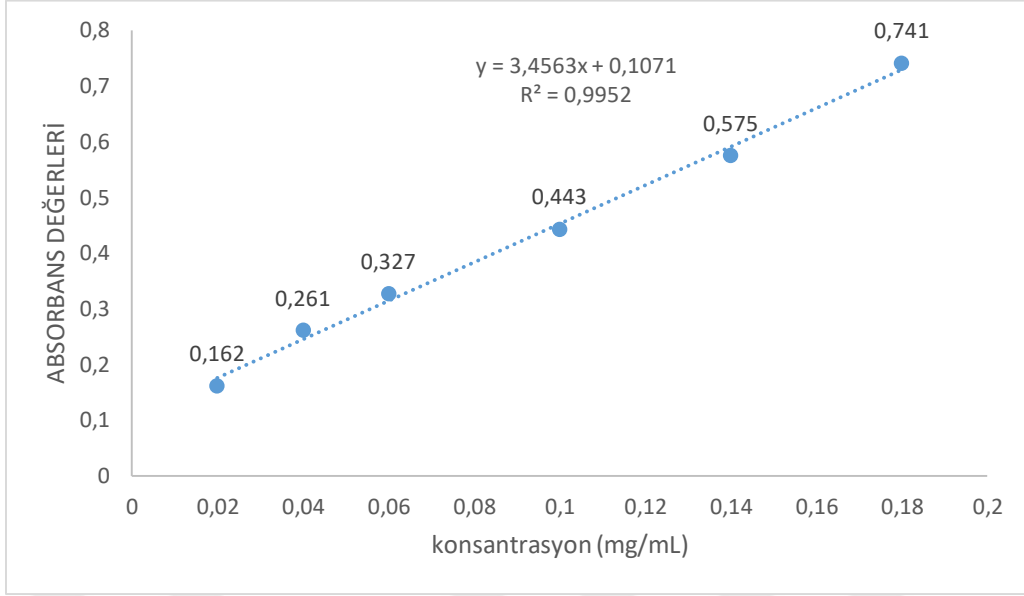
3.4. Ekstraksiyon

Yaklaşık 10 g bitkisel materyal (Tablo 3.1) üzerine 100 mL kaynar su ilave edilmiş, su banyosunda 30 dak tutulmuş, işlem 3 kez tekrarlanmış, süzöntüler birleştirilerek liyofilize edilmiştir. Elde edilen bakiye tartılarak, % ekstre verimi hesaplanmıştır

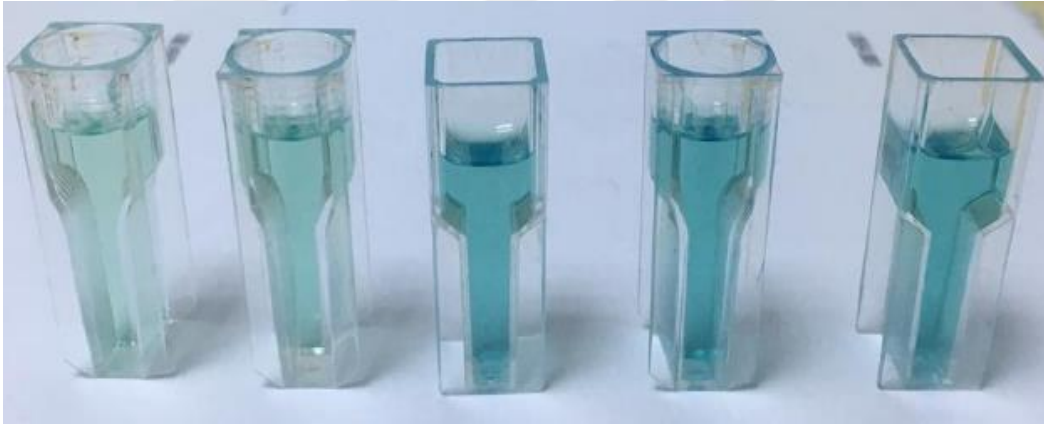
3.5. Fitokimyasal Analizler

3.5.1. Toplam fenolik madde miktar tayini

Ekstrelerin içerdiği toplam fenol miktarları Folin-Ciocaltaeu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edilmiştir (Folin ve Ciocaltaeu, 1928). Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit %50'lik metanolde çözülmüştür. 0.5 ml örnek, 2.5 ml Folin-Ciocaltaeu reaktifi (%10'luk, suda) ve 7.5 ml sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpünde karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Çözeltilerin absorbands değerleri 750 nm'de spektrofotometrede okunarak, toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. *Gallik asit kalibrasyon eğrisi*



Görsel 3.1. *Gallik asit konsantrasyonları*

3.5.2. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)-DAD yöntemi ile flavonoidlerin belirlenmesi ve miktar tayini

Günümüzde Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK), çeşitli algılama sistemleri kullanılarak flavonoidlerin ayrılmasını ve tanımlanmasını sağlayan en uygun yöntemdir. Son yıllarda kantitatif analiz sayesinde çeşitli numunelerde flavonoid bileşiklerinin eş zamanlı tayini için uygunluğunu doğrulayan çok sayıda veri yayınlanmış ve bu da incelenen materyaldeki flavonoidlerin dağılımı hakkında çok aydınlatıcı olmuştur. YBSK yöntemleri, UV diyot dizisi detektörlerinin kullanıldığı farklı tespit

sistemleri kullanılarak bitkisel materyalde flavonoidlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için geliştirilmiştir.

Tez çalışması için seçilen flavonoidlerin YBSK analizi için gerekli olan kolon çeşidi, kolon boyu, kolon iç çapı, kolon partikül boyutu, mobil faz, akış hızı gibi kromatografik koşullar belirlenerek geliştirilen yöntem valide edildikten sonra farklı türlere ait 10 farklı infüzyonun analizi gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle apigenin, kersetin, luteolin, mirisetin, rutin standartlarının maksimum absorpsiyon yaptıkları dalga boyu UV- spektrofotometre’de belirlenmiş, bu dalga boyunda YBSK-DAD cihazında Silikajel–C18 kolonda çeşitli mobil fazlarla (metanol-su-formik asit, asetonitril-su - formik asit karışımları) denemeler yapılmıştır. Ardından değişik akış hızları ve kolon sıcaklıkları ve enjeksiyon hacimleri denenmiştir. Uygun kromatografi koşulları belirlendikten sonra kalibrasyon ve validasyon işlemleri yapılmış ve geliştirilmiş bu yöntem hazırlanan infüzyon çözeltilerine uygulanmıştır.

Flavonoidler için kullanılan YBSK-DAD Analiz Şartları

Cihaz:	Shimadzu 20 AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan)
İşlemci:	Class VP Chromatography Manager Software (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Pompa:	Shimadzu LC20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolon:	INERTSIL ODS3-C ₁₈ kolon (100 mm, 4,6 mm i.d., 3 µm partikül çapı) (GL SciencesInc.)
Degazer:	DGU-20A ₅ (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Enjektör:	SIL 20A (Shimadzu, Japan)
Dedektör:	SPD-M 20A (Shimadzu, Kyoto, Japan), 360 nm
Akış hızı:	1,0 mL/dk
Enjeksiyon hacmi:	10 µL
Gradient sistem:	Hareketli Faz A: Metanol: su: formik asit (10:88:2, h/h/h)

Hareketli Faz B: Metanol: su: formik asit (90:8:2, h/h/h)

Gradient program: Başlangıç koşulu %100 A; 0-4 dak %25 B, 4-8 dak %35 B, 8-12 dak %50 B, 12-16 dak %70 B, 16-20 dak %100 B, 20-25 dak %100 A.

Standart flavonoidler su: metanol (50: 50; h/h) içinde hazırlanmış, bileşenlerin tanımlanması, YBSK-DAD analizi ve/veya numunelerden elde edilen piklerin alıkonma süresi, UV spektrumlarının otantik referans verileriyle karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Piklerin saflığı, YBSK-DAD tarafından kontrol edilmiş, her bir pikin UV spektrumları, gerçek referans örneklerinininkilerle karşılaştırılmıştır.

3.5.2.1. Validasyon

Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik yöntem validasyonu ICH kılavuzu Q2(R1) uyarınca gerçekleştirilmiştir (ICH, 2005). Stok Standart flavonoid çözeltisinden farklı konsantrasyonda standart flavonoidlerin (APİ 3.16×10^{-5} M, KER 1.73×10^{-5} M, LUT 3.37×10^{-5} M, MİR 4.95×10^{-5} M, RU 1.99×10^{-5} M) içeren çözeltiler ile çalışılmıştır. Analizler aynı gün (gün içi) ve 3 farklı günde (günler arası) yapılmış, Her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.5.2.2. Tayin ve gözlenebilme sınırı

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini saptamak için gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

3.5.2.3. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik

Stok Standart flavonoid çözeltisinden üç farklı konsantrasyonda standart flavonoidler (0.7, 2 ve 6 µg/mL) içeren çözeltiler ile çalışılmıştır. Analizler aynı gün (gün içi) ve 3 farklı günde (günler arası) yapılmış, her konsantrasyon için analizler 3 kez tekrarlanmıştır.

3.6. YBSK-DAD Yöntemi ile Fenolik asitlerin Belirlenmesi ve Miktar Tayini

Öztürk ve arkadaşlarının çalışmasında belirtilen koşullarda ters faz analitik kolon ve gradient elüsyon kullanılarak ayrılan fenolik bileşiklerin YBSK-DAD sisteminde, tutunma zamanları ve UV spektrumları kontrol edilerek çalışılan infüzyonların fenolik asitleri teşhis edilmiş, miktar tayinleri yapılmıştır (Öztürk vd., 2007).

Fenolik asitler için kullanılan YBSK-DAD Analiz Şartları

Cihaz:	Shimadzu 20 AVP (Shimadzu, Kyoto, Japan)
İşlemci:	Class VP Chromatography Manager Software (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Pompa:	Shimadzu LC20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Kolon:	INERTSIL ODS3-C18 kolon (100 mm, 4.6 mm i.d., 3 µm partikül çapı) (GL SciencesInc.)
Degazer:	DGU-20A5 (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Enjektör:	SIL 20A (Shimadzu, Japan)
Dedektör:	SPD-M 20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Akış hızı:	1.0 mL/dk
Enjeksiyon hacmi:	10 µL
Gradient sistem:	Hareketli Faz A: Metanol: su: formik asit (10:88:2, h/h/h) Hareketli Faz B: Metanol: su: formik asit (90:8:2, h/h/h)
Gradient program:	Başlangıç koşulu %100 A;1-10 dak %10 B, 10-15 dak %15 B, 15-20 dak %20 B, 20-25 dak %30 B, 25-30 dak %50 B, 30-35 dak %100 B, 35-42 dak %100A.

3.7. Biyoaktivite Çalışmaları

3.7.1. Antioksidan Aktivite Tayini

Dejeneratif süreçlerin meydana gelmesi, moleküler biyolojide vücuda zararlı olan oksidatif süreçleri teşvik eden serbest radikallerin varlığıyla ilişkilidir. Bitkilerin serbest radikalleri (karotenoid, polifenolik (fenolik asit, flavonoid, antosiyanin, tanen gibi), doymamış yağ asitleri, vitaminler, enzimler ve kofaktörler) yakalayabilen antioksidan özelliklere sahip bileşiklerince zengin olması, bunların profilaktik ve iyileştirici fitoterapide kullanımını arttırmıştır (Munteanu vd.,2021).

Daha yakın zamanlarda, reaktif oksijen türleri (ROS), özellikle serbest radikallerin, kanser ve ateroskleroz dâhil olmak üzere birçok kronik hastalıkta yer aldığı kabul edilmiştir. Aynı zamanda hücrelerde ve dokularda meydana gelen zararlı ROS oldukça kararsız biyokimyasal maddeler olduğundan, hücrelerdeki ve kandaki yağı oksitleyerek yaşlanmanın ana nedeni olan lipid peroksidleri oluştururlar.

Serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önlemek için potansiyel bir çözüm, Toplam Antioksidan Kapasitenin (TAC) ölçümü bitkisel antioksidan rolünün değerlendirilmesinde yararlı bir araçtır. Bitkilerden hazırlanan ekstraktların toplam antioksidan kapasitesi, antioksidan bileşenlerin varlığını ve aktivitesini yansıtır.

Polifenollerce zengin bitkilerin TAC düzeylerini değerlendirmenin en popüler yöntemleri: spektrofotometrik ABTS, spektrofotometrik DPPH• ve floresan ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi), indükleyici güç, FeSO₄ iyonlarını şelatlama kapasitesi v.b.

3.7.2. DPPH• üzerinden Radikal Süpürücü Etki

Kararlı 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikali bir elektron veya hidrojen alma yeteneğine sahiptir. Antioksidanların, DPPH• radikale bir hidrojen atomu verme yetenekleri üzerinden süpürücü etki gösterirler. Bu yöntem ile antioksidanların kararlı DPPH• radikalini, indirgenmiş 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH-H) formuna getirme yetenekleri değerlendirilir. DPPH radikali, metanollü çözeltide okside formunda yaklaşık 517 nm de maksimum absorbans verir (Molyneux, 2004).

Bu metot basit, hızlı ve birçok örneğin radikal süpürücü aktivitesini izlemek için oldukça elverişli bir metottur. Ancak ışığa, oksijene ve kirliliğe olan hassasiyeti bu metodun kullanıma bazı sınırlamalar getirmektedir (Mot vd., 2011).

Çalışılan infüzyonlardan hazırlanan çözeltilerin DPPH• üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. (Sanchez-Moreno vd. 1998)

Metanolde hazırlanmış 0.4 ml örnek çözeltisi 3.6×10^{-3} mg/ml) üzerine, metanolde hazırlanmış 3 ml DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek, vortekste 30 saniye karıştırılmış ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm’de absorbans değerleri kaydedilmiş, % inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{kontrol absorbansı} - \text{örneğin absorbansı}}{\text{kontrol absorbansı}} \times 100$$

Her test 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmış, referans madde olarak sentetik antioksidan BHT kullanılmıştır.

3.7.3. ABTS radikal katyon renksizleştirme yöntemi

Antioksidan aktivitenin taranması için flavonoidler, hidroksisinamatlar, karotenoidler ve plazma antioksidanları dahil olmak üzere hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlara uygulanabilen bir renk giderme deneyi olarak rapor edilmiştir. 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)'in (ABTS^{•+}) önceden oluşturulmuş radikal monokasyonu, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu ile üretilir ve hidrojen veren antioksidanların varlığında indirgenir.

Antioksidan aktivite belirlenirken, radikal katyon emiliminin inhibisyonu üzerine hem antioksidan konsantrasyonunun hem de reaksiyon süresinin etkileri dikkate alınmalıdır (Re vd., 1999).

İnfüzyonların, ABTS^{•+} radikal süpürücü aktivitesi Re ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre gerçekleştirilmiştir (Re vd., 1999).

Reaktif çözeltisinin hazırlanması; 10 mL 7mM ABTS çözeltisi ile 176 µL 140 mM K₂S₂O₈ karıştırılarak 12-16 saat karanlıkta bekletilmiştir. ABTS'in potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucunda ABTS radikal katyonu oluşmaktadır. Her çalışma öncesi taze hazırlanması gereken bu reaktif, 753 nm'de absorbansı 0,700 (± 0.02) olacak şekilde etanol ile seyreltilerek antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır.

Reaksiyon için, 10 µL örnek çözeltisi (0.5 mg/mL konsantrasyonda) üzerine 1 mL reaktif çözeltisi ilave edilerek 5 dakika beklenmiş ve 753 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Çalışmada kör olarak etanol, pozitif kontrol olarak BHT ve askorbik asit (0.5 mg/mL) kullanılmıştır. Deney sonunda, ABTS radikal katyonunun % giderimi aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Total Antioksidan Aktivite} = \left[\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right] \times 100$$

$A_{kontrol}$ = ABTS^{•+} reaktif çözeltisinin absorbansı (753 nm)

$A_{örnek}$ = Ekstre içeren reaktif çözeltisinin absorbansı (753 nm)

Elde edilen sonuçlar eşitlikte yerine konarak % inhibisyon hesaplanmış, sonuçlar pozitif kontrolün (BHT ve askorbik asit) sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Ekstraksiyon Verimleri ve Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

Tez kapsamında infüzyon yöntemi ile hazırlanan ekstrelerin suda çözünen madde miktarları (% verim) hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Hazırlanan infüzyonların Folin-Ciocalteu metodu ile kolorimetrik olarak toplam fenol miktarı tespit edilmiştir. Gallik asitin farklı konsantrasyonlarından (0.02 – 0.2 mg/mL) (Tablo 4.1) elde edilen absorbans değerleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi üzerinden (Şekil 4.1) elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılarak, toplam fenol miktarı ekstrede gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmıştır (mg GAE/ g Ekstre).

Tablo 4.1. Ekstrelerinin % verim ve toplam fenolik madde miktarları (TFM)

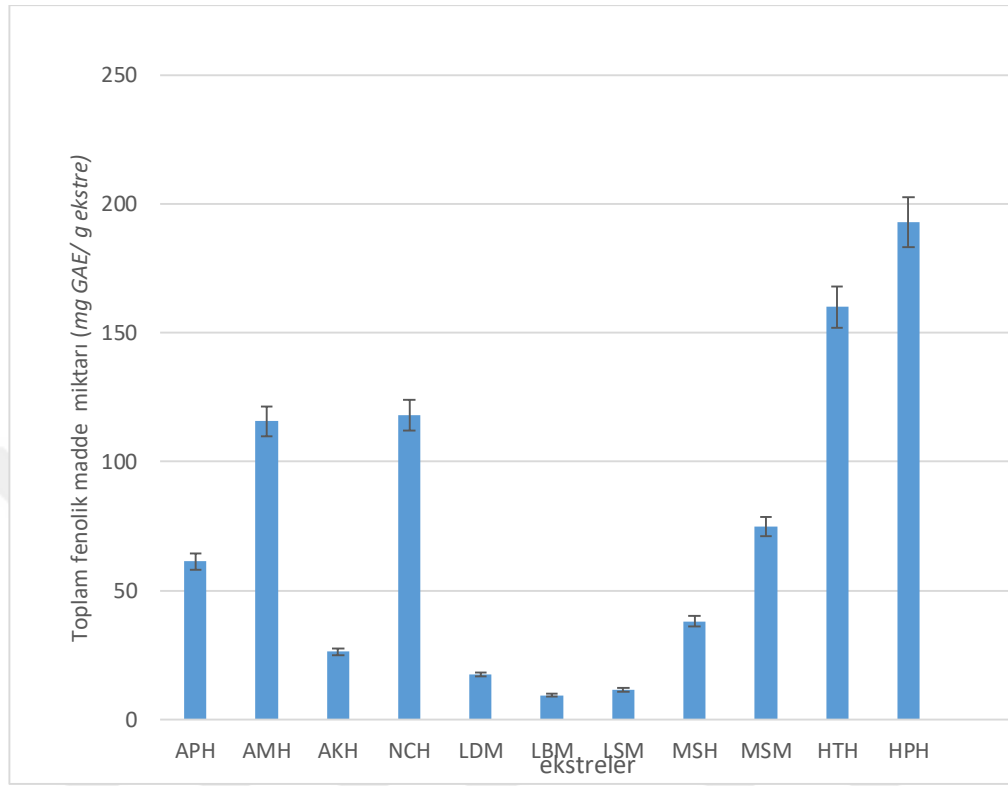
İnfüzyonlar	% VERİM	TFM (mgGAE/g ekstre)
AKH	1.8	26.36 ± 2.67*
AMH	1.5	115.67 ± 3.51
APH	1.67	61.27 ± 3.00
HPH	1.65	192.82 ± 0.33
HTH	1.96	160.03 ± 2.67
LBM	3.23	9.39 ± 6.68
LDM	3.43	17.49 ± 1.20
LSM	3.43	11.51 ± 1.00
MSM	2.76	74.97 ± 3.34
MSH	3.30	38.13 ± 1.53
NCH	3.42	118.18 ± 5.79

*standart sapma değerleri

Hazırlanan infüzyonların ekstraksiyon verimleri %1.5 (AMH)- %3.43 (LDM) arasında değiştiği görülmektedir (Tablo 4.1).

Çalışılan infüzyonlardan en fazla toplam fenolik madde miktarına sahip olan HPH ve HTH çözeltileri olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.1.'de de görüldüğü gibi infüzyonların

toplam fenolik madde miktarları en büyükten en küçüğe HPH >HTH >NCH >AMH >MSM >MSH >APH >AKH >LDM >LSM >LBM şeklinde sıralanmaktadır.



Şekil 4.1. İnfüzyonların toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/ g ekstre)

4.2. YBSK-DAD yöntemi ile Flavonoid Miktar Tayini

Halk arasında çay olarak kullanılan çeşitli çiçekli bitkilerde en sık rastlanan flavonoid bileşiklerinden apigenin, kersetin, luteolin, mirisetin, rutin miktar tayini çalışması için seçilmiştir.

Akış hızı, enjeksiyon hacmi taramalarında ve tekraredilebilirliğin incelenmesinde stok çözeltiler aşağıdaki konsantrasyonlarda metanolde seyreltilerek hazırlanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Çalışılan flavonoidlerin molekül ağırlıkları ve stok çözelti konsantrasyonları

Flavonoidler	Molekül Ağırlığı	Stok konsantrasyonları
Apigenin	270.05 g/mol	$7.5 \times 10^{-4}M$
Kersetin	302.24 g/mol	$1.8 \times 10^{-3}M$
Luteolin	282.24 g/mol	$1.41 \times 10^{-3}M$
Mirisetin	192.21 g/mol	$5.2 \times 10^{-4}M$
Rutin	610.51 g/mol	$8.3 \times 10^{-4}M$

Daha sonra stok çözeltileri hazırlanan standart flavonoidlerin standart karışım çözeltisi hazırlanmıştır (Tablo 4.3.).

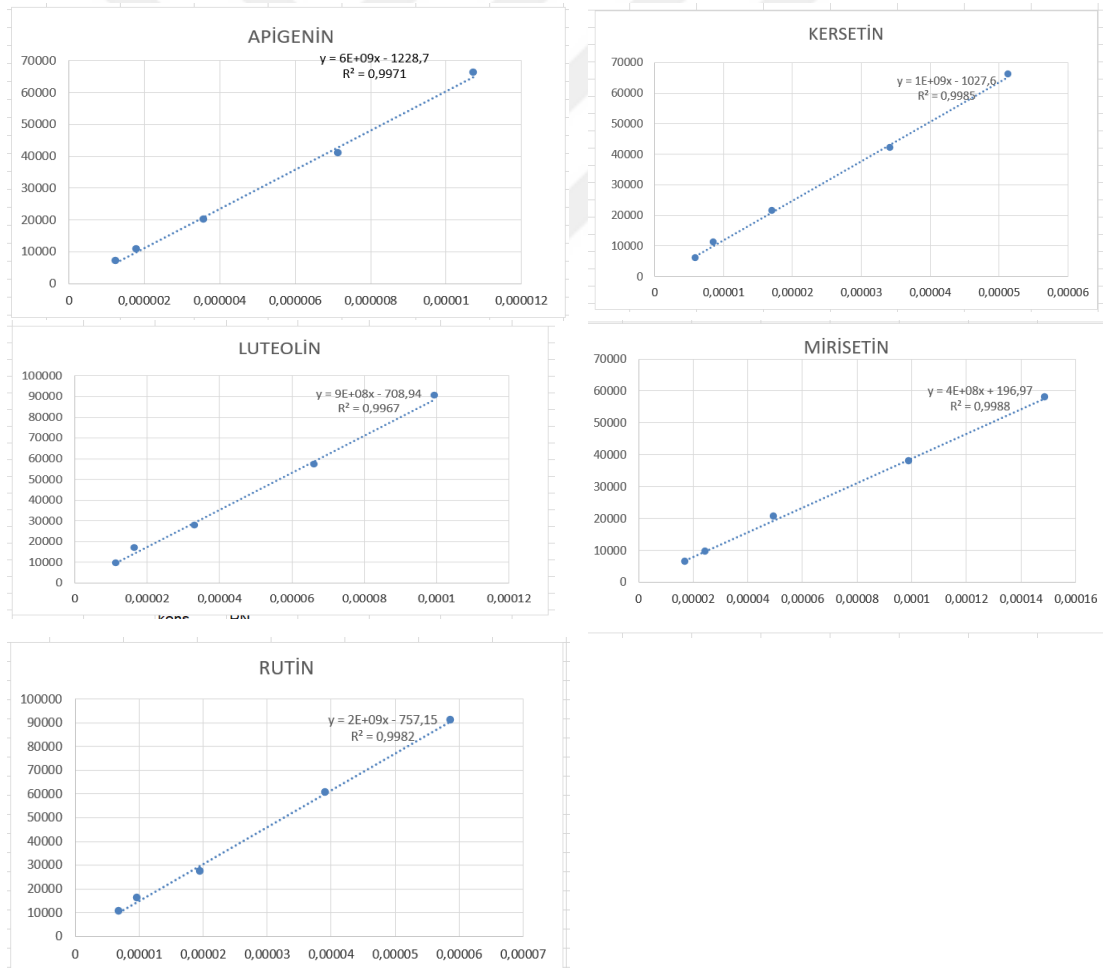
Tablo 4.3. Standart karışım çözeltisindeki flavonoidleri konsantrasyonları

Flavonoidler	Karışımındaki konsantrasyonları
Apigenin	$1.79 \times 10^{-4}M$
Kersetin	$8.57 \times 10^{-5}M$
Luteolin	$1.68 \times 10^{-4}M$
Mirisetin	$2.47 \times 10^{-4}M$
Rutin	$9.94 \times 10^{-5}M$

Hazırlanan standart flavonoid karışımından 0.7; 1.0; 2.0; 4.0 ve 6.0 mL alınarak 10 mL metanolde seyreltilerek, 5 farklı kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Standart flavonoid karışımından hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin derişimleri

Flavonoidler	0.7mL/10 mL	1mL/10mL	2mL/10mL	4mL/10mL	6mL/10mL
Apigenin	$1.25 \times 10^{-5} \text{M}$	$1.79 \times 10^{-5} \text{M}$	$3.59 \times 10^{-5} \text{M}$	$7.19 \times 10^{-5} \text{M}$	$1.08 \times 10^{-4} \text{M}$
Kersetin	$6.06 \times 10^{-6} \text{M}$	$8.66 \times 10^{-6} \text{M}$	$1.73 \times 10^{-5} \text{M}$	$3.46 \times 10^{-5} \text{M}$	$5.20 \times 10^{-5} \text{M}$
Luteolin	$1.18 \times 10^{-5} \text{M}$	$1.68 \times 10^{-5} \text{M}$	$3.37 \times 10^{-5} \text{M}$	$6.74 \times 10^{-5} \text{M}$	$1.01 \times 10^{-4} \text{M}$
Mirisetin	$1.73 \times 10^{-5} \text{M}$	$2.47 \times 10^{-5} \text{M}$	$4.95 \times 10^{-5} \text{M}$	$1.98 \times 10^{-5} \text{M}$	$1.49 \times 10^{-4} \text{M}$
Rutin	$6.96 \times 10^{-6} \text{M}$	$9.94 \times 10^{-6} \text{M}$	$1.98 \times 10^{-5} \text{M}$	$3.97 \times 10^{-5} \text{M}$	$5.97 \times 10^{-5} \text{M}$



Şekil. 4.2. Çalışılan flavonoidlerin kalibrasyon grafikleri

Standart flavonoid karışımları farklı konsantrasyonlarda YBSK-DAD sistemine enjekte edilerek kromatografiye edilmiş, elde edilen kromatogramlarda tesbit edilen alan değerleri – konsantrasyonlar ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.2).

4.3. Doğrulama Çalışmaları

4.3.1. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Kesinlik testleri (tekrarlanabilirlik), standart flavonoid çözeltisi hazırlanarak YBSK-DAD sistemine enjekte edilmiştir (n= 3).

Enjeksiyonlardan sonra pik alanlarının tutunma zamanlarına oranı ile hesaplanan pik normalizasyon (PN) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. Deneylerin bağıl standart sapmaları (RSD) ve standart sapmaları (SD) olarak tekrarlanabilirlik değerlendirmesi Tablo 4.5.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Çalışılan flavonoidlerin kesinlik testi sonuçları (PN oranı olarak) (n=3)

	API	KER	LUT	MİR	RU
SD	29.92	31.37	31.52	23.28	35.16
RSD	0.41	0.56	0.28	0.35	0.33

Piklerin alanları yerine PN değerleri kullanılarak deneylerin kesinliğinin arttığı gözlenmiştir. Sonuçlar oldukça tekrarlanabilir; bağıl standart sapma değerleri 0.28–0.56 aralığındadır. Bu da yöntemin oldukça güvenilir olduğunu göstermektedir.

4.3.2. Doğrusallık (Linearity)

Çalışılan flavonoidlerin standart çözeltileri, 1.10^{-5} - 10^{-6} M konsantrasyonda hazırlanmış ve YBSK'ye enjekte edilmiş (n=3), kalibrasyon denklemleri, 360 nm'de flavonoit konsantrasyonlarına karşı pik normalizasyon değerleri kullanılarak oluşturulmuştur.

Flavonoidlerin pik normalizasyon değerleri kesinlik testlerinde belirtildiği gibi hesaplanmıştır. LOD ve LOQ, sırasıyla 3.3 ve 10'un s/a ile çarpılmasıyla hesaplanmış burada s; kesişimin standart sapması, a; regresyon denkleminin eğimidir.

Çalışılan flavonoidlerin standart sapmaları, korelasyon katsayısı (r), teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri ile kalibrasyon parametreleri Tablo 4.6 'de verilmiştir.

Tekrarlanabilirlik ve lineerlik sonuçlarının tayin amacıyla güvenilir olması nedeniyle, yöntemin bitkisel ekstrelerde bulunan flavonoit bileşiklerinin analizi için kullanılabileceğine karar verilmiştir.

Tablo 4.6. 360 nm'de flavonoitlerin kalibrasyon parametreleri (Korelasyon katsayısı (r), LOD ve LOQ değerleri (n = 4))

Flavonoidler	Kalibrasyon eşitliği	r	LOD (Molarite)	LOQ (Molarite)
RU	$y = 1.10^9x - 1981.8$	0.9984	7.79×10^{-7}	2.36×10^{-6}
MİR	$y = 4.10^8x + 421.92$	0.9963	6.5×10^{-6}	1.97×10^{-5}
KER	$y = 1.10^9x - 552.43$	0.9987	3.89×10^{-6}	1.18×10^{-5}
LUT	$y = 8.10^8x + 1383.6$	0.9943	7.25×10^{-7}	2.19×10^{-6}
APİ	$y = 5.10^8x + 892.85$	0.9977	6.25×10^{-7}	1.89×10^{-6}

4.3.3. Validasyon

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi APİ $3.16 \times 10^{-5}M$, KER $1.73 \times 10^{-5}M$, LUT $3.37 \times 10^{-5}M$, MİR $4.95 \times 10^{-5}M$, RU $1.99 \times 10^{-5}M$ derişimdeki çözeltileri 6 ayrı enjeksiyonla ve birbirini takip eden 3 günde YBSK ile analiz edilmiştir. Pik normalizasyon değerleri kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler Tablo 4.7 'de verilmektedir.

Tablo 4.7. Çalışılan Flavonoid bileşiklerine ait Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Çalışmalarının İstatistiksel Değerlendirmesi

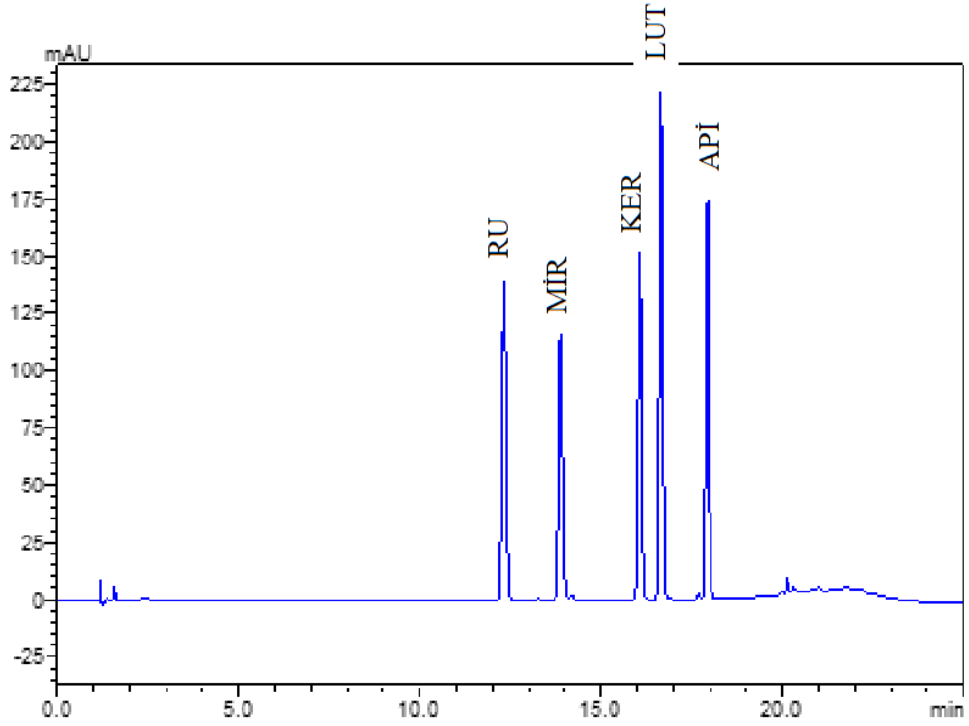
Flavonoid		Gün içi kesinlik			Günler arası Kesinlik
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	Günler arası
API	Ortalama	20344	20684	19973	22331
	SS	393.5	279.5	171.3	481.3
	%BSS	1.93	1.35	0.85	2.15
KER	Ortalama	29272	28592	29145	29926
	SS	556.71	453.21	399.78	569.9
	%BSS	1.90	1.58	1.37	1.90
LUT	Ortalama	29827	30145	29592	30721
	SS	373.3	585.6	456.7	650.8
	%BSS	1.25	1.94	1.54	2.11
MİR	Ortalama	21720	21938	22678	22712
	SS	281.6	306.5	345.2	477.7
	%BSS	1.29	1.39	1,52	2.10
RU	Ortalama	26865	26915	27417	27065
	SS	413.2	435.15	352.4	544.26
	%BSS	1.53	1.61	1.28	2.04

SS: Standart Sapma, % BSS: % Bağıl Standart Sapma,

Tablo 4.7.'de de görüldüğü gibi düşük % bağıl standart sapma (%BSS) değerleri veren Yüksek tekrar edilebilirlik sonuçları elde edilmiştir.

Şekil 4.3. YBSK-DAD sisteminde C-18 silikajel kolonda 360 nm'de kaydedilen standart flavonoid karışımının kromatogramını göstermektedir. Bileşikleri daha kısa bir analiz süresi içinde verimli bir şekilde ayırmak için mobil faz **A**: Metanol: su: formik asit (10:88:2), **B**: Metanol: su: formik asit (90:8:2) bileşimlerinden oluşan gradient elüsyon sistemi kullanılmıştır.

Çözünürlük ve analiz süresi, tatmin edici bir sonuç elde edilene kadar elüsyon programı ayarlanarak iyileştirilmiştir.



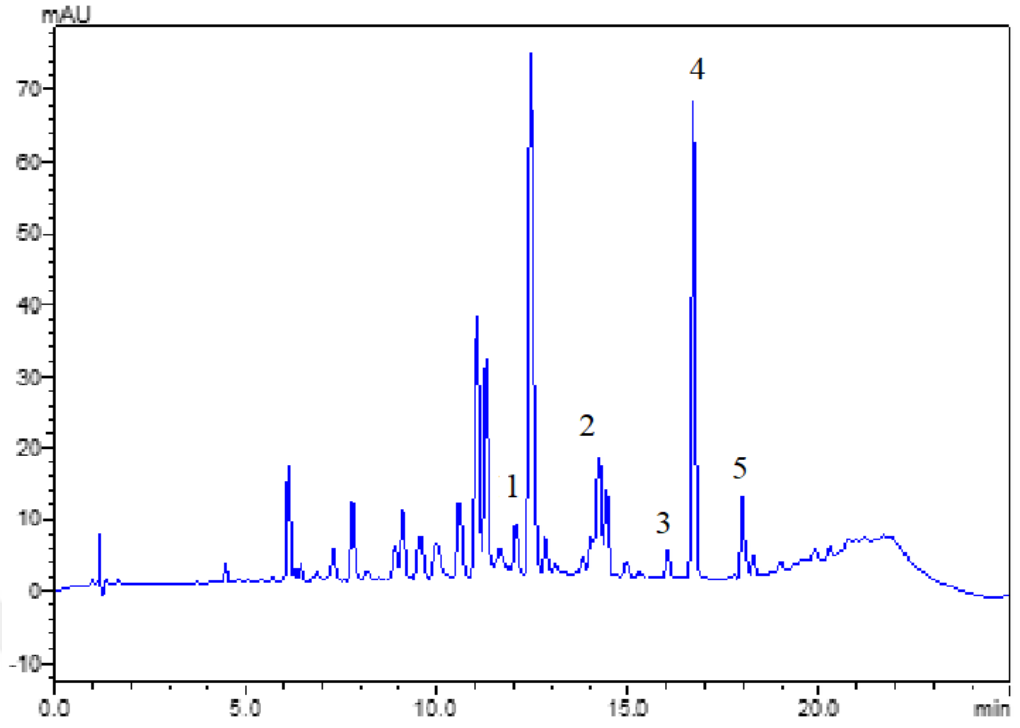
Şekil 4.3. Standart flavonoid karışımı YBSK-DAD kromatogramı

Çalışılan flavonoidlerden rutin (RU) 12.51 dak, mirisetin (MİR) 13.91. dak, kersetin (KER) 16.01 dak, luteolin (LUT) 16.68. dak, apigenin (API) ise 17.96. dak'da elüe edilmiştir.

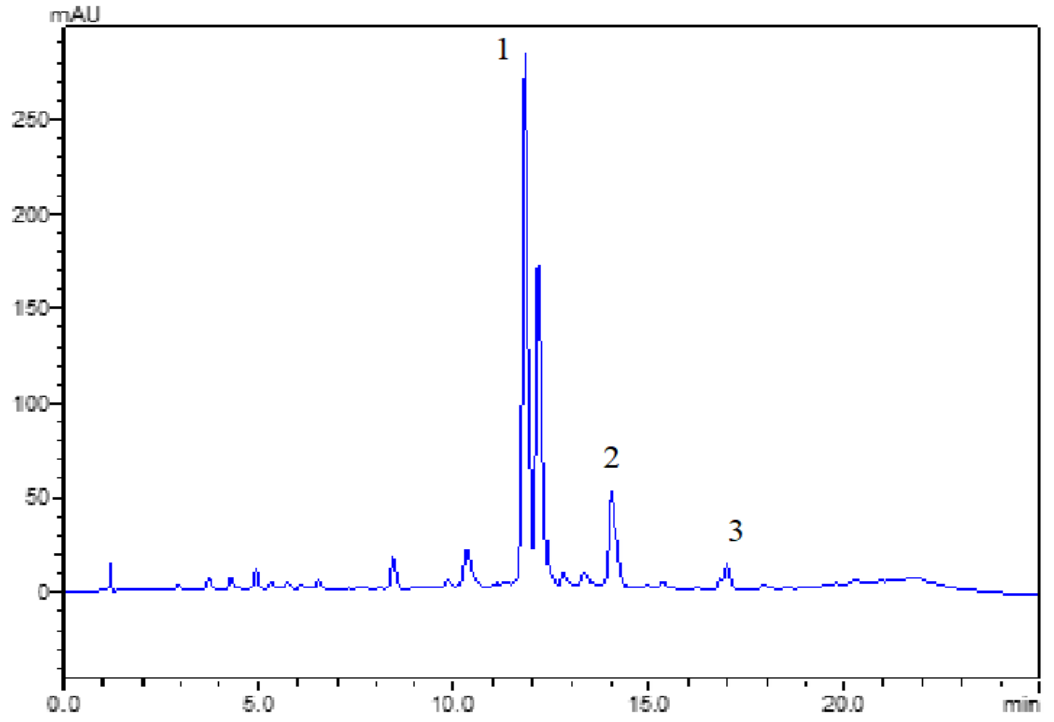
4.3.4. Geliştirilen ters faz YBSK-DAD yönteminin infüzyonlara uygulanması

Standart kromatogramına ait yöntem validasyonu tamamlandıktan sonra, çalışılan farklı türlerden hazırlanan infüzyonların 5 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan MeOH: Su'lu çözeltileri 0.45 µL'lik membran filtrelerden süzülerek, aynı kromatografik şartlarda C-18 kolonda elüe edilmiştir.

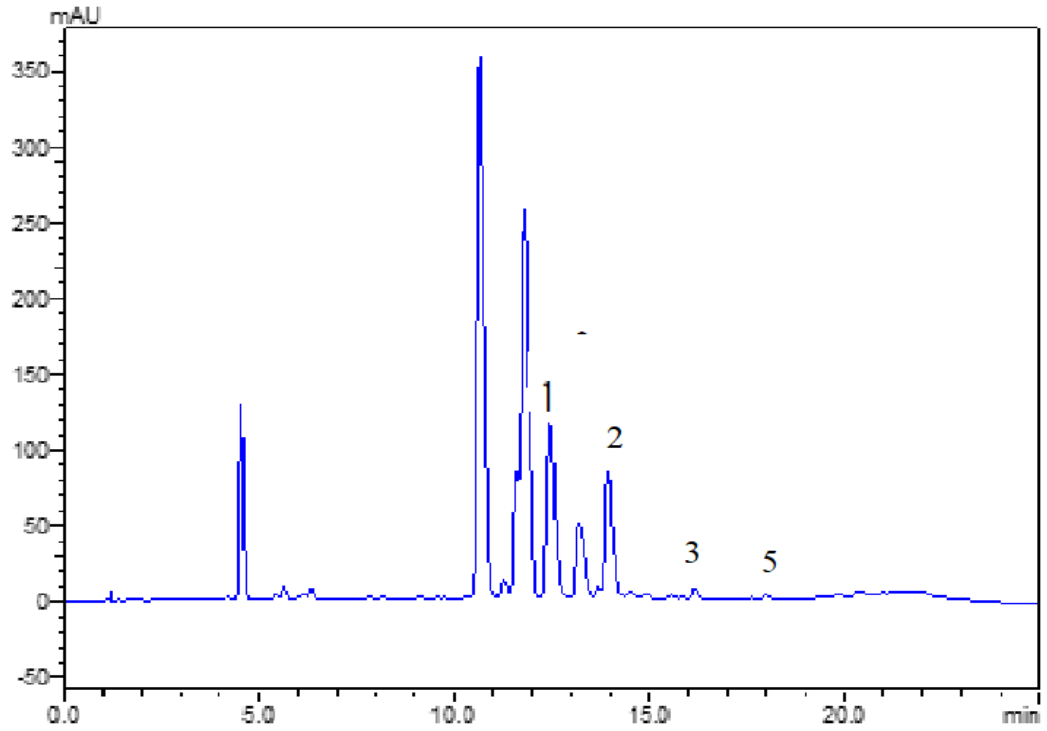
Kromatografik analizler sonucu elde edilen infüzyon kromatogramlarından bazıları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4; Şekil 4.5.; Şekil 4.6.)



Şekil 4.4. APH infüzyonunun flavonoid YBSK-DAD kromatogramı



Şekil 4.5. MSM infüzyonunun flavonoid YBSK-DAD kromatogramı



Şekil 4.6. HTH infüzyonunun flavonoid YBSK-DAD kromatogramı

İnfüzyon kromatogramlarında tespit edilen flavonoidlere ait pik alanları ve Rt (tutunma faktörleri) tespit edilerek pik normalizasyon değerleri (PN) üzerinden miktar tayinleri, her flavonoide ait kalibrasyon denklemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnfüzyonların içerdiği flavonoid konsantrasyonları mg/ g olarak hesaplanarak, değerler Tablo 4.8'te özetlenmiştir.

Geliştirdiğimiz YBSK metoduna göre çalışılan *Achillea* türlerinden AMH infüzyonunda RU (1.58 mg/g ekstre) ve LUT (1.06 mg/g ekstre) başlıca flavonoidler olarak tespit edilirken, AKH infüzyonunda API (0.32 mg/g ekstre) ve RU (0.27mg/g ekstre) , APH infüzyonunda ise KER (0.54 mg/g ekstre) ve MİR (0.40 mg/g ekstre) başlıca flavonoidler olarak bulunmuştur.

Çalışılan *Lycium* türlerinin meyva infüzyonlarından hepsinde RU ve API'ne rastlanmıştır. LBM meyva infüzyonunda RU (10.49 mg/g ekstre) ve LUT (0.81 mg/g ekstre) API (0.48 mg/g ekstre) başlıca flavonoidler olarak tespit edilirken, LDM infüzyonunda LUT (0.34 mg/g ekstre), LSM infüzyonunda ise RU (1.02 mg/g ekstre) ve API (0.90 mg/g ekstre) başlıca flavonoidler olarak tayin edilmiştir.

Tablo 4.8. *İnfüzyonların YBSK_DAD sisteminde tayin edilen flavonoid miktarları*

İnfüzyonlar	Flavonoid miktarları (mg/g ekstre)				
	API (mg/g)	KER (mg/g)	LUT (mg/g)	MİR (mg/g)	RU (mg/g)
AKH	0.32	-	0.21	-	0.27
AMH	0.21	0.22	1.06	0.22	1.58
APH	0.18	0.54	0.19	0.40	0.27
HPH	0.90	5.55	0.28	1.50	15.06
HTH	0.18	0.31	0.11	3.78	3.97
LDM	0.04	-	0.34	-	0.15
LBM	0.48	-	0.81	-	0.49
LSM	0.90	-	-	-	1.02
MSM	0.07	0.35	0.02	3.44	5.12
MSH	0.15	0.31	0.22	2.91	4.72
NCH	0.04	0.08	0.01	0.32	0.67

YBSK-DAD yöntemi ile flavonoid tayin yöntemini uyguladığımız *Hypericum* türleri arasından *H. perforatum* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (PH) başlıca flavonoid bileşikleri RU (15.6 mg/g ekstre), KER (5.55 mg/g ekstre), MİR (1.5 mg/g ekstre) bulunurken, *H. thymopsis* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda RU (3.97 mg/g ekstre), MİR (3.78 mg/g ekstre) ve KER (0.31 mg/g ekstre), olarak tayin edilmiştir.

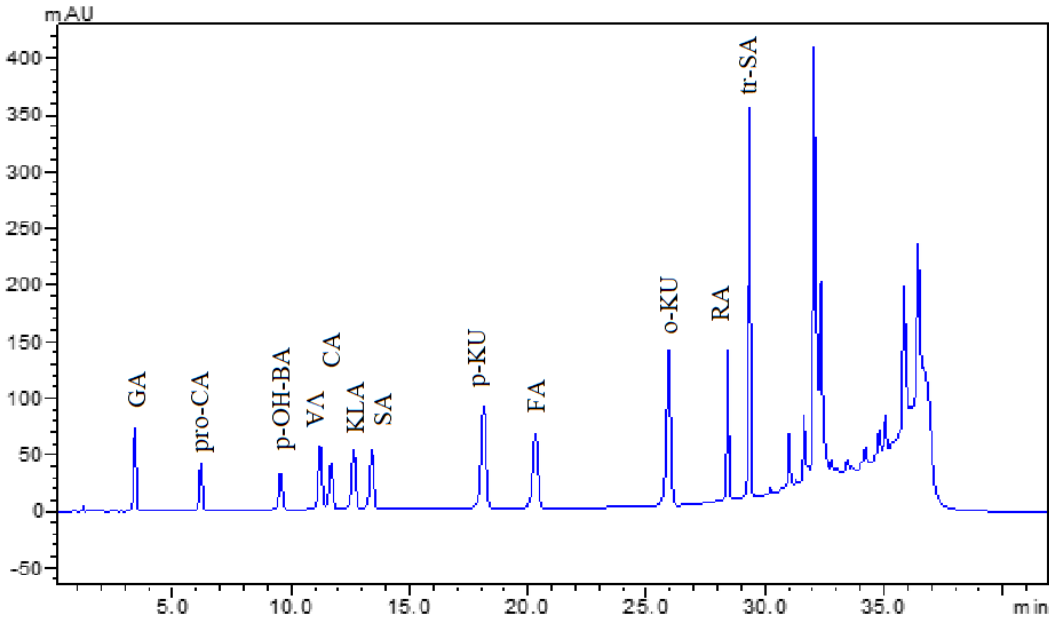
Malabaila secacul topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (MSH) başlıca flavonoid bileşikleri RU (5.12 mg/g ekstre), MİR (3.44 mg/g ekstre), KER (0.35 mg/g ekstre) olarak bulunurken, *meyvalar* dan hazırlanan infüzyonda (MSM) ise RU (4.72 mg/g ekstre), MİR (2.91 mg/g ekstre) ve KER (0.31 mg/g ekstre) olarak tesbit edilmiştir. Sonuçlardanda anlaşılacağı gibi *Malabaila secacul* topraküstü kısımları, meyvalarından daha fazla miktarda flavonoid bileşiği taşımaktadır.

Tablo 4.8.'te gösterildiği gibi, *Nepeta congesta* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (NCH) en bol bulunan flavonoid bileşiğinin RU (0.67 mg/g ekstre) olduğu, onu MİR> KER> APİ> LUT izlediği görülmüştür.

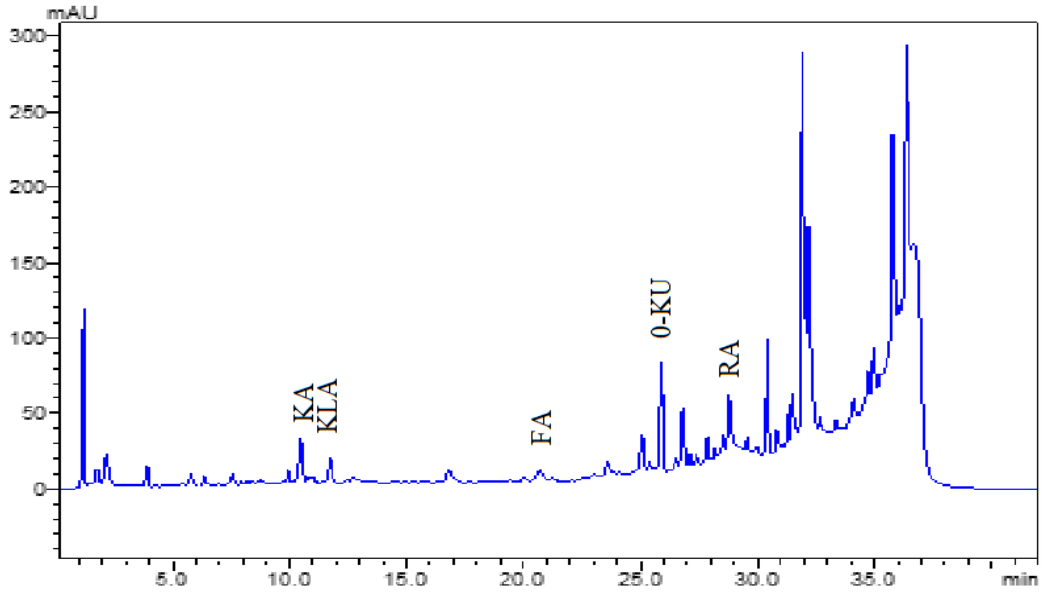
4.4. Ters faz YBSK-DAD Yöntemi ile Fenolik asitlerin Miktar Tayini

Çalışılan infüzyonlarda bulunan antioksidan aktiviteden sorumlu olduğu düşünülen polifenolik bileşiklerden fenolik asitlerin belirlenmesi ve miktar tayinleri, Öztürk ve arkadaşları tarafından daha önce geliştirilen yöntemde belirtilen koşullarda ters faz analitik kolon ve gradient elüsyon kullanılarak 280 nm'de Shimadzu LC 20A YBSK YBSK-DAD sisteminde gerçekleştirilmiştir (Öztürk vd., 2007).

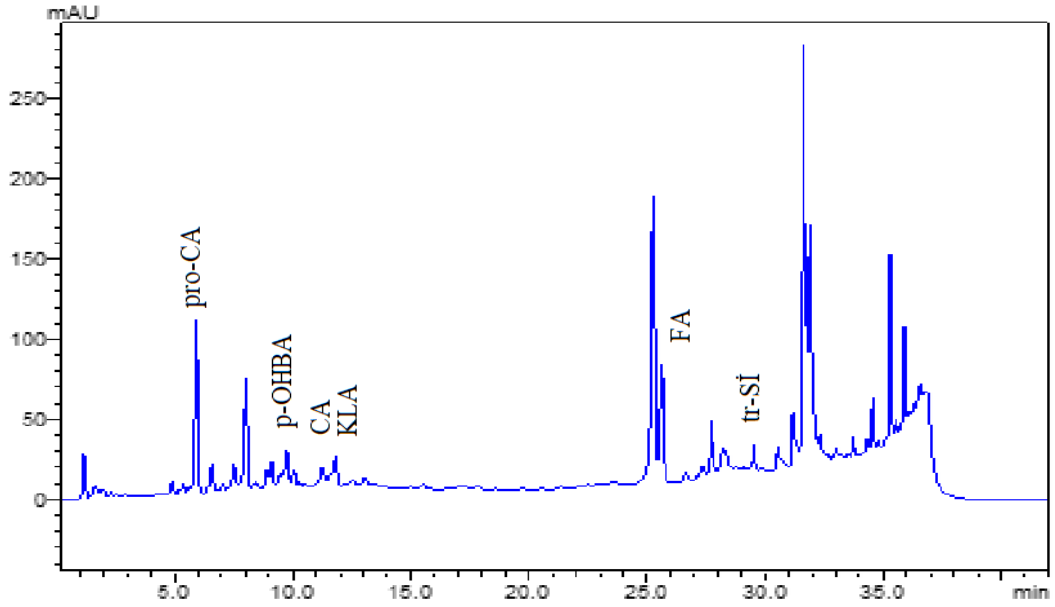
Standart fenolik asit karışımı kromatogramı (Şekil 4.7.) ve seçilmiş infüzyonların fenolik asit kromatogramları (Şekil 4.8; Şekil 4.9; Şekil 4.10; Şekil 4.11.) aşağıda verilmiştir.



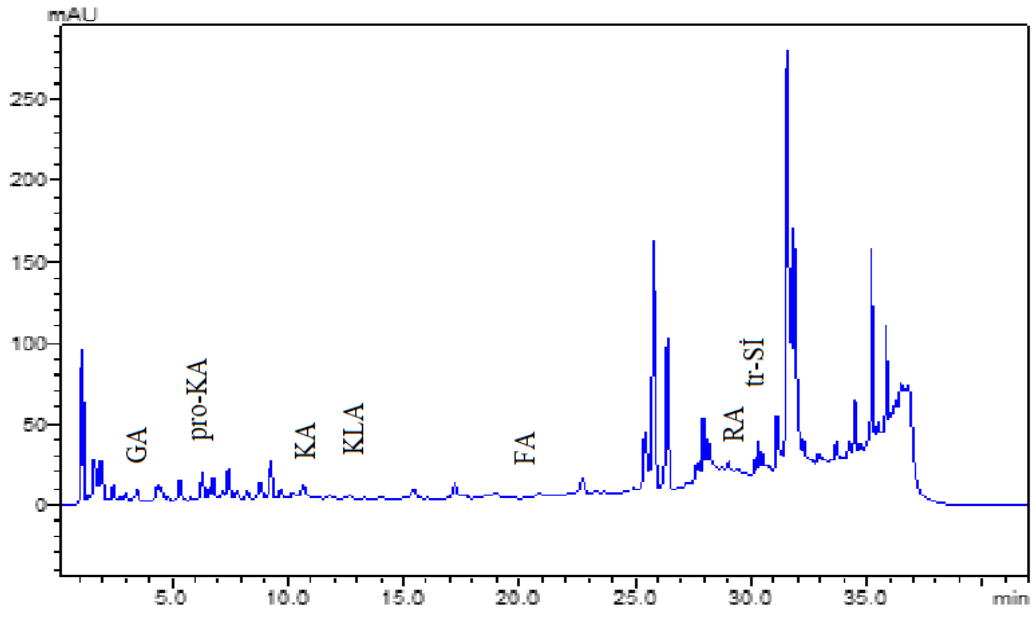
Şekil 4.7. Standart fenolik asit karışımı YBSK-DAD kromatogramı



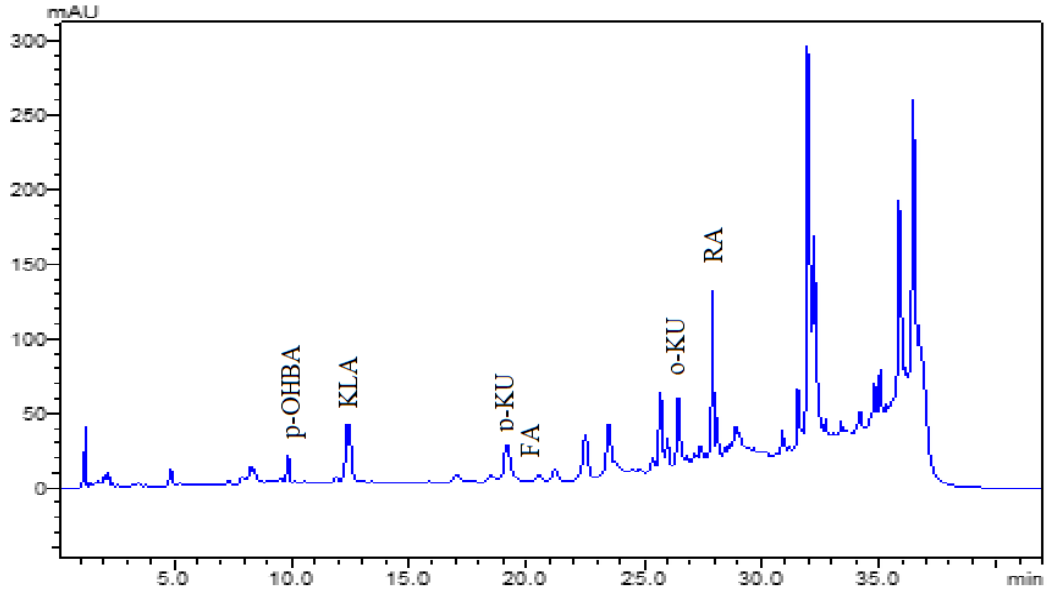
Şekil 4.8. AMH infüzyonunun fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı



Şekil 4.9. HPH infüzyonunun fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı



Şekil 4.10. MSM infüzyonunun fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı



Şekil 4.11. NCH infüzyonunun fenolik asit YBSK-DAD kromatogramı

Tablo 4.9. Çalışılan ekstrelerin ters-faz YBSK ile Tespit Edilen Fenolik Asit Miktarları

Fenolik asitler	Fenolik asit miktarları (µg/g ekstre)										
	AKH	AMH	APH	HPH	HTH	LDM	LBM	LSM	MSM	MSH	NCH
GA	0.11	1.01	0.11	0.25	0.4	0.1	0.11	-	0.25	0.34	0.15
proto-CA	-	0.65	-	0.73	0.75	0.28	-	-	0.94	0.73	0.15
p-OHBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KA	0.21	1.28	0.45	0.58	0.33	-	-	-	0.29	0.32	0.4
KLA	0.47	1.14	-	0.94	1.29	-	-	-	1.17	1.25	7.63
VA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SA	-	0.50	-	2.38	0.12	-	-	-	0.15	0.12	-
p-KU	-	0.32	-	0.72	0.29	0.19	0.11	-	0.28	0.39	0.45
FA	0.17	1.46	1.67	1.12	0.23	-	-	-	0.81	0.52	0.83
o-KU	0.54	16.94	0.30	0.91	0.21	-	-	-	0.10	0.52	0.80
RA	0.55	2.4	1.55	-	-	-	-	-	0.45	0.54	1.17
tr-Sİ	0.25	0.51	1.24	1.08	0.96	0.63	0.35	0.71	0.92	0.98	0.36

Tablo 4.9'a göre çalışılan *Achillea* türlerinin topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonlardan *A. milleifolia* topraküstü kısımlarının (AMH) infüzyonunda en fazla bulunan fenolik asit o-KU (16.94 µg/g ekstre) olurken, onu FA> RA> tr-Sİ >KA izlemektedir. Diğer *Achillea* türlerinden AKH'da ana fenolik asit RA ve KLA, APH infüzyonunda RA> FA> KA bulunurken, KLA 'e rastlamamıştır.

N. congesta var. *congesta* (NCH) infüzyonunda en fazla bulunan fenolik asitler KLA ve RA tesbit edilmiştir. Lamiaceae familyasına ait aromatik bitkilerin en önemli fenolik maddelerinden biri olan rosmarinik asit, çalışmanın literatür verileriyle uyumlu olduğunu göstermektedir. Literatür incelememize göre, YBSK-DAD yöntemiyle fenolik bileşikleri incelenen Batı Azerbaycan-İran bölgesinden Haziran-Temmuz aylarında

toplanan *N. congesta* toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinde en fazla ferulik asit ($9.30 \pm 0.21 \text{ g kg}^{-1} \text{ DW}$ toz) olmakla birlikte klorojenik, kafeik ve kumarik asitler içerdği belirtilmiştir (Azizian vd.,2021). Van'da yetişen *N. congesta* var. *cryptantha* çiçeklerinin etanol ekstrelerinde en bol bulunan fenolik asit, rozmarinik asit ($17.20 \mu\text{g/g}$) olarak tespit edilmiştir (Karademir vd.,2020).

Wang ve arkadaşları *L. barbarum* meyvalarından hazırladıkları %80 MeOH ekstresinin asidik fraksiyonunda YBSK-DAD sisteminde klorojenik asit ($12.4 \mu\text{g/g}$), kafeoilkinik asit ($0.34 \mu\text{g/g}$), kafeik asit ($3.73 \mu\text{g/g}$) ve p-kumarik asit ($6.06 \mu\text{g/g}$) tayin edildiğini rapor etmişlerdir (Wang, vd., 2010).

L. barbarum meyvaların üzerinde UYBSK-UV yöntemiyle gerçekleştirilen validasyon çalışmasında 3,4-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 3-hidroksibenzoik asit, hippurik asit, kafeik asit, vanilik asit, 4-hidroksi-3 metoksifenilasetik asit, 3-(2,4-dihidroksifenil) propionik asit, p-kumarik asit, Ferulik asit bulunduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca, birçok çalışmada *L. ruthenicum*, *L. barbarum*, *L. chinense*, *L. barbarum*, *L. var. Auranticarpum* K. F. Ching, and *L. yunnanense*, *L. chinense* Mill. Var. *Potaninii* A. M. Lu. Meyvalarında hidroksi sinnamik asit türevlerinden başta kafeik asit, olmak üzere klorojenik, p- kumarik ve ferulik asit olarak tanımlanmıştır (Inbaraj vd., 2010, Jarouche vd., 2019, Zhao vd., 2019).

YBSK-DAD çalışmamızda *H. perforatum* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (HPH) başlıca fenolik asitler sırasıyla FA> tr-Sİ>KLA>0-KU>protoCA>p-KU tayin edilirken, *H. thymopsis* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (HTH) ise sırasıyla KLA> tr-Sİ> protoCA> KA tayin edilmiştir. Daha önce *H. perforatum*, sulu ekstrelerini değerlendirdiğimiz makalemizde (Öztürk vd, 2009) sırasıyla, protoCA> KLA> tr-Sİ, ayrıca *H. thymopsis* ile yapılan yayınlanmamış tez çalışmasının (Okyay, 2020) sonuçlarına göre toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ekstrede ana fenolik asit KLA (67.55 mg/g bitki), ayrıca FA> p-KU> o-KU tesbit edilmiş olması çalışmadaki sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

4.5. Antioksidan Aktivite Tayini

Toplam fenolik madde miktarları spektroskopik olarak, flavonoid ve fenolik asit miktarları da ters faz YBSK yöntemi ile kromatografik olarak belirlenen farklı türlerden hazırlanan infüzyonların antioksidan aktiviteleri; DPPH• üzerinden radikal süpürücü etki ve ABTS●+ radikal katyon renksizleştirme kapasitesi yöntemleriyle tayin edilmiştir.

4.5.1. DPPH• üzerinden radikal süpürücü etki

Bu yöntemde, çalışılan türlerden hazırlanan infüzyonların antioksidan aktiviteleri DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali üzerinden Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar test edilen konsantrasyonda % inhibisyon olarak değerlendirilmiş ve sentetik antioksidan BHT'nin %inhibisyon değeri ile karşılaştırılmıştır. İnfüzyonlar ve sentetik antioksidan BHT'nin %inhibisyon değerleri Tablo 4.10.; Şekil 4.12.) verilmiştir.

Tablo 4.10 de görüldüğü üzere, çalışılan türlerden hazırlanan infüzyonlar arasında sentetik antioksidan BHT (%inh 55.53) ile karşılaştırılacak derecede en güçlü antioksidan aktivite *H. perforatum* (HPH %inh 44.99) ve *H. thymopsis* (HTH %inh 31.89) ile *Malabaila secacul'da* (MSM ve MSH % inh 35.32-38.81 sırasıyla) gözlenmiştir. En düşük aktivite ise *Lycium* meyvaları ile hazırlanan infüzyonlarda görülmüştür; BHT> LBM (%inh 21.88)> LSM (%inh 21.13)> LDM (%inh 19.64).

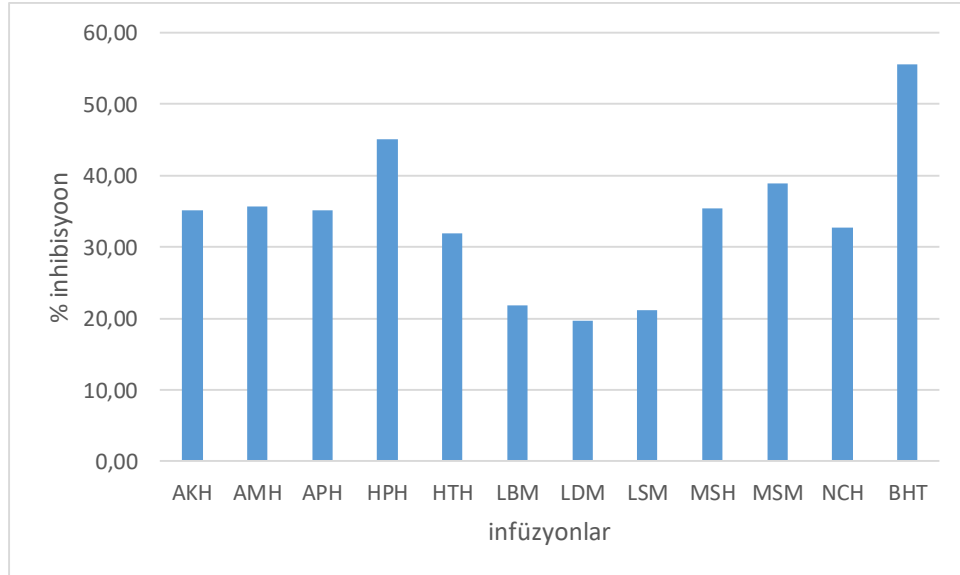
Achillea türleri de sentetik antioksidan BHT'ye göre belirgin ve birbirlerine yakın radikal süpürücü aktivite göstermişlerdir; BHT (%inh 55.53)> AMH (%inh 35.71)> AKH (%inh 35.12) >APH (%inh 35.08).

Son olarak NCH infüzyonu (%inh 32.74) da BHT'ye göre belirgin radikal süpürücü aktivite göstermiştir.

Tablo 4.10. Çalışılan ekstrelerin DPPH •serbest radikali üzerinden % inhibisyon değerleri

Ekstreler	% inhibisyon
AKH	35.12 ± 0.84 *
AMH	35.71 ± 1.19
APH	35.08 ± 0.59
HPH	44.99 ± 2.54
HTH	31.89 ± 1.89
LBM	21.88 ± 1.05
LDM	19.64 ± 0
LSM	21.13 ± 0
MSM	35.32 ± 0.68
MSH	38.81 ± 0.62
NCH	32.74 ± 7.73
BHT	55.53 ± 0.81

*SS: Standart sapma



Şekil 4.12. İnfüzyonların serbest radikal süpürücü aktivite (%inhibisyon) grafiği

4.5.2. ABTS•+ radikal katyon renksizleştirme kapasitesi

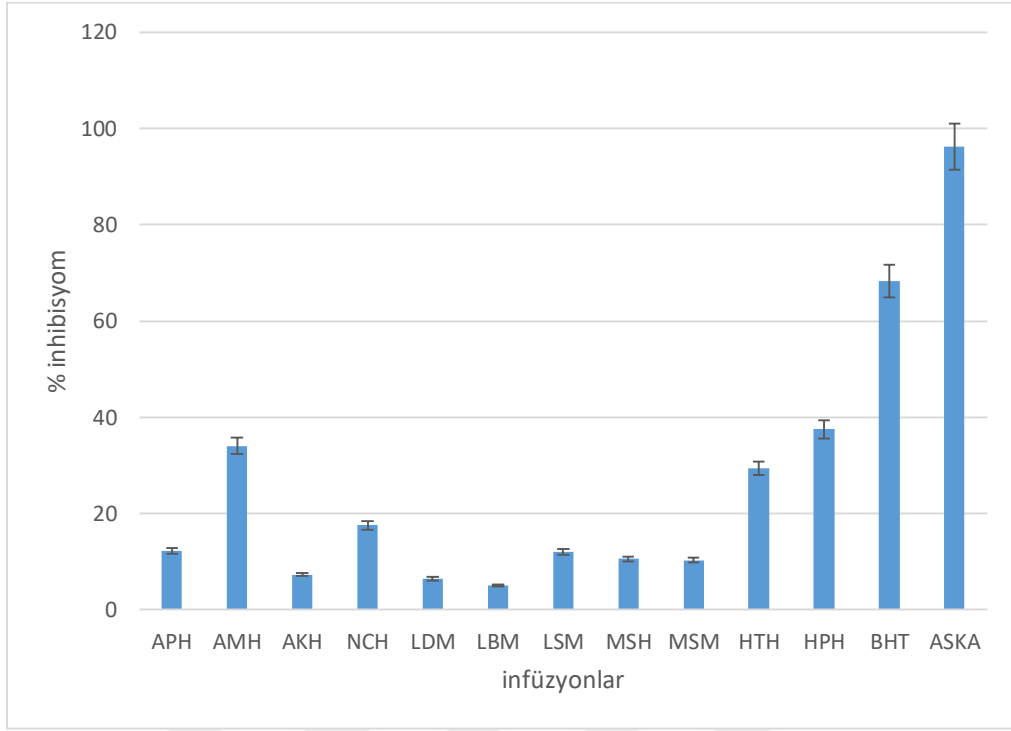
Bu metotta çalışılan infüzyonların antioksidan kapasitesi ABTS• radikal katyon renksizleştirme kapasitesine göre ölçülmüş ve sonuçlar pozitif kontrol BHT ve askorbik asit (ASA) çözeltilerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Örneklerin antioksidan aktiviteleri yüzde ABTS• inhibisyonu olarak Tablo 4.11’ de verilmiştir.

Çalışılan infüzyonlar (5 mg/mL) arasından BHT ve askorbik asit (ASA) çözeltisine (%96.24 $\pm$ 0.49) en yakın ve en güçlü ABTS• % inhibisyonu DPPH• serbest radikal süpürücü etkide de olduğu gibi HPM infüzyonunda (% inh %37.55 $\pm$ 0.098) görülmüştür. Diğer ekstrelerin ABTS• % inhibisyon değeri sırasıyla ASA> BHT> AMH (%34.075 $\pm$ 0.393)> HTH (%29.415 $\pm$ 0.049)>NCH (%17.59 $\pm$ 0.245) APH> LSM> (Şekil 4.13) olarak gözlenmiştir.

Tablo 4.11. Çalışılan infüzyonların ABTS• % inhibisyon değerleri

İnfüzyonlar	ABTS•
	% inh $\pm$ SS*
AKH	7.37 $\pm$ 0.09*
AMH	34.07 $\pm$ 0.39
APH	12.16 $\pm$ 0.049
HPH	37.55 $\pm$ 0.098
HTH	29.41 $\pm$ 0.049
LBM	5.076 $\pm$ 0.049
LDM	6.46 $\pm$ 0.049
LSM	12.03 $\pm$ 0.44
MSM	10.36 $\pm$ 0.14
MSH	10.57 $\pm$ 0.098
NCH	17.59 $\pm$ 0.24
BHT	66.35 $\pm$ 0,10
ASA	96.24 $\pm$ 0.49

*SS: Standart sapma



Şekil 4.13. *İnfüzyonların ABTS• radikal süpürücü aktivite (% inhibisyon) grafiği*

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Çalışmanın ana kapsamı, öncelikle geleneksel tedavide yaygın olarak kullanılan bazı bitkisel materyallerden hazırlanan infüzyonların flavonoid içeriklerinin değerlendirilmesinde etkili bir ters faz-YBSK-DAD yöntemi geliştirmek, ardından hazırlanan infüzyonların fenolik asitlerini belirleyerek ve antioksidan aktivitelerini tayin etmektir.

Bir bitki ekstraktının tam bir karakterizasyonunu yapmak için, seçilen yöntem spesifik olmalı ve bileşenlerin iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamalıdır. Pikler birbirinden ayrılmalı ve saflıkları UV incelemesi ile doğrulanmalıdır.

Yapılan literatür araştırmalarımızda klasik bir RP C18 kolonunun (150 mm, 3 µm) kullanılması, flavonoid bileşiklerini iyi bir şekilde ayrılmasını sağladığı tesbit edilmiştir. Bileşikler daha kısa bir analiz süresi içinde verimli bir şekilde ayırmak için mobil faz A Metanol: su: formik asit (10:88:2) ve mobil faz B Metanol: su: formik asit (90:8:2)'den oluşan optimize edilmiş gradient elüsyon sistemi kullanılmıştır. Şekil 4.3, 360 nm'de kaydedilen flavonoid standart karışımının kromatogramını göstermektedir. Çözünürlük ve analiz süresi, tatmin edici bir sonuç elde edilene kadar elüsyon programı ayarlanarak iyileştirilmiştir.

Flavonoidlerin çoğu, %50-70 Mobil faz B (Metanol: su: formik asit (90:8:2) ile 12-17 dakikalar içinde ayrılmış, her numune için toplam analiz süresi 25 dakika olarak belirlenmiştir. Çalışılan flavonoidlerden rutin (RU) 2.51. dak, mirisetin (MİR) 13.91. dak, kersetin (KER) 16.01. dak, luteolin (LUT) 16.68. dak, apigenin (APİ) ise 17.96. dak'larda elüe edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, standart konsantrasyonu pik normalizasyon (pik alanına/ tutunma zamanı(Rt) karşı çizilerek oluşturulmuştur. Korelasyon katsayısı karesi, $r^2 > 0.9998$ sistemin yüksek doğrusallığını ve kesinliğini göstermektedir.

Geliştirdiğimiz YBSK-DAD metoduna göre, infüzyonlarda tayin edilen ve miktarları hesaplanan flavonoid konsantrasyonları Tablo 4.8'de verilmiştir.

Çalışılan *Achillea* türlerinden AMH infüzyonunda RU (1.58 mg/g ekstre) ve LUT (1.06 mg/g ekstre) başlıca flavonoidler olarak tesbit edilirken, AKH infüzyonunda APİ (0.32 mg/g ekstre) ve RU (0.27mg/g ekstre), APH infüzyonunda ise KER (0.54 mg/g ekstre) ve MİR (0.40 mg/g ekstre) başlıca flavonoidler olarak bulunmuştur (Tablo 4.8).

Achillea cinsine ait türler hakkındaki literatür verilerimize göre, *Achillea cinsi* esas olarak rutin, luteolin ve apigenin flavonoid glikozitlerinin varlığı ile karakterizedir (Ayoobi vd., 2017; Gulomjon ugli ve Teshaboy ugl, 2021)

Çalışılan *Lycium* türlerinin meyva infüzyonlarının tamamında RU ve API'ne rastlanmıştır. LBM meyva infüzyonunda RU (10.49 mg/g ekstre) ve LUT (0.81 mg/g ekstre) API (0.48 mg/g ekstre) başlıca flavonoidler olarak tesbit edilirken, LDM infüzyonunda LUT (0.34 mg/g ekstre), LSM infüzyonunda ise RU (1.02 mg/g ekstre) ve API (0.90 mg/g ekstre) tayin edilmiştir (Tablo 4.8). Wang ve arkadaşları *L. barbarum* meyvalarından hazırladıkları %80 MeOH ekstresinin nötral fraksiyonunda YBSK-DAD sisteminde quercetin-diglycoside (66.0 µg/g), rutin (42.0 µg/g) and kamferol-3-O-rutinosit (11.3 µg/g) tayin edildiğini rapor etmişlerdir (Wang, vd., 2010). Literatür verilerimize göre *L. shawii* ve *L. depressum* meyvalarının flavonoidleri hakkında şimdiye kadar yapılmış çalışma bulunamamıştır.

YBSK-DAD yöntemi ile flavonoid tayin yöntemini uyguladığımız *Hypericum* türleri arasından *H. perforatum* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (HPH) başlıca flavonoid bileşikleri RU (15.6 mg/g ekstre), KER (5.55 mg/g ekstre), MİR (1.5 mg/g ekstre) bulunurken, *H. thymopsis* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda RU (3.97 mg/g ekstre), MİR (3.78 mg/g ekstre) ve KER (0.31 mg/g ekstre), olarak tayin edilmiştir bulunmuştur (Tablo 4.8). Zou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *H. perforatum* topraküstü kısımlarından etanoli ile hazırladıkları flavonoidlerce zengin ekstrenin YBSK-MS analizi ile ana bileşenler olarak Rutin, kersetin hiperozit, izokersitrin, kersitrin rapor edilmiştir (Zou, vd., 2004). Silva ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise *H. perforatum* çiçekli topraküstü kısımlarının etanol ekstrenin YBSK-MS analizi ile ana bileşenler olarak rutin, kamferol, biapigenin aglikonları ile kersetin, rutin, kamferol glikozitleri rapor edilmiştir (Silva, vd., 2005). Çalışılan 2 *Hypericum* infüzyonunda tesbit edilen flavonoidler literatür bilgileriyle oldukça uyumlu görülmektedir.

Literatür verilerimize göre çalışmamız, *H. thymopsis* türünün flavonoidleri hakkında şimdiye kadar yapılmış ilk çalışma özelliği taşımaktadır.

Malabaila secacul topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (MSH) başlıca RU (5.12 mg/g ekstre), MİR (3.44 mg/g ekstre), KER (0.35 mg/g ekstre) flavonoid

bileşikleri bulunurken, *meyvalar* dan hazırlanan infüzyonda (MSM) ise RU (4.72 mg/g ekstre), MİR (2.91 mg/g ekstre) ve KER (0.31 mg/g ekstre) olduğu tesbit edilmiştir. Sonuçlardan da anlaşılacağı gibi *Malabaila secacul* topraküstü kısımları, meyvalarından daha fazla miktarda flavonoid bileşiği taşımaktadır (Tablo 4.8).

Tablo 4.8’de gösterildiği gibi, *Nepeta congesta* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (NCH) en bol bulunan flavonoid bileşiğinin RU (0.67 mg/g ekstre) olduğu, onu MİR > KER > API > LUT izlediği görülmüştür. *Nepeta* türlerinin polifenolik bileşikleri üzerinde gerçekleştirilen çok sayıda bilimsel çalışma bulunmaktadır. Akdeniz ve arkadaşlarının *Nepeta congesta ssp. cryptantha* topraküstü kısımları etanol ekstresi üzerinde yaptığı çalışmada başlıca flavonoid rutin (RU olmak üzere apigenin ve hesperidin tesbit edilirken (Akdeniz, vd., 2020), *Nepeta* türlerinde tip ve konsantrasyon açısından flavonoidlerin kapsamlı dağılımının incelendiği bir başka çalışmada ise yine rutin (RU) (0.02–0.51 g/ kg) ana bileşen olarak rapor edilmiştir (Azizzian vd., 2021). *N. cataria* metanol ekstresinin n-butanol fraksiyonundan ise apigenin ve luteolin aglikonları ve glikozitleri izole edilmiştir (Modnicki vd., 2007). İran’da yetişen 4 *Nepeta* türünden *N. kotschyi*, *N. menthoides*, *N. crassifolia*, *N. cataria* tohumlarının metanol ekstresinde UPLC/-MS/MS yöntemiyle luteolin, apigenin, rutin, kersetin, naringenin olmak 5 adet flavonoit varlığı belirtilmiştir (Hadi vd., .2017).

Tez kapsamında çalışılan türlerden hazırlanan infüzyonların antioksidan aktiviteden sorumlu olduğu düşünülen fenolik asitlerin belirlenmesi ve miktar tayinleri, daha önce tarafımızca geliştirilen yöntemde belirtilen koşullarda RP-C18 kolon ve gradient elüsyon kullanılarak 280 nm’de YBSK-DAD sisteminde gerçekleştirilmiştir (Öztürk vd., 2007).

Çalışılan *Achillea* türlerinin topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonlardan *A. milleifolia* topraküstü kısımlarının (AMH) infüzyonunda en fazla bulunan fenolik o-KU (16.94 µg/g ekstre) olurken, onu FA > RA > tr-Sİ > KA bulunurken diğer *Achillea* türlerinde bulunan izlediği görülmektedir. Diğer *Achillea* türlerinden AKH’da ana fenolik asit RA ve KLA bulunurken, APH infüzyonunda RA > FA > KA bulunurken, KLA ‘e rastlamamıştır (Tablo 4.9). Literatür verilerimize göre, *Achillea*, flavonoid glikozitlerinin yanı sıra klorojenik, kafeik, dikaffeoilkinik gibi hidroksisinnamik asitler ve vanilik ve siringik asitler gibi hidroksibenzoik asitlerin varlığı tesbit edilmiştir (Qureshi vd.,2016)

Çalışmamızda *A. phrygia* infüzyonunda ana bileşenler olarak FA, RA, tr-Sİ ana bileşen olarak bulunurken (Tablo 4.9), Zengin ve arkadaşlarının çalışmasında sulu ekstrede ana bileşen klorojenik asit, yanında sinapik asit olduğu rapor edilmiştir (Zengin vd., 2017).

N. congesta var. *Congesta* (NCH) infüzyonunda ise majör fenolik asitler KLA ve RA tesbit edilmiştir (Tablo 4.9). -Lamiaceae familyasına ait aromatik bitkilerin en önemli fenolik maddelerinden biri olan rosmarinik asit, çalışmanın literatür verileriyle uyumlu olduğunu göstermektedir. Literatür incelememize göre, YBSK-DAD yöntemiyle fenolik bileşikleri incelenen Batı Azerbaycan-İran bölgesinden Haziran-Temmuz aylarında toplanan *N. congesta* toprak üstü kısımlarının metanol ekstresinde başta ferulik asit ($9,30 \pm 0,21 \text{ g kg}^{-1} \text{ DW toz}$) olmak üzere klorojenik, kafeik ve kumarik asitler içerdiği belirtilmiştir (Azizian vd.,2021). Van'da yetişen *N. congesta* var. *Crypthantha* çiçeklerinin etanol ekstralarında en bol bulunan fenolik asit, rosmarinik asit ($4.317.20 \mu\text{g/g}$) olarak tespit edilmiştir (Karademir vd.,2020).

Wang ve arkadaşları *L. barbarum* meyvalarından hazırladıkları %80 MeOH ekstresinin asidik fraksiyonunda YBSK-DAD sisteminde klorojenik asit ($12.4 \mu\text{g/g}$), kafeoilkinik asit ($0.34 \mu\text{g/g}$), kafeik asit ($3.73 \mu\text{g/g}$) ve p-kumarik asit ($6.06 \mu\text{g/g}$) varlığını rapor etmişlerdir (Wang, vd., 2010).

L. barbarum meyvaların üzerinde UBSK-UV yöntemiyle gerçekleştiren validasyon çalışmalarında 3,4-dihidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 3-hidroksibenzoik asit, hippurik asit, kafeik asit, vanillik asit, 4-hidroksi-3-metoksifenilasetik asit, 3-(2,4-dihidroksifenil) propiyonik asit, p-kumarik asit, ferulik asit bulunduğu tesbit edilmiştir. (Magiera vd.,2015) Ayrıca, birçok çalışmada *L. ruthenicum*, *L. barbarum*, *L. chinense*, *L. barbarum* var. *auranticarpum*, ve *L. yunnanense*, *L. chinense* var. *potaninii* meyvalarında hidroksi sinnamik asit türevlerinden başta kafeik asit, olmak üzere klorojenik asit , p-kumarik asit ve ferulik asit tanımlanmıştır (Inbaraj vd., 2010, Jarouche vd ., 2019, Zhao vd ., 2019).

YBSK-DAD çalışmamızda *H. perforatum* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (HPH) başlıca fenolik asitler sırasıyla FA> tr-Sİ >KLA>0-KU >protoCA >p-KU tayin edilirken, *H. thymopsis* topraküstü kısımlarından hazırlanan infüzyonda (HTH) ise sırasıyla KLA> tr-Sİ> proto CA> KA tayin edilmiştir (Tablo 4.9). Daha önce *H. perforatum*, sulu ekstralarının değerlendirilen makalemizde (Öztürk vd., 2007) sırasıyla,

proto CA > KLA > tr-Sİ, ayrıca *H. thymopsis* ile yapılan yayınlanmamış tez (Okuyay, 2020) sonuçlarına göre toprak üstü kısımlarından hazırlanan sulu ekstrede majör fenolik asit KLA (67.55 mg/g bitki) ayrıca FA > *p*-KU > *o*-KU tesbit edilmiş olması sonuçlarımızı doğrulamaktadır.

Miktar tayini çalışmalarımız dışında çalışılan türlerden hazırlanan infüzyonların toplam fenol ile flavonoid ve fenolik asit miktarları göz önüne alınarak, antioksidan aktivite çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

Çalışılan infüzyonların DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal süpürücü aktiviteleri Sanchez-Moreno ve arkadaşları (1998) tarafından modifiye edilmiş yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar test edilen konsantrasyonda % inhibisyon olarak değerlendirilmiş, sonuçlar sentetik antioksidan BHT'nin % inhibisyonu ile karşılaştırılmış ve Tablo 4.10'da verilmiştir.

Çalışılan türlerden hazırlanan infüzyonlardan sentetik antioksidan BHT (%inh 55.53) ile karşılaştırılacak derecede güçlü antioksidan aktivite veren türler *H. perforatum* (HPH %inh 44.99) ve *H. thymopsis* (HTH %inh 31.89) ile *Malabaila secacul* (MSM ve MSH % inh 35.32-38.81 sırasıyla) olarak tesbit edilmiştir. Diğer infüzyonlar ise sı en düşük aktivite ise *Lycium* meyvaları ile hazırlanan infüzyonlarda görülmüştür; BHT (%inh 55.53)> AMH (%inh 35.71)> AKH (%inh 35.12) >APH (%inh 35.08)> NCH (%inh 32.74)> LBM (%inh 21.88)> LSM (%inh 21.13)> LDM (%inh 19.64) şeklinde sıralanmıştır (Tablo 4.10). Literatüre verilerimize göre, *H. perforatum* topraküstü kısımlarından kaynar su ile hazırlanan infüzyonda (Alahmad vd., 2022) ve etanol ekstresinde (Zou vd., 2004) yüksek DPPH• üzerinden serbest radikal süpürücü etki rapor edilmiştir.

H. thymopsis çiçeklerinin metanol ekstresi, yapraklardan hazırlanan metanol ekstresinden daha fazla DPPH• üzerinden serbest radikal süpürücü etki göstermiştir, bunun nedeni çiçeklerin yapraklardan daha fazla polifenolik bileşik taşıması olarak gösterilmiştir (Koç, E. 2021).

Yaseen ve arkadaşları, *A. millefolium*'un hidro alkolik ekstrelerinin, proton verme yeteneğinden dolayı antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ve ekstrenin standart

antioksidanlarla karşılaştırıldığında serbest radikalleri yüksek oranda süpürdüğünü rapor etmişlerdir (Yaseen, vd. 2017).

A. millefolium'un yüksek oranda toplam fenolik madde içeriğine sahip yaprak ve gövdesinden hazırlanan hidro alkolik ekstrelerinin standart askorbik asit ile karşılaştırıldığında yüksek oranda DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü aktivite taşıdığı belirtilmiştir (Yaseen vd., 2017). *A. phrygia* metanol ve su ekstrelerinin etil asetat ekstresine göre daha güçlü DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü yetenekleri olduğu bulunmuştur (Zengin vd., 2017).

Yunanistan'da yetişen, ağustos ve ekim aylarında toplanan *L. barbarum* ve *L. chinense* meyvalarının araştırıldığı çalışmada ağustos ayında toplanan *L. barbarum* meyvalarının DPPH üzerinden tayin edilen antiradikal aktivitesi *L. chinense* meyvalarından ve her iki türün ekim ayında toplanan örneklerinden daha yüksek olarak tesbit edilmiştir (Skenderidis, vd., 2019)

Zengin ve arkadaşlarının *Malabaila lasiocarpa* topraküstü kısımlarından hazırladıkları farklı polaritedeki ekstrelerden en yüksek DPPH• serbest radikal süpürücü etki gösteren ekstre, önemli oranda TFM taşıyan metanolik ekstre olarak tesbit edilmiştir (Zengin, vd.2022).

N. congesta var *congesta*'dan hazırlanan farklı polaritedeki ekstrelerin çalışıldığı yüksek lisans tezinde en güçlü DPPH• serbest radikal süpürücü etki gösteren ekstre infüzyon çözeltisi (IC₅₀= 0.53 mg/mL) ve metanollü ekstre (IC₅₀= 0.79 mg/mL) olarak rapor edilmiştir. Kloroform ve etil asetatlı ekstrelerin infüzyon ve metanollü ekstreye göre daha düşük antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmiştir (sırasıyla IC₅₀= 2.72 mg/mL ve IC₅₀= 2.13 mg/ mL. (Karademir, A., 2021). Haziran-Temmuz aylarında Batı Azerbaycan-İran bölgesinden toplanana 4 *Nepeta* türünün toprak üstü kısımlarının metanollü ekstrelerinin DPPH• serbest radikal süpürücü etkilerinin araştırıldığı çalışmada, TFM ve flavonoid bileşiklerce zengin *N. cataria* ekstresi, *N. saccharata*, *N. congesta*, *N. racemosa* metanol ekstrelerinden daha aktif bulunmuştur (Azizian vd., 2021). *Nepeta heliotropifolia* (NH) and *N. congesta* subsp. *Cryptantha* çiçek uçucu yağları ve polar ekstrelerinin DPPH• serbest radikal süpürücü etkilerinin araştırıldığı çalışmada fazla miktarda TFM taşıyan polar ekstrelerin uçucu yağlardan daha yüksek aktivite gösterdikleri, ayrıca *N. congesta* subsp. *Cryptantha* ekstresinin *Nepeta*

heliotropifolia ekstresinden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Akdeniz vd., 2020).

Ayrıca, İnfüzyonların ABTS• radikal katyon renksizleştirme kapasitesine göre ölçülmüş antioksidan aktiviteleri pozitif kontrol BHT ve askorbik asit (ASA) çözeltilerinin sonuçları baz alınarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.11).

Çalışılan infüzyonlar (5 mg/mL) arasından BHT ve askorbik asit (ASA) çözeltilisine (%96.24 $\pm$ 0.49) en yakın ABTS• % inhibisyonu DPPH• serbest radikal süpürücü etkide de olduğu gibi HPM infüzyonunda (% inh %37.55 $\pm$ 0.09) görülmüştür. Diğer ekstrelerin ABTS• % inhibisyon değeri sırasıyla ASA> BHT> AMH (%34.07 $\pm$ 0.39)> HTH (%29.41 $\pm$ 0.04)>NCH (%17.59 $\pm$ 0.24) APH> LSM> olarak gözlenmiştir (Tablo 4.11).

Water ve arkadaşlarının *A. millefolium* çiçekleri, yaprakları ve tohumlarının su ve etanol ekstrelerinin ABTS radikali üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, en yüksek aktivite çiçeklerin etanol ekstresinde (%97.40), en düşük aktivite tohumların sulu ekstresinde (%55.76) görülmüştür (Water vd.,2013). Başka bir çalışmada, *Achillea phrygia* çiçeklerinden hazırlanan sulu, etil asetat ve metanol ekstrelerinin en yüksek ABTS radikali renksizleştirme etkisi sulu ekstrede (36.55 $\pm$ 6.46mgTE/g), en düşük aktivite ise tohumlardan hazırlanan etil asetat ekstresinde (124.64 $\pm$ 0.51mgTE/g) olduğu görülmüştür (Zengin vd., 2017).

Necip ve arkadaşlarının *H. perforatum* çiçekleri ve yapraklarının su ve metanol ekstrelerinin ABTS radikali üzerindeki renksizleştirme etkisini inceledikleri çalışmada, en yüksek aktivite sulu ekstresinde (% 61), en düşük aktivite metanol ekstresinde (%31) görülmüştür (Necip vd., 2019).

Koç, E.'nin hazırladığı yüksek lisans tezinde *H. thymopsis* çiçek ve yapraklarından hazırlanan etanol ekstrelerinin ABTS radikali üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, en yüksek aktivite yaprakların etanol ekstresinde (87.42 μ g/ml), en düşük aktivite çiçeklerin etanol ekstresinde (243.40 μ g/m) görülmüştür (Koç vd., 2019).

Skenderidis ve arkadaşlarının *L. barbarum* meyvelerinin ABTS radikali üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada sulu ekstraktların yüksek aktivite (192 ila 407 µg/mL) gösterdiği görülmüştür (Skenderidis vd., 2019).

Karademir, A. nın hazırladığı yüksek lisans tezinde *Nepeta congesta* var *congesta* herbasının su, etil asetat, hekzan ve metanol ekstraktlarının ABTS radikali üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, en yüksek aktivite infüzyon ekstresinde (%53.15 ± 0.04), en düşük aktivite ise hekzan ekstresinde (%23.01 ± 0.04) görülmüştür (Karademir, 2021).

Zengin ve ark.'larının *Malabaila lasiocarpa* Boiss sulu, hekzan ve etanol ekstraktlarının antioksidan etkisinin inceledikleri çalışmada, en yüksek ABTS radikali renksizleştirme kapasitesi sulu ekstresinde (54.11 ± 1.44 mg TE/g), en düşük aktivite hekzan ekstresinde (3.45 ± 0.75mg TE/g) görülmüştür (Zengin vd., 2022).

Sonuç olarak, YBSK-DAD yöntemi ile yöntem geliştirme çalışması için seçilen beş flavonoid bileşiğinin (API, LUT, RU, MİR ve KER) varlığı, çalışılan bitki infüzyonlarında doğrulanmış, miktarları belirlenmiştir. Ayrıca infüzyonların toplam fenolik madde miktarları ve fenolik asit miktarları belirlenerek, DPPH radikal süpürücü etkileri ve ABTS radikali renksizleştirme kapasitesi ile antioksidan potansiyelleri olduğu görülmüştür.

Bu sonuçların dışında, birçok cinsin ofisinal türleri dışında kalan türlerinin kimyasal özellikleri hakkında bilgi yok denecek kadar az olduğu için *Malabaila secacul*, *Achillea phrighia*, *Lycium shawi* gibi türlerden hazırlanan infüzyonların flavonoidleri, fenolik asitleri ve antioksidan aktivitelerinin araştırılması da bu çalışmanın önemli kazanımlarını oluşturmaktadır.

Bununla birlikte, az miktarda bitkisel materyalden hazırlanan bitkisel ilaçların varsayılan farmakolojik özelliklerinin tam olarak doğrulanabilmesi için flavonoidler, fenolik asitlerden başka diğer fitokimyasal bileşenlerinin belirlenmesi ve olası etkilerinin değerlendirilmesi için farklı farmakolojik özelliklerin deneysel kanıtlarına ihtiyaç olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKÇA

Akdeniz, M., Ertaş, A., Yener, İ., Fırat, M., Kolak, U. (2020). Phytochemical and biological investigations on two *Nepeta* species: *Nepeta heliotropifolia* and *N. congesta* subsp. *cryptantha*. *Journal of Food Biochemistry*, , 44 (2), e13124.

Alahmad, A., Alghoraibi, I., Zein, R., Kraft, S., Dräger, G., Walter, J. G., Scheper, T. (2022). Identification of Major Constituents of *Hypericum perforatum* L. Extracts in Syria by Development of a Rapid, Simple, and Reproducible HPLC-ESI-Q-TOF MS Analysis and Their Antioxidant Activities. *ACS Omega*, 7(16), 13475–13493.

Ayoobi, F., Shamsizadeh, A., Fatemi, I., Vakilian, A., Allahtavakoli, M., Hassanshahi, G., & Moghadam-Ahmadi, A. (2017). Bio-effectiveness of the main flavonoids of *Achillea millefolium* in the pathophysiology of neurodegenerative disorders- a review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(6), 604–612.

Azizian, T., Alirezalu, A., Hassani, A., Bahadori, S., & Sonboli, A. (2021). Phytochemical analysis of selected *Nepeta* species by HPLC-ESI-MS/MS and GC–MS methods and exploring their antioxidant and antifungal potentials. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 2417-2429.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

Benetis, R., Radusiene, J., Jakštasa, V., Janulis, V., & Malinauskasa, F. (2007). Development of an RP-HPLC Method for the Analysis of Phenolic Compounds in *Achillea millefolium* L. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31, 596-610.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

Bobis, O., Dezmirean, D. S., Tomos, L. (2015). Influence of phytochemical profile on antibacterial activity of different medicinal plants against gram-positive and gram-negative bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51, 113-118.

Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), 325-337.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

Calder, P. C., Carding, S. R., Christopher, G., Kuh, D., Langley-Evans, S. C., & McNulty, H. (2018). A holistic approach to healthy ageing: how can people live longer, healthier lives? *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 31(4), 439-450.

Cases, J., Ibarra, A., Feuillère, N., Roller, M., & Sukkar, S. G. (2011). Pilot trial of *Melissa officinalis* L. leaf extract in the treatment of volunteers suffering from mild-to-moderate anxiety disorders and sleep disturbances. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 4(3), 211-218.

Chandrasekara, A., & Shahidi, F. (2018). Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction- A review. *Journal of traditional and complementary medicine*, 8(4), 451-458.

Çam, M. & Hışıl, Y. (2004). Gıda Flavonoidlerinin Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi ile Analizi. *Akademik Gıda*, 2 (2) , 24-27.

Elmas, C., & Gezer, C. (2019). Çay bitkisinin (*Camellia sinensis*) bileşimi ve sağlık etkileri. *Akademik Gıda*, 17(3), 417-428.

Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21(2), 263-277.

Gokhale, A. B.Damre, A. S., & Saraf, M. N. (2004). Investigations into the immunomodulatory activity of rutin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(6), 818–822.

Gulomjon ugli ,N. M.,&Teshaboy ugli, P. A. (2021). Some Flavonoids in the Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Plant and their Effects on Human Health. *American Journal of Social and Humanitarian Research*, 2(5), 116-120.

Hadi N, Sefidkon F, Shojaeiyan A, İgler B, Jafarğ Aa, Anghğğ N, Mğşğğ D (2017). Phenolics“ composition in four endemic *Nepeta* species from Iran cultivated under experimental field conditions: The Possibility of The Exploitation of *Nepeta* Germplasm. *Industrial Crops and Products*, 95, 475-484

Harborne, J. B., Mabry, H., & Mabry, T. J. (1975). The Flavonoids. *Redwood Burn Limited*. pp. 327, 929.

http 1. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/glossary-herbal-teas_en.pdf

Huang, W. Y., Cai, Y. Z., & Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1-20.

Hollman, P. C. (2004). Absorption, bioavailability and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 42, 74-83.

ICH, H. T. G. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1); International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use, 1-13.

Inbaraj, B. S., Lu, H., Kao, T. H., Chen, B. H. (2010). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(3), 549–556.

Jarouche, M., Suresh, H., Hennell, J., Sullivan, S., Lee, S., Singh, S., Power, D., Xu, C., & Khoo, C. (2019). The Quality Assessment of Commercial *Lycium Berries* Using LC-ESI-MS/MS and Chemometrics. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(12) 600-604.

Karademir, A (2021) *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. Var. *congesta* Fisch. & Mey. Üzerinde Fitokimyasal Ve Biyoaktivite Çalışmaları. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.

Koç, E. 2019. *Hypericum thymopsis* Boiss. (Hypericaceae) Türünün Bazı Fenolik Bileşiklerinin, Antioksidan Kapasitesinin ve Uçucu Yağ Kompozisyonunun Belirlenmesi. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Malatya: İnönü Üniversitesi.

Kumar, S., Pandey, A. K., & Chemistry, O. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16.

Magiera, S., Zaręba, M. (2015). Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* L. and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Anal. Methods* 8, 2665–2674

Mann, John (1992). Secondary Metabolism (2nd ed.). Oxford, UK: *Oxford University Press*. ISBN 978-0-19-855529-2. p. 279-280.

Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(3), 577–599.

Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D. C., Bischin, C., Hanganu, D., Gheldiu, A. M., Oprean, R., Silaghi-Dumitrescu, R., & Crişan, G. (2014). Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(7), 10056–10073.

Modnicki, D., Tokar, M., & Klimek, B. (2007). Flavonoids and phenolic acids of *Nepeta cataria* L. var. *citriodora* (Becker) Balb. (Lamiaceae). *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 64(3), 247–252.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 2-30.

Necip, A., & Mesut, I. Ş. I. K. (2019). Bioactivities of *Hypericum perforatum* L and *Equisetum arvense* L fractions obtained with different solvents. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2(3), 221-230.

Okyay, B. 2020. *Hypericum thymopsis* Boiss. (Hypericaceae) Üzerinde Fitokimyasal Ve Biyoaktivite Çalışmaları, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.

Öztürk, N., Tuncel, M., & Tuncel, N. B. (2007). Determination of phenolic acids by a modified HPLC: Its application to various plant materials. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30 (4), 587-596.

Öztürk, N., Tunçel, M., & Potoğlu-Erkara, İ. (2009). Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*. *Pharmaceutical biology*, 47(2), 120-127.

Poswal, F. S., Russell, G., Mackonochie, M., MacLennan, E., Adukwu, E. C., & Rolfe, V. (2019). Herbal Teas and their Health Benefits: A Scoping Review. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 74(3), 266–276.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*, 5, 47-51

Qureshi, M. N., Stecher, G., & Bonn, G. K. (2016). Quantification of polyphenolic compounds and flavonoids in *Achillea millefolium* and *Equisetum arvense*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(5), 1519–1523.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Saroglou, V., Dorizas, N., Kypriotakis, Z., Skaltsounis, A. L., & Anastasaki, T. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and various oleoresins of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8225-8230.

Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung/Food*, 44(3), 158-163.

Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., & Dias, A. C. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90(1-2), 157-167.

Skenderidis, P., Lampakis, D., Giavasis, I., Leontopoulos, S., Petrotos, K., Hadjichristodoulou, C., & Tsakalof, A. (2019). Chemical properties, fatty-acid composition, and antioxidant activity of goji berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) fruits. *Antioxidants*, 8(3), p 60.

Wang, C. C., Chang, S. C., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food chemistry*, 120(1), 184-192.

Wang, S. P., & Huang, K. J. (2004). Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography. A*, 1032(1-2), 273–279.

Wang, Y., Zhao, L., Wu, Y., Wu, Y., Huang, L., Wen, J., & Deng, X. (2021). Myricetin: A review of the effects on the cardiovascular system. *Journal of Ethnopharmacology*, 113886.

WATER, F. C. O. (2013). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from *Achillea millefolium* L. *Turk J Pharm Sci*, 10(3), 385-392.

Williamson, G. (2017). Polyphenols in foods – a review of their nutritional significance and health benefits. *Nutrition Bulletin*, 42(3), 226-235.

World Health Organization. (2012). The top 10 causes of death. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Accessed June 11, 2019.

Yaseen, M., Ahmad, M., Wani, T. A., Ahmad, M., Gani, B. A., & Qureshi, R. (2017). Phytochemical screening and antioxidant activity of extracts of the leaf and stem of *Achillea millefolium*. *International Journal of Science and Research*, 2(6), 55-59.

Zengin, G., Bulut, G., Mollica, A., Haznedaroglu, M. Z., Dogan, A., & Aktumsek, A. (2017). Bioactivities of *Achillea phrygia* and *Bupleurum croceum* based on the composition of phenolic compounds: In vitro and in silico approaches. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 597-608.

Zengin, G., Zheleva-Dimitrova, D., Babacan, E. Y., Polat, R., Çakılcıoğlu, U., Sadeer, N. B., Costa, E. V., Mahomoodally, M. F., Naviglio, D., Gallo, M., Montesano, D., Lorenzo, J. M., & Gevrenova, R. (2022). Detailed Chemical Characterization and Biological Propensities of *Malabaila lasiocarpa* Extracts: An Endemic Plant to Turkey. *Chemistry & Biodiversity*, 19(4), 2-12

Zhang, A. L., Changli Xue, C., & Fong, H. H. S. (2011). Integration of Herbal Medicine into Evidence-Based Clinical Practice: Current Status and Issues. In I. F. F. Benzie (Eds.) et. al., *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. (2nd ed.). CRC Press/Taylor & Francis.

Zhao, J., Deng, J. W., Chen, Y. W., & Li, S. P. (2013). Advanced phytochemical analysis of herbal tea in China. *Journal of Chromatography. A*, 1313, 2–23.

Zhao, X. Q., Guo, S., Yan, H., Lu, Y. Y., Zhang, F., Qian, D. W., Wang, H. Q., & Duan, J. A. (2019). Analysis of phenolic acids and flavonoids in leaves of *Lycium barbarum* from different habitats by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography: BMC*, 33(8), 57-69

Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5032–5039.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı :
Yabancı Dil :
Doğum Yeri ve Yılı :
ORCID ID : 98716189807

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- Lisans :2020,Ürdün, Irbid -Yermuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi.
- Lise :2015, AL- ATLAL Lisesi (Süleymaniye –IRAK)
-
- Stajlar. :Selim Eczanesi, Serbest eczanelerden eğitim (Eskişehir)
Birkaç yerde ücretsiz tıbbi günlerde gönüllü olarak çalıştım.
Benim işim bir gönüllü kampanyası düzenlemektir.(Ürdün'de)

