

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOİDES* BİTKİ TÜRLERİNDE
BULUNAN MAJÖR FENOLİK BİLEŞENİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONUNUN VE
VALİDASYONUNUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ VE BİTKİLERİN FARKLI
GELİŞİM DÖNEMLERİNDE BİYOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Tuba SEÇMEN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOİDES* BİTKİ TÜRLERİNDE
BULUNAN MAJÖR FENOLİK BİLEŞENİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONUNUN VE
VALİDASYONUNUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ VE BİTKİLERİN FARKLI
GELİŞİM DÖNEMLERİNDE BİYOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Tuba SEÇMEN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOİDES* BİTKİ TÜRLERİNDE
BULUNAN MAJÖR FENOLİK BİLEŞENİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONUNUN VE
VALİDASYONUNUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ VE BİTKİLERİN FARKLI
GELİŞİM DÖNEMLERİNDE BİYOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Tuba SEÇMEN

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2018-4073 nolu proje ile desteklenmiştir.

ŞUBAT 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOİDES* BİTKİ TÜRLERİNDE
BULUNAN MAJÖR FENOLİK BİLEŞENİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONUNUN VE
VALİDASYONUNUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ VE BİTKİLERİN FARKLI
GELİŞİM DÖNEMLERİNDE BİYOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Tuba SEÇMEN

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 19/02/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sibel TUNÇ (Danışman)

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Doç. Dr. Edip BAYRAM

ÖZET

***DAPHNE SERİCEA* VE *DAPHNE GNİDİOIDES* BİTKİ TÜRLERİNDE BULUNAN MAJÖR FENOLİK BİLEŞENİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ İLE TAYİNİ İÇİN METOT OPTİMİZASYONUNUN VE VALİDASYONUNUN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ VE BİTKİLERİN FARKLI GELİŞİM DÖNEMLERİNDE BİYOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Tuba SEÇMEN

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Şubat 2021; 109 sayfa

Bu çalışmada, çiçeklenme döneminde toplanan *Daphne sericea* subsp. *sericea* Vahl. bitki türünün herba kısmında toplam fenolik madde miktarı analiz sonuçlarına göre optimum ekstraksiyon parametreleri belirlenmiştir. Çiçeklenme öncesi, çiçeklenme ve çiçeklenme sonrası dönemde toplanmış olan *D.(Daphne) sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı (yaprak, çiçek ve herba) kısımlarının biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal içeriklerinin belirlenmesi için her iki bitki türünde de toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, DPPH ve FRAP yöntemleri ile antioksidan aktivite miktarı, toplam klorofil miktarı, toplam karotenoid miktarı, toplam antosiyanin miktarı, C vitamini miktarı, fenolik ve flavonoid bileşen miktarı, organik asit bileşen miktarı, şeker bileşen miktarı, toplam yağ verimi ve yağ bileşenleri miktarı analizleri yapılmıştır. Ayrıca, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde bulunan rosmarinik asit maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ve metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Optimum ekstraksiyon çözücüsü hacimce % 70'lik metanol çözeltisi, ekstraksiyon sıcaklığı 65 °C ve ekstraksiyon süresi 24 saat olarak tespit edilmiştir. *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 26,89-38,90 mg GAE/g ve 39,33-74,94 mg GAE/g aralığında saptanmıştır. Bu bitki türleri için toplam flavonoid madde miktarı sırasıyla 22,21-30,57 mg CE/g ve 11,10-31,00 mg CE/g aralığında belirlenmiştir. *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde C vitamini miktarı sırasıyla 21,08-27,50 mg/100 g ve 28,13-50,83 mg/100 g aralığında bulunmuştur. *D. sericea* bitki türünde kateşin, şiringik asit, sinapik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve epikateşin fenolik bileşenleri tespit edilmiştir. *D. gnidioides* bitki türünde başlıca yağ bileşenleri olarak nonakosan, 1-eikosanol, heksakosan, linoleik asit, palmitik asit ve oleik asit saptanmıştır.

D. sericea ve *D. gnidioides* bitki türlerinde bulunan rosmarinik asit maddesinin tayini için gerçekleştirilen metot optimizasyon çalışmalarında, farklı mobil faz bileşimleri denenmiş ve asetonitril/metanol/formik asit karışımı (10/90/0,5, V/V/V)

uygun mobil faz olarak belirlenmiştir. Optimum mobil faz akış hızı 0,4 mL/dk olarak tespit edilmiştir. Optimum kolon sıcaklığı 30 °C olarak saptanmış ve optimum enjeksiyon hacmi 10 µL olarak bulunmuştur.

Metot validasyonunun gerçekleştirilmesi için doğrusallık, doğruluk, kesinlik, gözlenebilme sınırı (LOD), tayin sınırı (LOQ) ve seçicilik parametreleri belirlenmiştir. Yüzde geri kazanım miktarı $101,36 \pm 7,19$ olarak tespit edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırası ile 0,37 mg/L ve 0,95 mg/L olarak hesaplanmıştır.

ANAHTAR KELİMELE: Biyokimyasal karakterizasyon, *Daphne gnidioides*, *Daphne sericea*, Ekstraksiyon optimizasyonu, Metot optimizasyonu, Metot validasyonu, Rosmarinik asit, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi.

JÜRİ: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Doç Dr. Edip BAYRAM

ABSTRACT

METHOD OPTIMIZATION AND VALIDATION FOR THE DETERMINATION OF MAJOR PHENOLIC COMPOUND IN *DAPHNE SERICEA* AND *DAPHNE GNIDIODES* SPECIES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND DETERMINATION OF BIOCHEMICAL CONTENT OF THESE SPECIES IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES

Tuba SEÇMEN

MSc Thesis in Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

February 2021; 109 pages

In this study, optimum extraction parameters for herba *Daphne sericea* subsp *sericea* Vahl. collected in the flowering period were determined according to the results of total phenolic content analysis. Biochemical characterization of different (leaf, flower and herba) parts of *D. sericea* and *D. gnidioides* collected in pre-flowering, flowering and post-flowering stages was carried out. In order to investigate biochemical contents of two species, the total phenolic content, total flavonoid content, amounts of antioxidant activity by DPPH and FRAP methods, total chlorophyll content, total carotenoid content, total anthocyanin content, vitamin C content, amounts of phenolic and flavonoid components, amounts of organic acid components, amounts of sugar components, total oil yield and amounts of fatty components analysis were performed. Additionally, method optimization and method validation were carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for the determination of rosmarinic acid substance found in *D. sericea* and *D. gnidioides*.

The optimum extraction solvent was determined as 70 % (V/V) methanol, the optimum temperature was obtained as 65 °C and the optimum extraction time was found to be 24 hours. Total amounts of phenolic compounds in *D. sericea* and *D. gnidioides* species were obtained in the range of 26.89-38.90 mg GAE/g and 39.33-74.94 mg GAE/g, respectively. For these species, total amounts of flavonoid substance were determined to be 22.21-30.57 mg CE/g and 11.10-31.0 mg CE/g, respectively. In *D. sericea* and *D. gnidioides* species, the amounts of vitamin C were in the range of 21.08-27.50 mg/100 g and 28.13-50.83 mg/100 g, respectively. Catechin, syringic acid, sinapic acid, rosmarinic acid, chlorogenic acid and epicatechin phenolic components were detected in *D. sericea* plant specie. Nonacosane, 1-eicosanol, hexacosane, linoleic acid, palmitic acid and oleic acid were determined as the main fatty components in *D. gnidioides* plant specie.

The different mobile phase compositions were tested to optimize the method for the determination of rosmarinic acid content in *D. sericea* and *D. gnidioides* species and the optimum mobile phase composition was found to be acetonitrile/methanol/formic acid mixture (10/90/0.5, V/V/V). Optimum flow rate was obtained as 0.4 mL/min.

Optimum column temperature was detected to be 30 °C and optimum injection volume was found as 10 µL.

In order to perform method validation, linearity, accuracy, precision, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and selectivity parameters were obtained. Recovery (%) value was determined as 101.36 ± 7.19 . LOD and LOQ values were calculated as 0.37 mg/L and 0.95 mg/L, respectively.

KEYWORDS: Biochemical characterization, *Daphne gnidioides*, *Daphne sericea*, Extraction optimization, High performance liquid chromatography, Method optimization, Method validation, Rosmarinic acid.

COMMITTEE: Prof. Dr. Sibel TUNÇ

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Assoc. Prof. Dr. Edip BAYRAM

ÖNSÖZ

Rosmarinik asit yüksek antioksidan özelliğe sahip fenolik bir bileşiktir. Aynı zamanda antienflamatuar, antimikrobiyal ve antiviral özellik göstermektedir. Rosmarinik asit, tıbbi aromatik bitkilerde yüksek oranda bulunmaktadır. Tıbbi bitkilerin iyileştirici özelliğinin, içeriğindeki etken maddelerden kaynaklandığı bilinmektedir.

Literatür çalışmaları, en verimli ekstraktın elde edildiği ekstraksiyon koşullarının her bitki için farklı olduğunu göstermiştir. Bu sebeple, gerçekleştirilen Yüksek Lisans Tez çalışmasında öncelikle optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Daphne türleri ile dünyada ve ülkemizde yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Fakat bitkinin farklı gelişme dönemlerinde ve farklı kısımlarında ayrıntılı olarak biyokimyasal içeriğini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda, bitkilerin biyokimyasal içeriğinin; bitkinin gelişme dönemi, bitkinin farklı kısımları, güneş görme sıklığı, toprak yapısı, yetiştiği bölge, iklim ve rakım gibi birçok faktörden etkilendiği bildirilmiştir. Bu nedenle, Yüksek Lisans Tez çalışmasında farklı (çiçeklenme öncesi, çiçeklenme ve çiçeklenme sonrası) dönemlerde toplanan *D. sericea* subsp. *sericea* Vahl ve *D. gnidioides* Jaub. & Spach bitki türlerinin farklı (yaprak, çiçek ve herba) kısımlarındaki biyokimyasal karakterizasyonun ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla; toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, DPPH ve FRAP metotları ile antioksidan aktivite miktarı, toplam klorofil miktarı, toplam karotenoid miktarı, toplam antosiyanin miktarı, C vitamini miktarı, fenolik ve flavonoid bileşen miktarı, organik asit bileşen miktarı, şeker bileşen miktarı, toplam yağ verimi ve yağ bileşenleri miktarı analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde bulunan rosmarinik asit maddesinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ve metot validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans Tez çalışması kapsamında *D. sericea* bitki türünün herba kısmı için optimize edilen ekstraksiyon metodunun, farklı gelişim dönemlerinde toplanan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarında ortaya konan biyokimyasal karakterizasyonunun bu bitki türleri ile ileride yapılacak çalışmalar için önemli bir veri kaynağı olacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda; rosmarinik asit analizi için optimize edilmiş ve validasyonu yapılmış yeni metot, literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

Tez çalışması, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne "*Daphne sericea* ve *Daphne gnidioides* Bitki Türlerinde Bulunan Majör Fenolik Bileşenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini için Metot Optimizasyonunun ve Validasyonunun Gerçekleştirilmesi ve Bitkilerin Farklı Gelişim Dönemlerinde Biyokimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi" başlığı ile sunulmuş ve aynı birim tarafından FYL-2018-4073 no'lu proje ile desteklenmiştir. Tez çalışmamı destek veren Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince, beni yönlendiren ve desteğini esirgemeyen, bilgisi, deneyimi ve hoşgörüsü ile her türlü konuda bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sibel TUNÇ'a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü), tez

Çalışmamda katkıları olan Sayın Prof. Dr. Osman DUMAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakóltesi, Kimya Bölümü), Dr. Fulya YÜCEOL'a (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM), Gıda Teknolojisi ve Tıbbi Aromatik Bitkiler Bölümü (GTTB), Uzman Biyolog), Orçun ÇINAR'a (BATEM, GTTB, Kimya Mühendisi), Dr. Demet YILDIZ TURGUT'a (BATEM, GTTB, Gıda Mühendisi), Dr. Arzu BAYIR YEĞİN'e (BATEM, GTTB, Ziraat Mühendisi), Ayře ERDOĞAN'a (BATEM, GTTB, Eczacı), BATEM GTTB alışma arkadaşlarıma, BATEM yönetimine, tez çalışmam süresince bana inanan, destekleyen ve moral veren eřim Özgür SEÇMEN'e, kızım Bade SEÇMEN'e, rahmetli annem Ayře TOPCU'ya ve aileme teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Tıbbi Bitkiler	1
1.2. <i>Daphne sericea</i> ve <i>Daphne gnidioides</i> Türleri ve Kullanımı.....	2
1.3. Fenolik Bileşikler	3
1.4. Rosmarinik Asit.....	4
1.5. Sıvı Kromatografisi ve Metot Optimizasyonu	5
1.6. Metot Validasyonu	5
1.7. Ekstraksiyon Standardizasyonu.....	6
1.8. Biyokimyasal İçerik	7
1.9. Çalışmanın Amacı	8
2. KAYNAK TARAMASI	10
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Bitki Materyali	13
3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve reaktifler	13
3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	13
3.2. Metot	14
3.2.1. Optimum ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi.....	14
3.2.1.1. Optimum ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi.....	15
3.2.1.2. Optimum ekstraksiyon çözücü oranının belirlenmesi.....	15
3.2.1.3. Optimum ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi.....	15
3.2.1.4. Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi	16
3.2.2. Biyokimyasal karakterizasyon.....	16
3.2.2.1. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	16

3.2.2.2. Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi	17
3.2.2.3. Toplam antioksidan aktivite miktarının DPPH metodu ile belirlenmesi.	17
3.2.2.4. Toplam antioksidan aktivite miktarının FRAP metodu ile belirlenmesi.	18
3.2.2.5. Toplam klorofil ve toplam karotenoid madde miktarının belirlenmesi ..	18
3.2.2.6. Toplam antosiyanin miktarının belirlenmesi	18
3.2.2.7. C vitamini miktarının belirlenmesi	19
3.2.2.8. Fenolik ve flavonoid bileşenlerin belirlenmesi	19
3.2.2.9. Organik asit bileşen miktarının belirlenmesi	20
3.2.2.10. Şeker bileşenleri miktarının belirlenmesi.....	20
3.2.2.11. Toplam sabit yağ veriminin belirlenmesi.....	21
3.2.2.12. Yağ bileşenlerinin belirlenmesi.....	21
3.2.3. Rosmarinik asit analizi için metot optimizasyonu.....	22
3.2.3.1. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi	22
3.2.3.2. Optimum akış hızının belirlenmesi	23
3.2.3.3. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi.....	23
3.2.3.4. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi	24
3.2.4. Rosmarinik asit analizi için metot validasyonu	24
3.2.4.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi	24
3.2.4.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi	24
3.2.4.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi.....	24
3.2.4.4. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması.....	25
3.2.4.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi	25
3.2.5. Optimize edilmiş metot ile <i>Daphne sericea</i> bitki türünde rosmarinik asit miktarının belirlenmesi	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1. Ekstraksiyon optimizasyonu.....	26
4.1.1. Optimum ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi	26
4.1.2. Optimum ekstraksiyon çözücü oranının belirlenmesi	27
4.1.3. Optimum ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi	29
4.1.4. Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi.....	31
4.2. Biyokimyasal karakterizasyon.....	32
4.2.1. Toplam fenolik madde miktarı	32

4.2.2. Toplam flavonoid madde miktarı	35
4.2.3. DPPH metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarı	37
4.2.4. FRAP metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarı	39
4.2.5. Toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı	41
4.2.6. Toplam antosiyanin miktarı	45
4.2.7. C vitamini miktarı	47
4.2.8. Fenolik ve flavonoid bileşen miktarı	49
4.2.9. Organik asit bileşen miktarı	62
4.2.10. Şeker bileşen miktarı	67
4.2.11. Toplam sabit yağ verimi	69
4.2.12. Yağ bileşenleri	71
4.3. Rosmarinik asit analizi için metot optimizasyonu	73
4.3.1. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi	73
4.3.2. Optimum akış hızının belirlenmesi	78
4.3.3. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi	82
4.3.4. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi	85
4.4. Rosmarinik asit analizi için metot validasyonu	88
4.4.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi	88
4.4.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi	89
4.4.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi	90
4.4.4. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması	92
4.4.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi	93
4.5. Optimize edilmiş metot ile <i>Daphne sericea</i> bitki türünde rosmarinik asit miktarının belirlenmesi	94
5. SONUÇLAR	96
6. KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Daphne Sericea* ve *Daphne Gnidioides* Bitki Türlerinde Bulunan Majör Fenolik Bileşenin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Tayini için Metot Optimizasyonunun ve Validasyonunun Gerçekleştirilmesi ve Bitkilerin Farklı Gelişim Dönemlerinde Biyokimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

19/02/2021

Tuba SEÇMEN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
μg	: Mikrogram, kütle birimi
μL	: Mikrolitre, hacim birimi
μm	: Mikrometre, uzunluk birimi
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece, sıcaklık birimi
α	: Alfa
ϵ	: Molar absorptivite
Ω	: Omega
$\text{\AA}$	: Ångström, uzunluk birimi
A	: Absorbans
A_{480}	: Ekstraktın 480 nm dalga boyundaki absorbans değeri
A_{645}	: Ekstraktın 645 nm dalga boyundaki absorbans değeri
A_{663}	: Ekstraktın 663 nm dalga boyundaki absorbans değeri
A_{520}	: pH'ı 1'e ve pH'ı 4,5'e ayarlanmış ekstraktların 520 nm dalga boyundaki absorbans değerleri
A_{700}	: pH'ı 1'e ve pH'ı 4,5'e ayarlanmış ekstraktların 700 nm dalga boyundaki absorbans değerleri
A_{DPPH}	: 0,1 mL metanol ve 3,9 mL DPPH içeren çözeltinin absorbans değeri
A_{ekstrakt}	: Ekstraktların 30 dk sonundaki absorbans değeri
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	: Alüminyum klorür hekzahidrat
cm	: Santimetre, uzunluk birimi
-COOH	: Karboksil grubu
dk	: Dakika, zaman birimi

eV	: Elektronvolt
F	: Pikin başlangıcı ile pikin en yüksek olduğu nokta arasındaki uzaklık
g	: Gram, kütle birimi
H	: Teorik tabak yüksekliği
HCl	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum klorür
kg	: Kilogram, kütle birimi
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
L	: Kolon uzunluğu
L	: Litre, hacim birimi
M	: Molarite, derişim birimi
m	: Kalibrasyon doğrusunun eğimi
m	: Metre, uzunluk birimi
m ²	: Metrekare, alan birimi
mg	: Miligram, kütle birimi
mL	: Mililitre, hacim birimi
mM	: Milimolar, derişim birimi
mm	: Milimetre, uzunluk birimi
m/z	: Kütle/yük oranı
N	: Teorik tabaka sayısı
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaNO ₂	: Sodyum nitrit
NaOH	: Sodyum hidroksit
n	: Çalışılan standart sayısı

ng	: Nanogram, kütle birimi
nm	: Nanometre, uzunluk birimi
<i>o</i> -Fosforik asit	: Ortofosforik asit
-OH	: Hidroksil grubu
<i>o</i> -Kumarik asit	: Ortokumarik asit
<i>p</i> -Kumarik asit	: Parakumarik asit
R^2	: Korelasyon değeri
S	: Saniye, zaman birimi
t_A	: Validasyonu yapılan standardın alıkonma süresi
t_B	: Farklı bir standardın alıkonması süresi
t_0	: Ölü zaman (tutunmayan bileşiğin alıkonma zamanı)
t_r	: Alıkonma zamanı
V/V	: Hacim:hacim oranı
V/V/V	: Hacim:hacim:hacim oranı
W/V	: Kütle:Hacim oranı
$W_{0,005}$	: % 5 pik yüksekliğinde ölçülen pik genişliği
W_b	: Pik taban genişliği
y_{den}	: Deneysel olarak elde edilen pik alanı
y_{teo}	: Kalibrasyon eşitliğinden hesaplanan pik alanı

Kısaltmalar

ACN	: Asetonitril
AA	: Asetik asit
AOAC	: Resmi Analitik Kimyagerler Derneği
C18	: Karbon 18
CE	: Kateşin eşdeğeri
SF	: Seyreltme faktörü
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikril hidrazil
FRAP	: Ferrik iyonu indirgeyici antioksidan parametresi
FA	: Formik asit
FID	: Alev iyonizasyon dedektörü
GC	: Gaz kromatografisi
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
LOD	: Gözlenebilme sınırı
LOQ	: Tayin sınırı
MeOH	: Metanol
QE	: Kuersetin eşdeğeri
RE	: Rutin eşdeğeri
Rpm	: Dönüş/devir sayısı
RSD	: Bağlı standart sapma
SD	: Standart sapma
TE	: Troloks eşdeğeri
TPTZ	: 2,4,6 Tri(2-piridil)-s-Triazin
Troloks	: 6-Hidroksil-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çalışmada materyal olarak kullanılan <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin toplandıkları doğal ortamlarındaki görünüşleri	3
Şekil 4.1. Toplam fenolik madde miktar tayini için hazırlanmış gallik asit kalibrasyon grafiği	33
Şekil 4.2. Toplam flavanoid madde miktar tayini için hazırlanmış kateşin kalibrasyon grafiği	35
Şekil 4.3. Toplam antioksidan aktivite analizi için hazırlanmış troloks kalibrasyon grafiği	39
Şekil 4.4. C vitamini kalibrasyon grafiği	47
Şekil 4.5. Kafeik asit kalibrasyon grafiği	49
Şekil 4.6. <i>p</i> -Kumarik asit kalibrasyon grafiği	50
Şekil 4.7. <i>o</i> -Kumarik asit kalibrasyon grafiği	50
Şekil 4.8. Rosmarinik asit kalibrasyon grafiği	51
Şekil 4.9. Kamferol kalibrasyon grafiği	51
Şekil 4.10. Kateşin kalibrasyon grafiği	52
Şekil 4.11. Vanilik asit kalibrasyon grafiği	52
Şekil 4.12. Şiringik asit kalibrasyon grafiği	53
Şekil 4.13. Sinapik asit kalibrasyon grafiği	53
Şekil 4.14. Rutin kalibrasyon grafiği	54
Şekil 4.15. Kersetin kalibrasyon grafiği	54
Şekil 4.16. Klorojenik asit kalibrasyon grafiği	55
Şekil 4.17. Epikateşin kalibrasyon grafiği	55
Şekil 4.18. Ferulik asit kalibrasyon grafiği	56
Şekil 4.19. Ellajik asit kalibrasyon grafiği	56
Şekil 4.20. Çiçeklenme öncesi dönemde toplanan <i>D. sericea</i> bitki türünün herba kısmında fenolik ve flavonoid bileşen analizinde 335 nm dalga boyunda elde edilen kromatogram	59

Şekil 4.21. Malik asit kalibrasyon grafiği.....	63
Şekil 4.22. Okzalik asit kalibrasyon grafiği.....	63
Şekil 4.23. Sitrik asit kalibrasyon grafiği.....	64
Şekil 4.24. Süksinik asit kalibrasyon grafiği	64
Şekil 4.25. Tartarik asit kalibrasyon grafiği.....	65
Şekil 4.26. Çiçeklenme döneminde toplanmış <i>D. gnidioides</i> bitki türünün herba kısmına ait organik asit analizinde elde edilmiş kromatogram.....	66
Şekil 4.27. Fruktoz kalibrasyon grafiği.....	67
Şekil 4.28. Glukoz kalibrasyon grafiği	67
Şekil 4.29. Sakkaroz kalibrasyon grafiği	68
Şekil 4.30. ACN/Su (30/70, V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	74
Şekil 4.31. ACN/Su/AA (50/50/1, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	74
Şekil 4.32. ACN/Su/AA (95/5/2, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	74
Şekil 4.33. ACN/Su/FA (75/25/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	75
Şekil 4.34. ACN/Su/FA (95/5/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	75
Şekil 4.35. MeOH/Su (10/90, V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	75
Şekil 4.36. MeOH/Su (60/40, V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	75
Şekil 4.37. MeOH/Su/AA (50/50/2, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	76
Şekil 4.38. MeOH/Su/AA (90/10/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	76
Şekil 4.39. MeOH/Su/FA (50/50/1, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	76
Şekil 4.40. ACN/MeOH (40/60,V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	76

Şekil 4.41. ACN/MeOH (60/40,V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram	77
Şekil 4.42. ACN/MeOH/AA (10/90/1,V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	77
Şekil 4.43. ACN/MeOH/FA (10/90/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	77
Şekil 4.44. ACN/MeOH/FA (50/50/1, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram.....	77
Şekil 4.45. 0,10 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	78
Şekil 4.46. 0,20 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	79
Şekil 4.47. 0,30 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	79
Şekil 4.48. 0,40 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	79
Şekil 4.49. 0,45 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	79
Şekil 4.50. 0,50 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	80
Şekil 4.51. 0,65 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	80
Şekil 4.52. 0,75 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	80
Şekil 4.53. 0,80 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	80
Şekil 4.54. 1,00 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram	81
Şekil 4.55. 15 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	82
Şekil 4.56. 20 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	83
Şekil 4.57. 25 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	83
Şekil 4.58. 30 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	83
Şekil 4.59. 40 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	83
Şekil 4.60. 45 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	84
Şekil 4.61. 55 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	84
Şekil 4.62. 65 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	84
Şekil 4.63. 70 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	84
Şekil 4.64. 80 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram	85

Şekil 4.65. 2 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	86
Şekil 4.66. 4 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	86
Şekil 4.67. 6 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	86
Şekil 4.68. 8 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	86
Şekil 4.69. 10 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	87
Şekil 4.70. 15 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	87
Şekil 4.71. 25 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	87
Şekil 4.72. 30 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	87
Şekil 4.73. 35 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	88
Şekil 4.74. 40 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram	88
Şekil 4.75. Rosmarinik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği	89
Şekil 4.76. Seçicilik çalışmasında kullanılan kör numunenin kromatogramı.....	93
Şekil 4.77. Seçicilik çalışmasında kullanılan rosmarinik asit ve sinapik asit standartlarının kromatogramı	94
Şekil 4.78. Çiçeklenme döneminde toplanan <i>D. sericea</i> bitki türünün herba kısımında optimize edilen metot ile rosmarinik asit analizi sonucu elde edilen kromatogram	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazların isimleri, marka-modelleri ve kullanım amaçları	13
Çizelge 3.2. Kullanılan mobil faz bileşimleri	22
Çizelge 3.3. Kullanılan akış hızı değerleri	23
Çizelge 4.1. Çiçeklenme döneminde toplanmış <i>D. sericea</i> bitki türünde farklı çözücülerin kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları	26
Çizelge 4.2. Çiçeklenme döneminde toplanmış <i>D. sericea</i> bitki türünde farklı çözücü oranlarının kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları	27
Çizelge 4.3. Çiçeklenme döneminde toplanmış <i>D. sericea</i> bitki türünde farklı ekstraksiyon sıcaklıklarının kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları	30
Çizelge 4.4. Çiçeklenme döneminde toplanmış <i>D. sericea</i> bitki türünde farklı ekstraksiyon sürelerinin kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları	31
Çizelge 4.5. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam fenolik madde miktarları	33
Çizelge 4.6. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam flavonoid madde miktarları	36
Çizelge 4.7. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin DPPH metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarları	37
Çizelge 4.8. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin FRAP metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarları	40
Çizelge 4.9. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam klorofil miktarları	41
Çizelge 4.10. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam karotenoid miktarları	43
Çizelge 4.11. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam antosiyanin miktarları	45
Çizelge 4.12. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki C vitamini miktarları	47
Çizelge 4.13. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> bitki türünün farklı kısımlarındaki kateşin, şiringik asit ve sinapik asit miktarları	57

Çizelge 4.14. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> bitki türünün farklı kısımlarındaki rosmarinik asit, klorojenik asit ve epikateşin miktarları	58
Çizelge 4.15. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. gnidioides</i> bitki türünün farklı kısımlarındaki kafeik asit, rosmarinik asit ve sinapik asit miktarları	59
Çizelge 4.16. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. gnidioides</i> bitki türünün farklı kısımlarındaki rutin, klorojenik asit ve ferulik asit miktarları.....	61
Çizelge 4.17. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. gnidioides</i> bitki türünün farklı kısımlarındaki malik asit miktarları.....	65
Çizelge 4.18. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki glukoz miktarları	68
Çizelge 4.19. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> ve <i>D. gnidioides</i> bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam yağ verimi değerleri	70
Çizelge 4.20. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. sericea</i> bitki türünün farklı kısımlarındaki yağ bileşen değerleri.....	71
Çizelge 4.21. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış <i>D. gnidioides</i> bitki türünün farklı kısımlarındaki yağ bileşen değerleri.....	72
Çizelge 4.22. Kullanılan farklı mobil faz bileşimleri (V/V/V) ve hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri	73
Çizelge 4.23. Kullanılan akış hızlarına göre alıkonma zamanı ve hesaplanan teorik tabaka yüksekliği değerleri	81
Çizelge 4.24. Çalışılan farklı kolon sıcaklıklarında hesaplanan pik alanları ve USP kuyruklanma faktörü değerleri.....	82
Çizelge 4.25. Kullanılan farklı enjeksiyon hacimlerine göre hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri	85
Çizelge 4.26. Doğruluk parametresi verileri.....	89
Çizelge 4.27. Gün içi kesinlik parametresi verileri (1. Gün)	90
Çizelge 4.28. Gün içi kesinlik parametresi verileri (2. Gün)	91
Çizelge 4.29. Gün içi kesinlik parametresi verileri (3. Gün)	91
Çizelge 4.30. Günler arası kesinlik parametresi verileri (1., 2. ve 3. Gün)	92
Çizelge 4.31. Seçicilik çalışması	93

1. GİRİŞ

1.1. Tıbbi Bitkiler

Doğada bulunan tüm canlılar ekolojik bir dengeğin ürünü ve unsurudur. Mitolojik bilgilere göre bitkiler; tanrının insanlara verdiği en değerli armağan olarak tasvir edilmiştir. İnsanların bitkiler ile olan ilişkisi insanlık tarihi kadar eskidir. Arkeolojik kazılardan elde edilen bulgulara göre insanlar besinlerini sağlamak ve sağlığını korumak için bitkilerden faydalanmıştır (Koçyiğit ve Özhatay 2005).

Oldukça geniş bir kullanım alanına sahip tıbbi bitkileri tanımlamak tam olarak mümkün değildir. “Tıbbi” ve “aromatik” terimleri bir arada kullanılmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkiler, insanlık tarihinin başlangıcından beri sağlığın devamını sağlayan, hastalıkları iyileştiren ve tedavi amaçlı ilaç olarak kullanılan bitkiler olarak tanımlanabilir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011; Temel vd. 2018).

İlk kez Fransız hekim Henri Leclerc (1870-1955) “tıbbi bitkiler ile tedavi” anlamına gelen “fitoterapi” terimini kullanmıştır. Bitkiler topraktan aldıkları su ve mineral maddeler gibi bazı öğeleri, insan vücudunun kullanabileceği bileşenlere dönüştürürler. Bitkilerden elde edilen bu bileşenler insan vücudunun savunma gücünü artırarak ve bazı organları destekleyerek iyileşme sağlarlar. Ayrıca; bitki metabolizmasının doğal ürünü olan metabolitler, ilaç endüstrinin en temel ürünüdür (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011). 2011 yılında gündeme alınmış olan bir yönetmelik ile bilimsel olarak tıbbi özelliği ispatlanmış ve kabul edilmiş bitkisel ilaçların tedavi amaçlı kullanımının uygun olacağı belirtilmiştir. Aynı zamanda, 2013 yılında yayınlanmış bir yönetmelikte “Geleneksel Tamamlayıcı Tıp” başlığı altında 14 tedavi yöntemine yer verilmiştir (Özkan 2014).

Eski çağlardan bu yana tıbbi ve aromatik bitkiler; alternatif tıp, vücut bakımı, beslenme, sanayi ve dini törenler gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Günümüzde ise sentetik ve kimyasal ilaçların yan etkileri nedeniyle şifalı bitkilere daha yoğun bir talep olmuştur (Kırbağ ve Bağcı 2000; Sarı vd. 2010; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013; Güler vd. 2015; Bayraktar vd. 2017; Temel vd. 2018). Bu bitkilerin sadece tıbbi bitki başlığı altında incelenmesinin yanlış ve eksik olacağını düşünen araştırmacılar; baharat bitkileri, süs bitkileri, boya bitkileri ve kuru çiçekçilikte kullanılan bitkileri bu çerçevede incelemişlerdir (Arslan vd. 2010).

Tıbbi ve aromatik bitkiler başlığı adı altında geçen birçok bitki aynı zamanda boyar bitki olarak da kullanılmaktadır. Doğal boyar bitkiler; yıllık veya iki yıllık, toksik olmayan ve çevre kirliliğine neden olmayan bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Doğal boyamacılık ilk kez M.Ö. 4000 yılında Hindistan’da ve Mezopotamya’da başlamıştır. Boyacı katırtırnağı (*Genista tinctoria* L.), kadife çiçeği (*Tagetes erecta* L.), civanperçemi (*Achillea fraasii* Sch. Bip.), defne (*Daphne oleoides* Schreb.), çivit otu (*Isatis tinctoria* L.), kökboya (*Rubia tinctorum* L.), ısırgan otu (*Urtica dioica* L.), kantaron (*Hypericum empetrifolium* Wild.), ceviz (*Juglans regia* L.), hayıt (*Vitex agnus-castus* L.) ve ebe gümeci (*Malva sylvestris* L.) doğal boyamacılıkta kullanılan bitkilere örnek olarak gösterilebilir (Karadağ 2017).

Birçok bitkinin gen merkezi olan ülkemizin sahip olduğu coğrafi yapısı nedeniyle biyoçeşitlilik açısından zengin ülkeler arasında yer aldığı bilinmektedir. Ülkemiz florasında 9996 türün ve 3649'u endemik olmak üzere 117007 bitki taksonunun bulunduğu bilinmektedir (Arslan vd. 2010; Bayraktar vd. 2017). Ülkemiz dünya kara yüzölçümünün % 0,53'ünü temsil etmesine rağmen, dünya bitki türünün yaklaşık olarak % 3,6'sına sahiptir. Bu da ülkemizin sahip olduğu tür zenginliğini göstermektedir. Ülkemizin sahip olduğu coğrafi konumu, topografik ve jeolojik özellikleri, farklı iklim bölgelerinde bulunması, yarımada olması, step, orman, maki, vb. farklı yaşam alanlarına sahip olması bu tür zenginliğinin sebepleri arasında gösterilebilir. Türkiye'de tespit edilen 9222 bitki türünün yaklaşık olarak % 5'i (500 adedi), dünyada ise 422000 bitkinin yaklaşık olarak % 12'si (52885 adedi) tıbbi bitkidir (Schippman vd. 2002). Tıbbi ve aromatik bitkiler genellikle ülkemizde Ege, Marmara, Akdeniz, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yetişmektedir (Gül ve Çelik 2016).

Ülkemiz tıbbi ve aromatik bitki popülasyonu bakımından zengin bir içeriğe sahip olmasına rağmen, ülkemizin dünya pazarında hak ettiği payını alamadığı yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, özellikle tıbbi ve aromatik bitkilerin ürüne işlenmesi konusunda çok yetersiz olduğumuz vurgulanmıştır. Ülkemizin bu pazarda hak ettiği payı alabilmesi için içeriği yüksek kaliteli tıbbi bitkilerin üretimine önem verilmesi, standartlara uygun tıbbi bitki üretilmesi, bunlardan elde edilen ekstraktların üretiminin artırılması ve bu ürünleri işleyen sanayi kollarının geliştirilmesinin gerekliliği ifade edilmiştir (Gül ve Çelik 2016; Temel vd. 2018). Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki dünyada tıbbi bitkiler, genellikle standardize edilmiş ekstraktlar şeklinde kullanılmaktadır. Ülkemizde ise bunun tam aksine, bitkisel ilaç ve takviye edici gıda üreten yerli firmaların ara mamül olarak kullandıkları ekstraktları Amerika, Çin ve Almanya'dan temin ettiği belirlenmiştir. Bu araştırmalarla yerli üretimde ekstre üretiminin artırılmasıyla ülkemizin bu konudaki dışa bağımlılığının azaltılacağı sonucuna varılmıştır (Arslan vd. 2010).

Çin'de bitkisel ekstraktların ilaç amaçlı kullanımı M.Ö. 2700 yıllarına kadar dayanmaktadır. Yabancı bitkilerin ilaç olarak kullanımının Anadolu'da da eski tarihlere dayandığı bilinmektedir. Halk arasında çok daha fazla olmasına rağmen, Türk farmakopesinde 140 adet kadar tıbbi bitki kayıtlıdır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013).

Son yıllarda, ulusal ve uluslararası düzeyde gıda koruyucu maddeler olarak kimyasal maddelerin kullanıma yasal sınırlama getirilmiştir. Bu sebeple bitkilerden elde edilen antioksidan özellikli uçucu yağlara ve ekstraktlara olan ilgi artmıştır. Bitkisel ürünlerin; yan etkilerinin az olması, güvenli ve sağlıklı ürünler olarak kabul edilmesi de bu ilginin artmasına neden olan faktörler arasındadır (Temel vd. 2018).

1.2. *Daphne sericea* ve *Daphne gnidioides* Türleri ve Kullanımı

Tan ve Davis (1982)'nin "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" isimli çalışmasında belirttiği Türkiye florasında kayıtlı olan 7 adet *Daphne* türü de (*D. gnidioides* Jaub. & Spach, *Daphne glomerata* Lam., *D. pontica* L., *D. mucronata* Royle, *D. oleoides* Schreb., *D. mezereum* L., *D. sericea* subsp. *sericea* Vahl.) Anadolu'da doğal olarak yetişmektedir. *Daphne* cinsi, Thymelaeaceae familyasına aittir (Tan ve

Davis 1982; Tosun 2006). *Daphne* cinsi Anadolu’da çıtlak, develik otu, ezente ve tasma olarak bilinen 8 adet takson ile temsil edilmektedir (Arkan 2011; Tongur 2014).



Şekil 1.1. Çalışmada materyal olarak kullanılan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin toplandıkları doğal ortamlarındaki görünüşleri

30-100 cm çalılarından oluşan *Daphne sericea* subsp. *sericea* Vahl, 0-1150 m yüksekliğinde yetişmektedir. 5-10 kümeler halinde bulunan kokulu çiçeklere sahip olan bu bitkinin çiçeklerinin salgıladığı kokular sayesinde bitkinin polenleri arıların oldukça ilgisini çekmektedir. 5-6 mm çapında portakal kırmızısı renginde meyvelere sahiptir. Türkçe adı “develik” olan bitki Kuzeybatı, Güney ve Batı Anadolu’da yayılış göstermektedir. Endemik özellik göstermeyen bu çok yıllık bitkinin çiçeklenme zamanı, literatürde Şubat ve Mayıs ayları arası olarak belirtilmiştir (Tan ve Davis 1982; Baydar ve Gürel 1998; Kaya ve Aladağ 2009; Temel ve Tan 2009; Arkan 2011; Tongur 2014).

Dalları kahverengi olan *D. gnidioides* Jaub. & Spach, 0,5-2 m boyunda ve 0-1150 m yükseklikte yetişen bir çalıdır. Küme şeklinde çiçekleri bulunan bitkinin yaprakları elips şeklinde, neredeyse sapsız ve dardır. 5-7 mm boyutunda turuncu-kırmızı oval meyveleri bulunmaktadır. Endemik özellik göstermeyen bu çok yıllık bitkinin çiçeklenme zamanı, literatürde Mayıs ve Ağustos ayları arası olarak belirtilmiştir. Türkçe adı “serçe dili” olan bu bitki, Türkiye’de Güney ve Güneybatı Anadolu’da yayılış göstermektedir (Tan ve Davis 1982; Kaya ve Aladağ 2009; Arkan 2011; Tongur 2014).

Yapılan araştırmalar incelendiğinde, halk arasında değişik kullanım alanları mevcut olan *Daphne* türlerinin diş ağrılarında, ülser tedavisinde, deri hastalıklarında ve eklem ağrılarında kullanıldığı belirtilmiştir. Birçok biyolojik ve farmakolojik özelliğe sahip olan *Daphne* türlerinin balgam söktürme, terletme ve tenya öldürme gibi etkileri olduğu da vurgulanmıştır. Yüksek antioksidan aktivitesi sebebiyle kanser tedavisinde de etkili olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda, doğal boya olarak ve kağıt endüstrisinde kullanımı da mevcuttur (Arkan 2011; Tongur 2014; Tosun 2006).

1.3. Fenolik Bileşikler

Hava kirliliği, hareketsiz yaşam, dengesiz ve sağlıksız beslenme ve katkı maddeli gıdalar, vücutta serbest radikal oluşumunu arttırmaktadır. Serbest hale gelen oksijen atomları hidrojen atomunu kopararak doku tahribatına yol açmaktadır ve

bağışıklık sistemine zarar vermektedir. Antioksidan maddeler, serbest radikalleri bloke edip zincir reaksiyonlarını durdurmaktadır. Böylelikle pek çok hastalığın ve erken yaşlanmanın önüne geçilmiş olmaktadır. Yeşil ve kırmızı yapraklı bitkiler zengin antioksidan kaynaklarıdır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013).

Antioksidanlar, serbest radikallerin etkisini yok eden sistemler olarak tanımlanmaktadır. Sentetik antioksidanların yan etkilerinden dolayı, doğal antioksidanlara karşı yönelim mevcuttur. Özellikle gıda endüstrisi, yağlı gıdalarda oksidasyonu önlemek için antioksidan maddeler kullanmaktadır. Bu amaçla, zengin antioksidan kaynağı olan tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgi artmıştır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013).

Doğal antioksidanların en önemli bölümünü fenolik bileşenler oluşturmaktadır (Gray 1978; Jovanovic vd. 1984; Moure vd. 2001). En yaygın bulunan fenolik antioksidanlar; kumarinler, tokoferoller, flavonoidler, sinamik asit türevleri ve fenolik asitlerdir. Bu maddeler, bitkinin tüm kısımlarında farklı oranlarda bulunabilirler. Bunlar, gıdalarda koku ve tat özelliklerini arttırmak için kullanılmaktadırlar (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2013).

Fenolik bileşikler; amino asit metabolizması sırasında sentezlenen benzen halkasına bağlı hidroksil grubundan oluşan aromatik bileşikler olarak tanımlanırlar (Aydınlık 2012; Akıcı 2018). Yapılan çalışmalar sonucunda, bitkilerin temel bileşenlerinden olduğu kabul edilen fenolik bileşenlerin bitkilerde 6000'in üzerinde farklı çeşidinin olduğu tespit edilmiştir (Akyüz 2011; Akıcı 2018). Fenolik asit ve türevleri, bitkilerde dağınık bir şekilde bulunup her bitkide farklı şekilde etki gösterebilirler. Örneğin; bitkinin çiçeklenme öncesi, çiçeklenme ve çiçeklenme sonrası gibi farklı gelişme dönemlerinde; yaprak, herba ve çiçek gibi farklı kısımlarında veya kurutma ve saklama işlemleri esnasında fenolik asit sayısı, türü ve miktarı farklılaşabilmektedir (Akcı 2018). Fenolik bileşikler temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak iki gruba ayrılırlar (Akyüz 2011; Dursun 2011; Aydınlık 2012; Akıcı 2018). Fenolik asitler ve flavonoidler bitkilerde yüksek miktarda bulunurlar (Dursun 2011; Aydınlık 2012). Fenolik bileşiklerin bitkilerin rengi, tadı, sağlığı ve antioksidan özellikleri üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır (Akyüz 2011; Aydınlık 2012). Aynı zamanda, fenolik bileşiklerin insan sağlığı üzerinde de önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Özellikle son yıllarda araştırmacılar bu konu üzerinde yoğunlaşmışlardır.

1.4. Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit; 3,4-dihidroksifenillaktik asitin bir esteri olup, bitkilerde yaygın olarak bulunan antioksidan özelliğe sahip fenolik bir bileşendir (Kim vd. 2010; Nar 2011; Mısırlı 2013; Nicolai vd. 2016; Said 2016; Chua vd. 2018). Rosmarinik asit, bütün bitkilerde farklı miktarlarda bulunur (Said 2016). Rosmarinik asitin yapısında fenol halkası başına orto konumunda 1 adet hidroksil grubu içeren toplam 2 adet fenol halkası mevcuttur. Aynı zamanda; fenol halkaları arasında karbonil grupları, doymamış bir adet çift bağ ve bir adet karboksilik asit de bulunmaktadır (Said 2016).

Rosmarinik asit; antioksidan, antiviral, antimikrobiyal ve antienflamatuvar gibi çok sayıda biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahiptir. Antioksidan etkisi E

vitamininden daha yüksek olan rosmarinik asitin damar tıkanıklığını ve kanser riskini en aza indirdiği belirlenmiştir. Ayrıca; yapılan bir araştırmada, rosmarinik asitin alerjik astıma da iyi geldiği belirtilmiştir. Rosmarinik asit, gıdaların bozulmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için de kullanılmaktadır. Bu asitin, yüksek antioksidan aktivite etkisi sayesinde serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önlediği de bilinmektedir (Kim vd. 2010; Nar 2011; Mısırlı 2013; Nicolai vd. 2016; Said 2016; Chua vd. 2018).

1.5. Sıvı Kromatografisi ve Metot Optimizasyonu

Kromatografi; bir karışımın içindeki bileşenleri ayırmak veya saflaştırmak için karışımın mobil faz ile kolondaki sabit faz üzerinden geçirilmesi işlemine dayanır. Bu süreçte karışımdan ayrılacak bileşenler sabit ve mobil fazda farklı tutunma özelliklerine göre kolondan farklı sürelerde ayrılırlar. Kromatografiyi ilk kez Rus botanikçi Mikhail Tsweett 1903 yılında bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmak amacıyla geliştirmiştir. Kolonda renkli bantlar oluşması üzerine bu yöntem kromatografi adını vermiştir. Kolondan farklı ayrılma sürelerine göre sinyal üreten dedektör yardımıyla hem nitel hem de nicel bir ayırım gerçekleştirilebilir. Bu alanda en fazla yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemleri kullanılmaktadır (Özcan 2009; Etöz 2013; Gökçe 2015; Kaplan 2016; Açıkgöz Sağlam 2016).

HPLC, kolon kromatografisinin oldukça geliştirilmiş bir şekli olarak da tanımlanabilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi; yüksek duyarlılığa sahip olması, kesinliği yüksek sonuçlar vermesi, etkin ayırma ve hızlı analiz sağlaması, uçucu olmayan ve sıcaklıkla kolay şekilde bozulan türlerin ayırımına imkan sağlaması, sanayi ve birçok alanda uygulanabilir olması gibi nedenler ile bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılanıdır (Özcan 2009; Etöz 2013; Gökçe 2015).

1.6. Metot Validasyonu

Metot validasyonu; metodun analiz amacına uygun olup olmadığını belirlemek için yapılan ölçümler olarak tanımlanabilir (Kafalı 2008; Kaplan 2016; Semiz 2018). Validasyon işlemi, metodun kullanım amacına uygun olarak; doğruluk, gerçeklik, kesinlik, seçicilik, tayin limiti (LOD-Limit of detection), ölçüm limiti (LOQ-Limit of quantification), sağlamlık, doğrusalılık, geri kazanım, doğrusalılık aralığı ve kararlılık gibi parametreler kullanılarak gerçekleştirilebilir (Kafalı 2008; Etöz 2013; Hacıbekiroğlu 2013; Ertürk 2014; Gökçe 2015; Kaplan 2016).

Metot validasyonu, ortaya çıkan sorunları en aza indirmeyi mümkün kılar. Bu nedenle, istenen limit aralığında geliştirilmiş çok hassas bir metodu dahi kullanım sürecine bağlı olarak belirli aralıklar ile valide etmek gerekmektedir (Kafalı 2008; Kaplan 2016). Metot validasyonu analizleri sonunda tespit edilen performans kriterleri, verilen limit aralıklarında değilse uygulanan prosedür değiştirilmeli ve metot tekrar valide edilmelidir.

Bu tez çalışmasında validasyon işlemi; doğrusalılık, doğruluk, gün içi kesinlik, günler arası kesinlik, seçicilik, LOD, LOQ ve geri kazanım parametreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.7. Ekstraksiyon Standardizasyonu

Örneklerde bulunan eser düzeydeki bileşenleri; ayırmak, karakterize etmek ve izole etmek için ekstraksiyon basamağı gereklidir. Ekstraksiyon basamağını gerçekleştirmede temel prensip, çözücü moleküllerinin numune matrislerine girmesi ve böylelikle, bitkideki sitoplazma tabakasının çözücüye maruz kalmasına dayanmaktadır (Büyüktuncel 2012). Ekstraksiyon basamağı analitik işlemlerin oldukça önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Analiz süresini kısaltması, otomasyona uygun olması, organik çözücü tüketimini azaltması, kirliliği önlemesi, ekstraksiyon verimliliğinde artış sağlaması ve örnek hazırlama maliyetini azaltması gibi sebepler nedeniyle son yıllarda ekstraksiyon standardizasyon işlemi, önemini daha da arttırmıştır (Huie 2002; Büyüktuncel 2012).

Ekstraksiyon basamağının optimizasyonunda; sıcaklık, çözünürlük, katıların yayılma gücü, viskozite ve sıvıların yüzey gerilimi gibi unsurlar söz konusudur (Büyüktuncel 2012). Ekstraksiyon basamağının verimliliğinde ise çözücü, pH, sıcaklık, çözücü/numune oranı, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon yöntemi gibi faktörler etkilidir. Bu faktörlerin etkisi her zaman stabil değildir. Çözücülerin farklı kimyasal özellikte olması, numunenin yapısı ve bileşimi gibi nedenler her bir unsurun öngörülemez davranışlar sergilemesini sağlayabilir (Li vd. 2005; Hong and Kim 2010; Tomsone vd. 2012; Kenari vd. 2013).

Yapılan ekstraksiyon çalışmalarında genellikle çözücü olarak; su, etil asetat, petrol eteri, etanol, metanol, aseton, izopropanol ve bunların sulu karışımları tercih edilmiştir. Ayrıca, ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla bu çözücülerin farklı oranlardaki karışımları da uygulanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda, bağlı fenolik bileşikler belirlemek için alkaline hidrolizi yöntemi başarıyla kullanılmıştır. Polifenollerin ekstraksiyonunda farklı polariteye sahip oldukları için çeşitli organik çözücü-su karışımları tercih edilmiştir (Hong and Kim 2010). Ayrıca; çözücülerin polaritelerindeki değişim, ekstraksiyon verimini etkilemiştir (Bonoli vd. 2004; Goli vd. 2005; Li vd. 2005; Hong and Kim 2010; Olanlokun ve Akomolafe 2013; Tomsone vd. 2012).

Hong and Kim (2005); bitki materyallerinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada, suda daha fazla çözünür olan fenolik glikozitlerin ekstraksiyonunu daha verimli hale getirmek için çeşitli çözücü kombinasyonlarını denemişlerdir. Hacimce farklı etanol-su oranları (% 100, % 90, % 80, % 70 ve % 60) kullanıldığında toplam fenolik madde miktarı değerlendirilmiş ve yapılan çalışma sonucunda, en uygun çözücünün hacimce % 70'lik etanol-su çözeltisi olduğu belirlenmiştir.

Li (2005), *Perilla frutescens* bitkisinin yapraklarından fenolik bileşen elde etmek için ekstraksiyon optimizasyonunu yaptığı çalışmada su-metanol karışımını en uygun çözücü olarak belirlemiştir. Çözücü hacminin artırılmasının bileşenleri daha etkili çözdüğünü ve ekstraksiyon verimini artırdığını saptamıştır. En yüksek ekstraksiyon verimliliğini % 70 metanol çözeltisi ile elde etmiş ve sudaki metanol oranı azaldıkça ekstraksiyon verimliliğinin azaldığını belirtmiştir.

Tomsone vd. (2012), yaptıkları çalışmada, bitki materyallerinden polifenollerin elde edilmesi için kullanılan ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücünün çözünürlüğünün oldukça önemli olduğunu bulmuşlardır. Kullanılan çözücünün polaritesinin fenolik madde çözünürlüğünün artırılmasında da etkili olduğu belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin polaritesi farklılık gösterdiği için tüm bitki fenollerinin ekstraksiyonu için uygun tek bir standart prosedür geliştirmek oldukça zordur. Yapılan çalışmada, en uygun çözücü sistemi olarak etanol-su karışımı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda ekstraksiyon süresinin de ekstraksiyon verimliliğini arttırmakta oldukça etkili olduğu bulunmuştur (Bonoli vd. 2004; Li vd. 2005; Hong and Kim 2010; İnanç ve Yüksel 2018).

Li (2005) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, ekstraksiyon süresi ile orantılı olarak ilk 60 dk boyunca ekstraksiyon veriminin hızlı bir şekilde arttığı ve sonra 90 dk'ya kadar artışta bir azalmanın olduğu bildirilmiştir. Numune 45 dk'lık iki set halinde art arda ekstrakte edildiğinde, tek seferde 90 dk ekstrakte edilmesinden daha verimli sonuç elde edilmiştir. Sonuç olarak art arda 30 dk'lık 3 set şeklinde ekstraksiyonun uygun sistem olduğu bulunmuştur.

Hong and Kim (2010) tarafından yapılan çalışmada, ekstraksiyon süresinin etkisi çeşitli çözücü koşullarında belirlenmiştir. Ekstraksiyon süresi 12 saatten 24 saate çıktığında numunenin toplam fenolik madde miktarında belirgin bir artış gözlemlenmiş ve optimum ekstraksiyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

Modern numune hazırlama tekniklerinin geliştirilmesiyle dünya çapındaki tüketicilere tıbbi bitki ekstraksiyonu ve analizi için kaliteli ürün sağlanabilecektir (Huie 2002). Kullanılan materyalden elde edilmek istenen etken maddenin daha verimli bir şekilde alınabilmesi için ekstraksiyon basamağı oldukça önemlidir. Ekstraksiyon basamağının optimize edilmesi; daha az kimyasal sarfıyatı, maliyetin ve kirliliğin azalması, zamanın kısılması ve verimliliğin artması gibi faydalar sağlayabilmektedir.

1.8. Biyokimyasal İçerik

Bitki dokularında meydana gelen oksidatif bozunmalar yağların parçalanmasına, kötü tat ve koku oluşumuna, raf ömrü ve besin değerinin azalmasına sebep olur. Antioksidanlar, oksidasyon sebebiyle meydana gelen acılaşmayı ve diğer tat bozulmalarını geciktirme veya önleme özelliğine sahiptir (Meyer vd. 2000; Maslarova ve Heinonen 2001; Heinonen ve Meyer 2002). Bitkilerin antioksidan aktivitesinin insan sağlığına etkileri nedeniyle bitkilerdeki antioksidan aktivitenin belirlenmesi büyük önem kazanmaktadır. Ayrıca, yapay antioksidanların yan etkilerinin bulunması nedeniyle doğal antioksidan kaynakları tercih edilmektedir.

Daha önce *Daphne* türleri ile yapılan çalışmalar bu bitkilerin zengin fenolik madde içeriğine sahip olduğunu göstermektedir. Yüksek fenolik içeriğine bağlı olarak yüksek antioksidan aktivite değerleri bulunmuştur. Türlerin antioksidan aktivite değerleri farklı metotlar ile saptanmıştır (Tosun 2006; Küpeli vd. 2007; Grubescic vd. 2012; Zengin vd. 2012; Sanda vd. 2015; Balkan vd. 2016; Tongur vd. 2018).

Daphne türlerinde sabit yağ bulunduğu tespit edilmiş ve majör sabit yağ bileşeni olarak linoleik asit belirlenmiştir (Tosun 2006; Zengin vd. 2012). Yapılan çalışmalar linoleik asitin kandaki kolesterol seviyesini düşürmede ve kalp sağlığını korumada etkili olduğunu göstermiştir (Çelik 2017; Türker 2019).

Molekül yapısında hidroksil (–OH) ve karboksil (–COOH) gruplarını bulunduran doğal bileşiklere organik asit bileşeni denilmektedir. Organik asitler; bitki, sebze ve meyvelerde doğal olarak yapısal bir bileşik halinde bulunabildiği gibi daha sonra fermentasyon yoluyla da oluşabilmektedir. Meyve, sebze ve bitkilerde suda çözülmüş halde bulunan organik asit bileşenlerinin farklılığının ürün kalitesini etkilediği yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır. Organik asit/şeker oranının meyve ve sebzelerde koku ve tat gibi karakteristik özellikleri belirlediği bildirilmiştir. Bu oran, aynı zamanda hasat zamanı, olgunlaşma düzeyi ve mikrobiyal bozulma düzeyine de etki etmektedir. Sitrik asit, fumarik asit ve tartarik asit bazı gıdalarda tat dengesinin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Benzoik asit ise koruyucu olarak kullanılmaktadır (Nardi vd. 2003; Demiray 2006; Çevik 2013; Coşkun 2016).

İnsan beslenmesinde oldukça önemli rol oynayan C vitamininin (askorbik asit) güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Suda çözünen vitaminler arasında yer alan C vitamini insan vücudu tarafından sentezlenmediği için bu vitaminin dışarıdan günlük olarak alınması zorunludur. Bu nedenle, C vitamini bakımından zengin meyve ve sebzelerin tüketilmesi gerekmektedir (Çetin vd. 2012; Kubat vd. 2013; Karataş 2013; Öz vd. 2018; Gündoğdu ve Yılmaz 2013; Bengü vd. 2019). C vitamini bağışıklık sistemini güçlendirir, doku bağlarını bir arada tutan ana protein olan kolajen üretimini sağlar, beyaz kan hücresi oluşumuna destek olur, kemik, eklem, diş ve diş etlerinin oluşumunda ve korunmasında oldukça etkilidir. C vitamini insan sağlığı bakımından önemli olmasının yanında gıdaların işlenmesinde de katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. C vitamini; oksidasyon, yüksek sıcaklık, ışık ve nem içeriği nedeniyle oldukça kolay bozulmaktadır. Bu nedenle, C vitamini kaybı gıdalarda oldukça önemli bir kalite ölçütü olarak değerlendirilmektedir (Demiray 2006; Dizlek ve Gül 2007; Çetin vd. 2012)

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bitki türü, hasat zamanı, iklim, toprak yapısı, dönem, sulama, rakım ve bitkinin kısımları gibi faktörler bitkilerin biyokimyasal içeriğinde oldukça önemli farklılıklara neden olmaktadır (Tosun 2006; Küpeli vd. 2007; Grubesić vd. 2012; Zengin vd. 2012; Sanda vd. 2015; Balkan vd. 2016; Tongur vd. 2018).

1.9. Çalışmanın Amacı

D. sericea ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı gelişme dönemlerinde farklı bitki kısımlarındaki biyokimyasal bileşenlerini ayırmak, karakterize etmek ve miktarlarını belirleyebilmek için ekstraksiyon basamağı gereklidir. Ekstraksiyon basamağının analitik işlemlerinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasının amaçlarından ilki ekstraksiyon metodunun optimizasyonunun gerçekleştirilmesidir.

D. sericea ve *D. gnidioides* türlerinde var olan değişik etken madde grupları, bitkinin iltihap önleyici, sitotoksik, antimutajenik ve antifungal aktivitelere sahip

olmasını sağlamaktadır. Bu sebeple; bitkilerde toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, 2,2-difenil-1-pikril hidrazil radikal söndürücü kapasite (DPPH) yöntemi ve demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemi ile antioksidan aktivite miktarı, toplam klorofil miktarı, toplam karotenoid miktarı, toplam antosiyanin miktarı, C vitamini miktarı, fenolik ve flavonoid bileşen miktarı, organik asit bileşenleri miktarı, şeker bileşenleri miktarı, toplam yağ verimi ve yağ bileşenleri miktarı analizleri yapılmak suretiyle bitkilerin biyokimyasal karakterizasyonunun yapılması da çalışmanın amaçlarından biridir. Aynı zamanda, farklı (çiçeklenme öncesi, çiçeklenme ve çiçeklenme sonrası) dönemlerde toplanan bitkilerin farklı (yaprak, çiçek ve herba) kısımlarının biyokimyasal içeriğinin saptanacak olması da çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

Çalışmanın son aşamasında ise; *D. sericea* ve *D. gnidioides* türlerinde belirlenen “rosmarinik asit” bileşeninin kantitatif olarak tayin edilebilmesi için metot optimizasyonunun ve validasyonunun gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

Süntar (2011), yaptığı çalışmada ülkemizde yara iyileştirilmesinde kullanılan bazı bitkilerin aktivitelerini incelemiştir. Bu amaçla, *D. oleoides* subsp. *oleoides* ve *D. oleoides* subsp. *kurdica* bitki türlerini hacimce % 85'lik metanol çözeltisi ile oda sıcaklığında yarım saat süresince ekstrakte etmiş ve bu işlemi 2 gün ara ile 5 kez tekrarlamıştır.

Köybaşı (2010), yaptığı çalışmada Hatay bölgesinde yetiştirilen bazı bitkilerin antioksidan kapasitelerini incelemiştir. Bitkilerin antioksidan kapasitelerini incelerken 3 farklı ekstraksiyon metodu denemiştir. İlk ekstraksiyon metodunda; bitkiler hacimce % 70'lik metanol çözeltisi ile 40 °C'deki su banyosunda 30 dk (4 kez) ekstrakte edilmiştir. İkinci ekstraksiyon metodunda; hacimce % 70'lik metanol çözeltisi ile 40 °C'deki su banyosunda 30 dk (4 kez) ekstrakte edilmiş örnekler etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna maruz bırakılmıştır. Son ekstraksiyon metodunda; bitkiler hacimce % 50 metanol içeren 1,2 M HCl çözeltisi ile 40 °C'deki su banyosunda 1 saat (4 kez) hidroliz edilmiştir. Daha sonra sulu kısım etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabi tutmuştur. Ekstraksiyon verimleri toplam fenolik madde miktarına göre değerlendirilmiştir. Sonuç olarak toplam fenolik madde miktarı en fazla asidik ekstraksiyon yönteminde bulunurken, en az metanolik ekstraksiyonda bulunmuştur.

Açıkgöz Sağlam (2016), yeşil çaydan L-teanin elde etmek için ekstraksiyon optimizasyonu yaptığı çalışmasında ekstraksiyon verimine sürenin, sıcaklığın ve çözücü oranının etkilerini incelemiştir. L-teanin miktarının sıcaklık, süre ve çözücü oranı ile birlikte artma eğiliminde olduğunu tespit etmiştir. Klasik ekstraksiyonda L-teanin verimi için optimum koşullar; 90 °C sıcaklık, 40 dk ekstraksiyon süresi ve 23 mL su/1g çay oranı olarak bulunmuştur.

Alberti vd. (2014), yaptıkları çalışmada ekstraksiyon optimizasyonu için sıcaklık, zaman ve çözücü derişimi gibi parametreleri denemişlerdir. Ekstraksiyon verimini toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan kapasitesi (DPPH ve FRAP yöntemleri ile) analiz sonuçlarına göre değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak, optimum ekstraksiyon koşullarını çözücü olarak hacimce % 84,5'lik metanol çözeltisi, sıcaklık olarak 28 °C'yi ve süre olarak 15 dk'yı belirlemişlerdir.

Juntachote vd. (2006), yaptıkları çalışmada; limon otu (*Cymbopogon citratus*), havlıcan (*Alipnia galanga*), hint fesleğeni (*Ocimum sanctum*) ve biberiye (*Rosmarinus officinalis*) bitkileri ile çalışmışlardır. Bu bitkiler için optimum ekstraksiyon metodunu bulmayı amaçlamışlardır. Ekstraksiyon parametreleri olarak; etanol:su oranı, sıcaklık ve süreyi kullanmışlardır. Ekstraksiyon verimine; ekstraktların toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi analiz sonuçlarına göre karar vermişlerdir. Optimum ekstraksiyon çözücüsü; her dört bitki için de 3/1 (V/V) etanol/su çözeltisi olarak belirlenmiştir. Sıcaklık ve süre ise sırasıyla limon otu için 25 °C ve 30 dk; havlıcan ve hint fesleğeni için 75 °C ve 90 dk ve biberiye için 75 °C ve 30 dk olarak bulunmuştur.

Eghdami ve Sadeghi (2010), yaptıkları çalışmada *Achillea millefolium* bitkisinin ekstraksiyon verimini belirlemeyi amaçlamışlardır. Ekstraksiyon verimini toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı analiz sonuçlarına göre değerlendirmişlerdir. Toplam fenolik madde miktarı metanolik ekstrede 123,9 mg

GAE/g ve sulu ekstrede 48,4 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarı ise metanolik ekstrede 41,2 mgQE/g ve sulu ekstrede 13,15 mgQE/g olarak bulunmuştur.

Yağcıoğlu (2015), yaptığı çalışmada adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinin optimum ekstraksiyon koşullarını antioksidan aktivite analiz sonuçlarına göre değerlendirmiştir. Ekstraksiyon parametrelerini; sıcaklık, süre ve çözücü derişimi olarak seçmiştir. Sonuç olarak optimum ekstraksiyon koşullarını hacimce % 60'lık etanol ile 53,93 °C sıcaklık ve 84 dk ekstraksiyon süresi olarak tespit etmiştir.

Baydar ve Gürel (1998), Antalya'nın doğal florasında bulunan çiçekli bitkiler üzerine yaptıkları çalışmada *D. sericea* bitkisinin protein miktarını % 14,70 olarak bildirmişlerdir. Bitkinin sabit yağ içeriği palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit ve araşidik asit bakımından sırasıyla % 16,52, % 3,42, % 49,54, % 17,58, % 6,43 ve % 19,37 şeklinde tespit edilmiştir. *D. sericea* bitkisinin mineral madde içeriği potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), sodyum (Na), demir (Fe), çinko (Zn), mangan (Mn) ve bakır (Cu) bakımından sırasıyla 4580 µg/g, 3660 µg/g, 884 µg/g, 120 µg/g, 88,8 µg/g, 81,4 µg/g, 23,4 µg/g ve 10,6 µg/g olarak bulunmuştur.

Tosun (2006), *Daphne* türlerinin kimyasal içeriği ve biyolojik aktiviteleri ile ilgili yaptığı çalışmada, *Daphne* türlerinde flavonoid, kumarin, steroid ve terpenik yapıda maddelerin varlığından söz etmiştir. *D. gnidium* bitkisinin yaprağında gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) yardımıyla 110 mg/100 g α-tokoferol bulunduğunu bildirmiştir. *D. mezereum* bitkisinin çiçeklerinde ise % 95 oranında linalol tespit edildiğini belirtmiştir.

Arkan (2011), *D. oleoides* subsp. *oleoides* ve *D. sericea* bitkileri ile yaptığı çalışmada farklı çözücüler ile antioksidan aktivitelerini karşılaştırmıştır. *D. sericea* bitkisinin etanol, etilasetat, metanol ve hekzan ekstraktında toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 287,545, 341,818, 186,212 ve 3,182 mg GAE/g numune olarak belirlenmiştir.

Tongur (2014), *D. sericea* bitki türüne asitle hidroliz işlemi uyguladığı ekstraktları farklı çözücüler ile ekstrakte etmiştir. Metanol ekstraktında elde ettiği fenolik bileşen miktarlarını 100 g numunede klorojenik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, luteolin ve apigenin için sırasıyla 177,38 mg, 87,19 mg, 96,98 mg, 244,33 mg ve 129,01 mg olarak belirtmiştir. Tongur (2014), *D. gnidioides* bitkisindeki toplam karotenoid miktarını aseton çözücünde tespit edememiş, metanol çözücüsünde 11,85 mg/100 g numune ve hekzan çözücüsünde ise 44,18 mg/100 g numune olarak bildirmiştir.

Adham (2015), *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* ve *Osimum basilicum* bitki türlerinde çeşitli biyokimyasal analizler gerçekleştirdiği ve ekstraksiyon optimizasyonu yaptığı çalışmasında; HPLC'de rosmarinik asit analizi için metot validasyonu yapmıştır. Doğrusallık, doğruluk ve seçicilik parametrelerini incelemiş ve LOD ile LOQ değerlerini hesaplamıştır. 5-200 µg/mL arasındaki derişimlere sahip standart çözeltiler ile kalibrasyon grafiğini çizmiştir. LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 14,26 µg/mL ve 43,23 µg/mL olarak hesaplamıştır. Bu değerler, metodun iyi bir doğruluk ve hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik testi yapmış ve bağıl standart sapma (RSD) değerini en yüksek % 2,05 bulmuştur. Bu metodun

tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir. Geri kazanım değerini % 97,91-100,01 arasında tespit etmiştir.

Thyagaraj vd. (2013), *Ocimum sanctum* L. bitki türünde HPLC ile rosmarinik asit ve öjenol tayini analizi için metot validasyonu yapmışlardır. 16-257 mg/L arasındaki derişimlere sahip standart çözeltiler ile kalibrasyon grafiğini çizmişlerdir. LOD ve LOQ değerleri sırası ile 17,35 ng/mL ve 57,85 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değerler metodun iyi bir doğruluk ve hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik testi yapılmış ve RSD değeri alıkonma zamanı için % 0,22 ve pik alanı için % 1,93 olarak bulunmuştur. Geri kazanım değeri % 94,34-96,82 arasında tespit edilmiştir.

Choi vd. (2019), karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asit tayininde kullanılan metodun validasyonunu gerçekleştirmişler ve bu doğrulanmış metot ile numune analizini yapmışlardır. Rosmarinik asit analizi için 1,56-100 µg/mL arasındaki farklı derişimlerde 3 tekrarlı standart çözeltileri hazırlamışlar ve kalibrasyon grafiğini çizmişlerdir. LOD ve LOQ değerlerini; sırasıyla 0,385 µg/mL ve 1,14 µg/mL olarak belirlemişlerdir. 5, 10 ve 20 µg/mL'lik derişimler ile gerçekleştirilen gün içi tekrarlanabilirlik deneyleri için RSD değerleri sırasıyla % 1,5, % 1,8 ve % 0,2 ve % geri kazanım değerleri sırasıyla 90,8, 72,2 ve 70,6 olarak hesaplanmıştır. Aynı derişimlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen günler arası tekrarlanabilirlik analizlerinde RSD değerleri sırasıyla % 0,8, % 0,8 ve % 0,4 ve geri kazanım değerleri sırasıyla % 106,9, % 86,7 ve % 73,5 olarak belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Çalışmada bitki materyalleri olarak kullanılan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitkileri, doğal yayılış ortamı olan Akdeniz Üniversitesi makilik alanından bitkilerin doğal gelişimleri gözlemlenerek çiçeklenme öncesi dönemde, çiçeklenme döneminde ve çiçeklenme sonrası dönemde olmak üzere üç farklı dönemde toplanmıştır. Toplandıktan sonra hızlı bir şekilde laboratuvara getirilen bitki örnekleri, gölgede kurutulmuş ve daha sonra analizde kullanılmak üzere Retsch marka öğütücüde 1000 rpm’de öğütülmüştür. Öğütülmüş bitki örnekleri, ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilinceye kadar 4 °C’de saklanmıştır.

3.1.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve reaktifler

Çalışmada bitkilerdeki fenolik ve flavonoid bileşen miktarını belirleyebilmek amacıyla standart olarak kafeik asit, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, rosmarinik asit, kamferol, kateşin, vanilik asit, şiringik asit, sinnapik asit, rutin, kersetin, klorojenik asit, epikateşin, ferulik asit ve ellajik asit (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Çözücü olarak metanol (Sigma-Aldrich) ve distile su, mobil faz bileşimi olarak metanol (Sigma-Aldrich), distile su, asetonitril (Sigma-Aldrich), formik asit ve asetik asit (Fluka) kullanılmıştır. Ayrıca; biyokimyasal analizler için hekzan (Sigma-Aldrich), petrol eteri (Sigma-Aldrich), folin (Sigma-Aldrich), sodyum karbonat (Merck), 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich), sodyum nitrit (Merck), alüminyum klorür (Merck), sodyum hidroksit (Merck), metafosforik asit (Merck), potasyum klorür (Merck), sodyum asetat (Merck) ve potasyum hidroksit (Merck) kullanılmıştır.

3.1.2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Metot optimizasyonu ve validasyonu çalışmalarında dolgu materyali silika olan Thermo Scientific marka C18 (25 cm x 4,6 mm, 5µm) analitik kolon kullanılmıştır. Küresel yapılı olan dolgu malzemesinin gözenek boyutu 130 Å ve spesifik yüzey alanı 170 m²/g’dır. Çalışmalar sırasında kullanılan cihazların isimleri, marka-modelleri ve kullanım amaçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazların isimleri, marka-modelleri ve kullanım amaçları

Cihaz ismi	Cihazın marka ve modeli	Cihazın kullanım amacı
HPLC cihazı	Shimadzu LC 20-AT	Rosmarinik asit analiz metodunun optimizasyonu, validasyonu ve bazı biyokimyasal analizleri gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır.
GC cihazı	Agilent 7890	Numunelerin yağ bileşenleri analizinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.1'in devamı

Kütle spektrometresi dedektörü	Agilent 5975C	Numunelerin yağ bileşenleri analizinde kullanılmıştır.
UV-Vis Spektrofotometre	Shimadzu UV-1800	Ekstraksiyon optimizasyonunda ve örneklerin bazı biyokimyasal analizlerinde kullanılmıştır.
Sokslet cihazı	Gerhardt SOX-416	Örneklerin toplam yağ verimi analizi için yağ ekstraksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla kullanılmıştır.
Santrifüj	Sigma 2-16KL	Numunelerin ön hazırlık aşamasında çöktürme ile ayırma yapmak amacıyla kullanılmıştır.
Homojenizatör	IKA T25	Numunelerin ön hazırlık aşamasında numuneleri homojen hale getirmek amacıyla kullanılmıştır.
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex	Numune ve çözeltilerin ekstraksiyonunu gerçekleştirme işleminde kullanılmıştır.
Vortex	WiseMix VM-10	Numunelerin ön hazırlık aşamasında karıştırılmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
Manyetik karıştırıcı	Heidolph Unimax 2010	Deneylerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması işlemlerinde kullanılmıştır.
pH metre	Mettler Toledo SevenEasy	Mobil faz ve antosiyanin analizinde kullanılan çözeltilerin pH'sını ayarlamak amacıyla kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Optimum ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi

Optimum ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi deneylerinde *D. sericea* bitki türü kullanılmıştır. Ekstraksiyon parametrelerini optimize etmek amacıyla gerçekleştirilen deneylerde başlangıç parametre değerleri olarak % 100 çözücü oranı, 4 saatlik ekstraksiyon süresi ve 25 °C'lik ekstraksiyon sıcaklığı seçilmiştir. Ekstraksiyon üzerinde etkisi belirlenmek istenilen parametre değeri değiştirilirken, deney süresince

diğer parametre değerleri sabit tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemi için optimum parametreler toplam fenolik madde miktarına göre belirlenmiştir. Bu amaçla, metanol ile farklı derişimlerde hazırlanan gallik asit standart çözeltilerinin UV-Visible (Ultraviyole-Visible) spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen derişim değerleri grafiğı çizilerek gallik asit kalibrasyon grafiğı elde edilmiştir. Çizilen gallik asit kalibrasyon grafiğinden faydalanılarak ekstraktların toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.1. Optimum ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi

Optimum ekstraksiyon çözücüsünü belirleyebilmek amacıyla üç farklı çözücü (aseton, etanol ve metanol) kullanılmıştır. Optimum ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi deneylerinde çözücü oranı % 100, ekstraksiyon süresi 4 saat ve ekstraksiyon sıcaklığı da 25 °C olacak şekilde sabit tutulmuştur.

Çiçeklenme döneminde toplanmış olan *D. sericea* bitki türünün kuru herba örnekleri sırasıyla aseton, etanol ve metanol olmak üzere üç farklı çözücü ile ayrı ayrı ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm dalga boyunda UV-Visible spektrofotometrede absorbans değerleri kaydedilmiştir. Toplam fenolik madde miktarları, kaydedilen absorbans değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon grafiğı yardımıyla gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.2. Optimum ekstraksiyon çözücü oranının belirlenmesi

Optimum ekstraksiyon çözücü oranını belirleyebilmek amacıyla bir önceki aşamada belirlenmiş olan çözücü kullanılmıştır. Bu çözücü ve distile su yardımıyla hacimce % 10, % 20, % 30, %40, % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90 oranlarında çözücüler hazırlanmıştır.

Çiçeklenme döneminde toplanmış olan *D. sericea* bitki türünün kuru herba örnekleri 4 saatlik ekstraksiyon süresi ve 25 °C'lik ekstraksiyon sıcaklığı parametreleri sabit tutularak 9 farklı oranda hazırlanmış çözücüler ile ekstrakte edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm dalga boyunda UV-Visible spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. Toplam fenolik madde miktarları, ölçülen absorbans değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon grafiğı yardımıyla gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.3. Optimum ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanmış olan *D. sericea* bitki türünün kuru herba örnekleri bir önceki aşamalarda belirlenmiş olan çözücü türü ve çözücü oranı değeri kullanılarak sırasıyla 25 °C, 45 °C ve 65 °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta ayrı ayrı 4 saat ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.

Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Toplam

fenolik madde miktarları, belirlenen absorbans değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon grafiği yardımıyla gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.4. Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanmış olan *D. sericea* bitki türünün kuru herba örneklerinde önceki aşamalarda belirlenen çözücü, çözücü oranı ve ekstraksiyon sıcaklığı parametreleri kullanılarak *D. sericea* bitki türü örneklerine sırasıyla 4 saat, 8 saat, 16 saat ve 24 saat olmak üzere dört farklı ekstraksiyon süresinde ayrı ayrı ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.

Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Toplam fenolik madde miktarları, ölçülen absorbans değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon grafiği yardımıyla gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.2.2. Biyokimyasal karakterizasyon

Bitkilerin biyokimyasal karakterizasyonunu belirleyebilmek amacıyla toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı, iki farklı yöntem (DPPH ve FRAP) ile antioksidan aktivite miktarı, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı, toplam antosiyanin miktarı, C vitamini miktarı, fenolik ve flavonoid bileşen miktarı, organik asit bileşen miktarı ve şeker bileşen miktarı, toplam sabit yağ verimi ve yağ bileşenleri analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizlerin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle yukarıda belirlenen koşullarda bitkilerin ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Toplam fenolik madde miktarını belirleyebilmek amacıyla gallik asit standardı metanol içerisinde çözülerek farklı derişimlerde gallik asit standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan gallik asit standart çözeltilerinin UV-Visible spektrofotometrede absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen derişimler grafiğe geçirilmiş ve gallik asit kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

Her iki bitki türünde de üç farklı dönemde bitkilerin farklı kısımlarında bulunan toplam fenolik madde miktarlarını belirlemek amacıyla kuru bitki örnekleri bir önceki aşamada belirlenen optimum ekstraksiyon parametreleri ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen 100 µL ekstrakt üzerine sırasıyla 900 µL distile su, 5 mL 0,2 M Folin-Ciocalteu reaktifi ve 4 mL 1 M Na₂CO₃ çözeltisi eklenip vorteks cihazı yardımıyla karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 1,5 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu süre sonunda karışımın UV-Visible spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Bitki örneklerindeki toplam fenolik madde miktarları, ölçülen absorbans değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon grafiği yardımıyla gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir (Spanos ve Wrolstad 1990).

3.2.2.2. Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi

Toplam flavonoid madde miktarını belirlemek amacıyla metanol içerisinde çözülerek farklı derişimlerde kateşin standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan kateşin standart çözeltilerinin UV-Visible spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen derişim değerleri grafiğe geçirilmiş ve kateşin kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

Her iki bitki türü için üç farklı dönemde toplanan bitkilerin farklı kısımlarındaki toplam flavonoid madde miktarlarını belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri optimum ekstraksiyon koşullarında ekstraksiyon metodu yardımıyla ekstrakte edilmiştir. Elde edilen 1 mL ekstrakt üzerine 5'er dk'lık aralıklarla sırasıyla; 4 mL distile su, 0,3 mL % 5 (W/V)'lık NaNO₂ çözeltisi, 0,6 mL % 10 (W/V)'luk AlCl₃.6H₂O çözeltisi ve 2 mL 1 M'lık NaOH çözeltisi eklenip vorteks cihazı yardımıyla karıştırılmış ve toplam hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

Elde edilen karışımların UV-Visible spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedilmiştir. Bitki örneklerindeki toplam flavonoid madde miktarları, kaydedilen absorbans değerleri kullanılarak kateşin kalibrasyon grafiği yardımıyla kateşin eşdeğeri cinsinden mg CE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir (Karadeniz vd. 2005).

3.2.2.3. Toplam antioksidan aktivite miktarının DPPH metodu ile belirlenmesi

Her iki bitki türü için üç farklı dönemde toplanan bitkilerin farklı kısımlarındaki toplam antioksidan aktivite miktarlarını DPPH metodu ile belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri optimum ekstraksiyon koşullarında ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. 600 µL 1 mM DPPH radikal çözeltisi üzerine ayrı ayrı 5 farklı hacimde örnek ekstraktı ilave edilmiştir ve MeOH ile toplam hacim 6 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen bu karışım vorteks cihazı yardımıyla 30 saniye süresince karıştırılmış ve oda koşullarında 30 dk karanlık ortamda beklemeye bırakılmıştır.

Bu süre sonunda UV-Visible spektrofotometre cihazında 517 nm dalga boyunda DPPH çözeltisinin ve farklı hacimlerdeki ekstraktların absorbans değerleri belirlenmiştir. Ölçülen absorbans değerlerinin Eşitlik 3.1'de kullanılmasıyla her bir örnek hacmine karşılık gelen yüzde inhibisyon (örneklerin DPPH radikalini süpürücü etkileri) değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[\frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Ekstrakt}})}{A_{\text{DPPH}}} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

Buradaki A_{DPPH}, 0,1 mL metanol içeren 4 mL DPPH çözeltisinin absorbans değerini ve A_{Ekstrakt}, ekstraktların 30 dk sonundaki absorbans değerini ifade etmektedir.

DPPH radikalinin % 50'sini inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanan Ec 50 değeri ise farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlara karşı çizilen DPPH radikalinin % inhibisyon oranından elde edilen doğru denklemi ile mg/mg DPPH kuru madde olarak hesaplanmıştır (Lafka vd. 2007).

3.2.2.4. Toplam antioksidan aktivite miktarının FRAP metodu ile belirlenmesi

Toplam antioksidan aktivite miktarını belirlemek amacıyla farklı derişimlerde trokloks (6-hidroksil-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit) standart çözeltileri metanol içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan trokloks standart çözeltilerinin 593 nm dalga boyunda UV-Visible spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen derişim değerleri grafiğe geçirilmiş ve trokloks kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

Her iki bitki türü için üç farklı dönemde toplanan bitkilerinin farklı kısımlarındaki toplam antioksidan aktivite miktarlarını FRAP metodu ile belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri optimum ekstraksiyon koşullarında ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Sırasıyla 500mL 300 mM asetik asit-asetat tampon çözeltisi, 50 mL 10 mM 2,4,6 tri(2-pridil)-s-triazin (TPTZ) çözeltisi ve 50 mL 2 mM ferrik klorür çözeltisi karıştırılarak FRAP çözeltisi elde edilmiştir. 150 µL ekstrakt üzerine 2850 µL FRAP çözeltisi eklenerek vorteks cihazı yardımıyla karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışım oda koşullarında 30 dk karanlık ortamda beklemeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda karışımların UV-Vis spektrofotometrede 593 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bitki örneklerinin FRAP metodu ile toplam antioksidan aktivite miktarları, ölçülen absorbans değerlerinin kullanılmasıyla trokloks kalibrasyon grafiği yardımıyla trokloks eşdeğeri cinsinden mg TE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir (Thaipong vd. 2006).

3.2.2.5. Toplam klorofil ve toplam karotenoid madde miktarının belirlenmesi

Her iki bitki türü için üç farklı dönemde toplanan bitkilerin farklı kısımlarındaki toplam klorofil ve karotenoid madde miktarlarını belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri distile su yardımıyla hacimce % 80 oranında hazırlanmış aseton çözeltisi ile karanlık ortamda ve 4 °C’de ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometrede sırasıyla 480 nm, 630 nm ve 645 nm olmak üzere üç farklı dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Bu absorbans değerlerinin Eşitlik 3.2’de kullanılmasıyla örneklerin toplam klorofil madde miktarları ve Eşitlik 3.3’te kullanılmasıyla toplam karotenoid madde miktarları hesaplanmıştır. Toplam klorofil ve karotenoid madde değerleri mg/g cinsinden ifade edilmiştir (Arnon, 1949; Kırk ve Allen, 1965).

$$\text{Toplam Klorofil} = \frac{[(0,0202 \times A_{645}) + (0,00802 \times A_{663} \times 10)]}{\text{Örnek ağırlığı}} \quad (3.2)$$

$$\text{Toplam Karotenoid} = A_{480} + (0,114 \times A_{663} - 0,638 \times A_{645}) \quad (3.3)$$

Bu eşitliklerdeki A_{480} , ekstraktın 480 nm dalga boyundaki absorbans değerini; A_{645} , ekstraktın 645 nm dalga boyundaki absorbans değerini ve A_{663} , ekstraktın 663 nm dalga boyundaki absorbans değerini belirtmektedir.

3.2.2.6. Toplam antosiyanin miktarının belirlenmesi

Her iki bitki türü için üç farklı dönemde toplanan bitkilerin farklı kısımlarındaki toplam antosiyanin miktarlarını belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri optimum ekstraksiyon koşullarında ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Elde

edilen 1 mL ekstrakt üzerine 24 mL 0,025 M KCl çözeltisi eklenmiş ve HCl yardımıyla karışımın pH'ı 1,0'e ayarlanmıştır. Aynı şekilde 1 mL ekstrakt üzerine 24 mL 0,4 M sodyum asetat çözeltisi eklenmiş ve NaOH çözeltisi kullanılarak karışımın pH'ı 4,5'e ayarlanmıştır.

Hazırlanan her iki karışımın da UV-Visible spektrofotometrede sırasıyla 520 nm ve 700 nm dalga boylarında absorbans değerleri kaydedilmiştir. Kaydedilen absorbans değerleri, Eşitlik 3.4 ve Eşitlik 3.5 yardımıyla bitki örneklerinin toplam antosiyanin miktarları hesaplanmıştır (AOAC, 2005).

$$A = (A_{520} - A_{720})_{pH1} - (A_{520} - A_{720})_{pH4,5} \quad (3.4)$$

$$\text{Toplam antosiyanin} = \frac{(A \times MA \times SF \times 1000)}{\epsilon \times l} \quad (3.5)$$

Bu eşitliklerde A_{520} , pH'ı 1'e ve pH'ı 4,5'e ayarlanmış ekstraktların 520 nm dalga boyundaki absorbans değerlerini; A_{700} , pH'ı 1'e ve pH'ı 4,5'e ayarlanmış ekstraktların 700 nm dalga boyundaki absorbans değerlerini; MA, siyanidin-3-glikozitin mol kütleini (449,2 g/mol); SF, seyreltme faktörünü ve ϵ , siyanidin-3-glikozit için molar absorptivite değerini (26.900 l/(M.cm)) ifade etmektedir.

3.2.2.7. C vitamini miktarının belirlenmesi

C vitamini miktar analizi HPLC cihazında yapılmıştır. C vitamini standardı % 3 (W/V)'lük metafosforik asit çözeltisi içinde çözülerek 5 farklı derişimde kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti HPLC cihazına enjekte edilmiş ve pik alanları elde edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişim değerleri grafiğe çizilerek C vitamini kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Her iki bitki türünde de üç farklı gelişme döneminde bitkinin farklı kısımlarındaki C vitamini miktarlarını belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri % 3 (W/V)'lük metafosforik asit çözeltisi ile 4 °C'de karanlık ortamda ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen pik alanları kalibrasyon grafiği kullanılarak C vitamini miktarları hesaplanmıştır.

C vitamini analizlerinde Thermo Scientific marka C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak 0,90 mL/dk akış hızında izokratik akış programında 25 mM derişiminde pH değeri formik asit yardımıyla 3'e ayarlanmış KH_2PO_4 çözeltisi kullanılmıştır. Bu analizlerde kolon sıcaklığı 25 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir (Watada 1982).

3.2.2.8. Fenolik ve flavonoid bileşenlerin belirlenmesi

Fenolik ve flavonoid bileşen analizi HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. Fenolik ve flavonoid bileşen standartları olarak kafeik asit, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, rosmarinik asit, kamferol, kateşin, vanilik asit, şiringik asit, sinapik asit, rutin, kersetin, klorojenik asit, epikateşin, ferulik asit ve ellajik asit kullanılmıştır. Fenolik ve flavonoid bileşen standartları metanol içerisinde ayrı ayrı çözülerek 5 farklı derişimde kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı derişimlerdeki fenolik ve flavonoid bileşen standart çözelti HPLC cihazına enjekte edilerek pik

alanları belirlenmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişim değeri grafiğı çizilerek her bir standart için kalibrasyon grafiğı elde edilmiştir.

Üç farklı dönemde toplanan bitkilerin farklı kısımlarındaki fenolik ve flavonoid bileşen miktarlarını belirlemek amacıyla kuru bitki örnekleri optimum ekstraksiyon koşullarında ekstraksiyon metodu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar 0,45µm'lik filtreden geçirilerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen pik alanları kalibrasyon grafiklerinde kullanılarak fenolik ve flavonoid bileşen miktarları hesaplanmıştır.

Fenolik ve flavonoid bileşen miktar analizlerinde Thermo Scientific marka C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak 1 mL/dk akış hızında gradient elüsyonda metanol ve hacimce % 2'lik asetik asit çözeltisi kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C'de sabit tutulmuş ve 10 µL'lik enjeksiyon hacminin kullanılmasıyla analizler gerçekleştirilmiştir (Anonim 2009).

3.2.2.9. Organik asit bileşen miktarının belirlenmesi

Organik asit bileşenlerinin analizi HPLC cihazı kullanılarak yapılmıştır. Organik asit bileşen standartları olarak malik asit, tartarik asit, sitrik asit ve okzalik asit kullanılmıştır. Organik asit standartları ayrı ayrı distile su içerisinde çözülerek 5 farklı derişimde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler HPLC cihazına enjekte edilmiş ve pik alanları elde edilmiştir. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişim değeri grafiğı çizilerek her bir standart için ayrı ayrı kalibrasyon doğruları elde edilmiştir.

Her iki bitki türünde de üç farklı dönemde bitkinin farklı kısımlarındaki organik asit bileşen miktarlarını belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri distile su yardımıyla oda sıcaklığında 24 saat süre ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen pik alanları kalibrasyon doğrularında kullanılarak organik asit bileşenleri miktarları hesaplanmıştır.

Organik asit bileşen miktar analizlerinde C18 Thermo Scientific marka (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak; 0,60 mL/dk akış hızında izokratik akış programında 50 mM derişiminde pH değeri formik asit yardımıyla 2,8'e ayarlanmış sulu KH₂PO₄ çözeltisi kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir (Nour vd. 2010).

3.2.2.10. Şeker bileşenleri miktarının belirlenmesi

Şeker bileşenleri analizi HPLC cihazında yapılmıştır. Şeker bileşenleri standardı olarak fruktoz, glukoz ve sakkaroz kullanılmıştır. Bunun için şeker bileşen standartları ayrı ayrı distile su içerisinde çözülerek 5 farklı derişimde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler HPLC cihazına enjekte edilerek pikler elde edilmiştir. Elde edilen bu piklerin alanları belirlenmiştir. Belirlenen pik alanlarına karşılık gelen derişim değeri grafiğı çizilmiş ve böylelikle her bir standart için ayrı ayrı kalibrasyon doğruları elde edilmiştir.

Üç farklı dönemde toplanan her iki bitki türünün farklı kısımlarındaki şeker bileşen miktarlarını belirleyebilmek amacıyla kuru bitki örnekleri distile su ile 24 saat süresince oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir örnek için elde edilen pik alanları ve kalibrasyon grafikleri kullanılarak şeker bileşen miktarları hesaplanmıştır.

Şeker bileşen analizlerinde Agilent Technologies marka Hi-Plec Ca (30 cm x 7,7 mm, 8 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak 0,50 mL/dk akış hızında izokratik akış programında saf su kullanılmıştır. Ayrıca; kolon sıcaklığı 80 °C ve enjeksiyon hacmi 10 µL'dir (Turhan 2014).

3.2.2.11. Toplam sabit yağ veriminin belirlenmesi

Sokslet ekstraksiyonu işleminde kullanılan cam beherler kurutma fırınında sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve beherlerin tara ölçümü alınmıştır. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra, öğütülmüş örneklerden yaklaşık olarak 5 g tartılarak sokslet kartuşunun içerisine konulmuştur. Sokslet ekstraksiyon düzeneğine kartuş yerleştirildikten sonra, sokslet ekstraksiyon balonuna 140 mL petrol eteri eklenerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra, ekstraksiyon balonu 80 °C'de 1 saat kurutma fırınında bekletilmiştir. Kurutma fırınından çıkarılan cam beher, desikatörde soğutulduktan sonra tartılarak örneklerdeki yağ miktarları belirlenmiştir (TS 4967).

3.2.2.12. Yağ bileşenlerinin belirlenmesi

Yaklaşık olarak 0,1 g yağ üzerine 0,2 mL 2 M'lık metanol ile hazırlanmış KOH çözeltisi eklenip vorteks cihazı yardımıyla karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine 2 mL hekzan eklenip vorteks cihazında karıştırılmıştır. Elde edilen bu karışım 5 dk boyunca bekletilmiş ve bu süre sonunda karışımın üst fazından 1 mL alınarak analiz edilmek üzere vialle aktarılmıştır. Her bir örnek için gaz kromatografisi (Agilent 7890A) cihazına 1 µL enjeksiyon hacminde 40:1 split oranı ile enjeksiyon yapılmıştır. Yağ bileşenlerinin ayrılması amacıyla kapiler kolon (HP Innowax Capillary; 60,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm) kullanılmıştır. Kolon, bitiş kısmında bir ayraç (splitter) yardımı ile alev iyonizasyon dedektörüne (FID) ve kütle spektrometresi dedektörüne (Agilent 5975C) akış oranı 1:1 olacak şekilde iki kısma ayrılmıştır. Analiz sırasında taşıyıcı gaz olarak 0,8 mL/dk akış hızına sahip olacak şekilde helyum kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 250 °C'ye sabitlenmiş, kolondaki sıcaklık programı 10 °C/dk'lık sıcaklık artış hızıyla 5 dk'da 150 °C'den 200 °C'ye çıkma ve bu sıcaklıkta 5 dk bekleme, 5 °C/dk'lık sıcaklık artış hızıyla 10 dk'da 200 °C'den 250 °C'ye çıkma ve bu sıcaklıkta 10 dk bekleme şeklinde toplam 30 dk'lık bir program olacak şekilde oluşturulmuştur.

Kütle dedeksiyonu için tarama aralığı (m/z) 35-450 atomik kütle ünitesi ve elektron bombardımanı iyonizasyon enerjisi 70 eV olacak şekilde ayarlanmıştır. Yağ bileşenlerini belirleyebilmek amacıyla WILEY kütüphanesi kullanılmıştır. Yağ bileşenlerinin miktarlarını tespit etmek için FID dedektörünün kaydettiği değerler kullanılmıştır (Garces ve Mancha 1993).

3.2.3. Rosmarinik asit analizi için metot optimizasyonu

Uygun miktardaki rosmarinik asit standardı 0,0001 g hassasiyetle hassas terazide tartılarak 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve metanol içerisinde çözüldükten sonra çözeltinin toplam hacmi metanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 1000 mg/L'lik rosmarinik asit ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, 1000 mg/L'lik rosmarinik asit ana stok çözeltisinden 200 mg/L'lik ara stok çözeltisinin hazırlanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Metot optimizasyonu yapılırken belirlenmek istenen parametre değiştirilirken, diğer parametreler sabit tutulmuştur.

3.2.3.1. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi

Rosmarinik asit analizi için metot optimizasyonu deneylerinin başlangıç aşamasında kullanılan deneysel parametre değerleri 1 mL/dk'lık akış hızı, 30 °C'lik kolon sıcaklığı ve 10 µL'lik enjeksiyon hacmi şeklindedir. Optimum mobil faz bileşimini belirlemek amacıyla metanol, asetonitril ve suyun hacimce farklı oranlardaki bileşimleri kullanılmıştır. Bu karışımların pH'larını ayarlamak amacıyla formik asit ve asetik asitten faydalanılmıştır. Kullanılan mobil faz bileşimleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan mobil faz bileşimleri

Deney No	Kullanılan Mobil Faz Bileşimi	Deney No	Kullanılan Mobil Faz Bileşimi
1	ACN/Su (10/90)	42	MeOH/Su (70/30)
2	ACN/Su (20/80)	43	MeOH/Su (80/20)
3	ACN/Su (30/70)	44	MeOH/Su (90/10)
4	ACN/Su (40/60)	45	MeOH/Su/AA (40/60/0,1)
5	ACN/Su (50/50)	46	MeOH/Su/AA (40/60/0,5)
6	ACN/Su (60/40)	47	MeOH/Su/AA (40/60/1)
7	ACN/Su (70/30)	48	MeOH/Su/AA (40/60/2)
8	ACN/Su (80/20)	49	MeOH/Su/AA (50/50/0,5)
9	ACN/Su (90/10)	50	MeOH/Su/AA (50/50/1)
10	ACN/Su/AA (50/50/0,5)	51	MeOH/Su/AA (50/50/2)
11	ACN/Su/AA (50/50/1)	52	MeOH/Su/AA (90/10/0,1)
12	ACN/Su/AA (70/30/0,5)	53	MeOH/Su/AA (90/10/0,5)
13	ACN/Su/AA (70/30/1)	54	MeOH/Su/AA (90/10/1)
14	ACN/Su/AA (75/25/0,1)	55	MeOH/Su/FA (40/60/0,1)
15	ACN/Su/AA (75/25/0,5)	56	MeOH/Su/FA (40/60/0,5)
16	ACN/Su/AA (75/25/1)	57	MeOH/Su/FA (40/60/1)
17	ACN/Su/AA (75/25/2)	58	MeOH/Su/FA (40/60/2)
18	ACN/Su/AA (90/10/0,5)	59	MeOH/Su/FA (50/50/0,5)
19	ACN/Su/AA (90/10/1)	60	MeOH/Su/FA (50/50/1)
20	ACN/Su/AA (95/5/0,5)	61	MeOH/Su/FA (50/50/2)
21	ACN/Su/AA (95/5/1)	62	ACN/MeOH (10/90)
22	ACN/Su/AA (95/5/2)	63	ACN/MeOH (20/80)
23	ACN/Su/FA (50/50/0,5)	64	ACN/MeOH (30/70)
24	ACN/Su/FA (50/50/1)	65	ACN/MeOH (40/60)
25	ACN/Su/FA (70/30/0,5)	66	ACN/MeOH (50/50)
26	ACN/Su/FA (70/30/1)	67	ACN/MeOH (60/40)
27	ACN/Su/FA (75/25/0,1)	68	ACN/MeOH (70/30)
28	ACN/Su/FA (75/25/0,5)	69	ACN/MeOH (80/20)
29	ACN/Su/FA (75/25/1)	70	ACN/MeOH (90/10)
30	ACN/Su/FA (75/25/2)	71	ACN/MeOH/AA (10/90/0,5)

Çizelge 3.2'nin devamı

31	ACN/Su/FA (90/10/0,5)	72	ACN/MeOH/AA (10/90/1)
32	ACN/Su/FA (90/10/1)	73	ACN/MeOH/AA (10/90/2)
33	ACN/Su/FA (95/5/0,5)	74	ACN/MeOH/AA (50/50/0,5)
34	ACN/Su/FA (95/5/1)	75	ACN/MeOH/AA (50/50/1)
35	ACN/Su/FA (95/5/2)	76	ACN/MeOH/AA (50/50/2)
36	MeOH/Su (10/90)	77	ACN/MeOH/FA (10/90/0,5)
37	MeOH/Su (20/80)	78	ACN/MeOH/FA (10/90/1)
38	MeOH/Su (30/70)	79	ACN/MeOH/FA (10/90/2)
39	MeOH/Su (40/60)	80	ACN/MeOH/FA (50/50/0,5)
40	MeOH/Su (50/50)	81	ACN/MeOH/FA (50/50/1)
41	MeOH/Su (60/40)	82	ACN/MeOH/FA (50/50/2)

3.2.3.2. Optimum akış hızının belirlenmesi

Rosmarinik asitin HPLC'de kantitatif tayinini yapabilmek amacıyla optimum akış hızını belirlemek için 22 farklı akış hızı denenmiştir. Tüm akış hızı denemelerinde mobil faz olarak bir önceki aşamada belirlenen optimum mobil faz bileşimi, 30 °C'lik kolon sıcaklığı ve 10 µL'lik enjeksiyon hacmi parametreleri kullanılmıştır. Kullanılan akış hızı değerleri Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan akış hızı değerleri

No	Akış hızı (mL/dk)	No	Akış hızı (mL/dk)	No	Akış hızı (mL/dk)
1	0,10	9	0,50	17	0,90
2	0,15	10	0,55	18	0,95
3	0,20	11	0,60	19	1,00
4	0,25	12	0,65	20	1,25
5	0,30	13	0,70	21	1,50
6	0,35	14	0,75	22	2,00
7	0,40	15	0,80		
8	0,45	16	0,85		

3.2.3.3. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi

Rosmarinik asitin HPLC'de kantitatif tayinini yapabilmek amacıyla optimum kolon sıcaklığını belirlemek için 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C ve 80 °C olmak üzere 14 farklı kolon sıcaklığı denenmiştir. Tüm kolon sıcaklığı denemelerinde 10 µL'lik enjeksiyon hacmi ile optimizasyonun daha önceki aşamalarında belirlenen optimum mobil faz ve akış hızı parametreleri kullanılmıştır.

3.2.3.4. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi

Rosmarinik asitin HPLC’de kantitatif tayinini yapabilmek amacıyla optimum enjeksiyon hacmini belirlemek için 1 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 25 µL ve 30 µL olmak üzere 10 farklı enjeksiyon hacmi denenmiştir. Tüm enjeksiyon hacmi denemelerinde optimizasyonun daha önceki aşamalarında belirlenen optimum mobil faz, akış hızı ve kolon sıcaklığı parametreleri kullanılmıştır.

3.2.4. Rosmarinik asit analizi için metot validasyonu

Rosmarinik asit analizi için optimize edilen metodun validasyonu için öncelikle rosmarinik asit standardı metanol içerisinde çözülerek 1000 mg/L’lik ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ana stok çözeltisi kullanılarak ana stok çözeltiden 200 mg/L’lik ara stok çözeltisinin hazırlanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, bu ara stok çözelti kullanılarak 1 mg/L, 3 mg/L, 6 mg/L, 12 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L ve 200 mg/L’lik derişimlerde çözeltiler hazırlanmıştır. Metot validasyonunun gerçekleştirilebilmesi için doğrusallık, doğruluk, kesinlik, LOD, LOQ ve seçicilik parametreleri belirlenmiştir.

3.2.4.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi

Rosmarinik asit analiz metodunun doğrusallık parametresini belirlemek için 1 mg/L, 3 mg/L, 6 mg/L, 12 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L ve 200 mg/L olmak üzere 8 farklı derişim kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Bu parametrede yapılan çalışmalar 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi

Rosmarinik asit analiz metodunun doğruluk parametresini belirleyebilmek amacıyla hazırlanan 8 farklı derişimdeki rosmarinik asit standart çözeltileri HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her derişim için yapılan 3 tekrarlı enjeksiyon sonunda ortalama pik alanı, ortalama derişim ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi

Rosmarinik asit analiz metodunun gün içi kesinlik parametresini belirlemek amacıyla düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı derişimde standart çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan üç farklı derişimdeki rosmarinik asit standart çözeltileri gün içinde farklı saatlerde 3 tekrarlı olacak şekilde HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir derişim için ortalama pik alanı ve alıkonma zamanı değerleri belirlenmiştir.

Günler arası kesinlik parametresini belirleyebilmek için düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı derişimde standart çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan üç farklı derişimdeki rosmarinik asit standart çözeltileri 3 tekrarlı olacak şekilde farklı günlerde aynı saatte HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir derişim için ortalama pik alanı ve alıkonma zamanı belirlenmiştir (Açar vd. 2013).

3.2.4.4. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyon doğrusu denkleminde yararlanılmıştır. Hesaplama için öncelikle Eşitlik 3.6 kullanılarak standart sapma değeri hesaplanmıştır.

$$\text{Standart Sapma (SD)} = \sqrt{\frac{\sum(y_{den} - y_{teo})^2}{(n-2)}} \quad (3.6)$$

Eşitlikteki y_{den} , deneysel olarak elde edilen pik alanını; y_{teo} , kalibrasyon doğrusu denkleminde hesaplanan pik alanını ve n , çalışılan standart sayısını ifade etmektedir.

Elde edilen standart sapma değeri Eşitlik 3.7’de ve Eşitlik 3.8’de kullanılarak sırasıyla LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Açar vd. 2013).

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{SD}}{m} \quad (3.7)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \text{SD}}{m} \quad (3.8)$$

Burada SD, standart sapma değerini ve m , kalibrasyon doğrusunun eğimini ifade etmektedir.

3.2.4.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi

Seçicilik parametresi, verilen koşullarda iki bileşiğin ayrılması olarak tanımlanmaktadır. Seçicilik faktörü iki bileşiğin bağıl alıkonmalarının oranıdır. Eşitlik 3.9 kullanılarak seçicilik faktörü (α) değerleri hesaplanmıştır (Anonim, 1994).

$$\alpha = \frac{t_A - t_0}{t_B - t_0} \quad (3.9)$$

Eşitlikte t_A , validasyonu yapılan standardın alıkonma süresini; t_B , farklı bir standardın alıkonması süresini ve t_0 , ölü zamanı (tutunmayan bileşiğin alıkonma zamanını) ifade etmektedir.

3.2.5. Optimize edilmiş metot ile *Daphne sericea* bitki türünde rosmarinik asit miktarının belirlenmesi

Ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyon çalışmaları sonucu elde edilen ekstraksiyon metodu ile çiçeklenme döneminde toplanmış *D. Sericea* bitki türünün herba kısmı ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstrakt filtreden geçirilmiş, uygun oranlarda seyreltilmiş ve Shimadzu marka HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

Analizlerde kolon olarak C18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak ACN:MeOH:FA (10:90:0,1) mobil fazı kullanılmıştır. Mobil faz akışı, 0,40 mL/dk akış hızında gradiyent akış ile gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı olarak 30 °C ve enjeksiyon hacmi olarak 10 µL kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon Optimizasyonu

4.1.1. Optimum ekstraksiyon çözücüsünün belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünün kuru herba örneği 4 saatlik ekstraksiyon süresi, 25 °C'lik ekstraksiyon sıcaklığı ve hacimce % 100 çözücü oranı parametreleri sabit tutularak aseton, etanol ve metanol olmak üzere 3 ayrı çözücü ile ayrı ayrı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.

Ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbens değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absorbens değerlerinden ve gallik asit ile hazırlanmış kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünün toplam fenolik madde miktarı değerleri gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünde farklı çözücülerin kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları

Çözücü		Absorbans	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g kuru ağırlık)
Aseton	1	0,196	3,664
	2	0,193	3,605
	3	0,189	3,527
	4	0,194	3,616
Standart sapma		0,003	0,057
% RSD		1,476	1,581
Etanol	1	0,513	10,008
	2	0,517	10,093
	3	0,513	10,009
	4	0,520	10,150
Standart sapma		0,003	0,069
% RSD		0,672	0,688
Metanol	1	0,901	17,757
	2	0,901	17,773
	3	0,906	17,856
	4	0,899	17,716
Standart sapma		0,003	0,059
% RSD		0,326	0,331

Farklı çözücüler ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları (Çizelge 4.1) incelendiğinde; en yüksek toplam fenolik madde miktarının metanol çözücüsünün kullanıldığı ekstraksiyonda elde edildiği görülmektedir. Bu nedenle, optimum çözücü olarak metanol seçilmiştir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, çözücü seçiminin ekstraksiyon optimizasyonunun en önemli aşamalarından biri olduğu görülmektedir. Hacimce farklı oranlarda metanol:su karışımı çok sayıda çalışmada ekstraksiyon çözücüsü olarak tercih edilmiştir (Alberti vd. 2014; Eghdami ve Sadeghi 2010; Goli vd. 2005; Li vd. 2005; Roby vd. 2013). Hong and Kim (2005), Juntachote vd. (2006) ve Yağcıoğlu (2015) yaptıkları çalışmalarda ekstraksiyon çözücüsü olarak hacimce farklı oranlarda etanol:su karışımını tercih etmişlerdir. Arkan (2011), dört farklı çözücü ile yaptığı çalışmada toplam fenolik madde miktarını sırasıyla en fazla etanol, etil asetat, metanol ve hekzan çözücüsünde belirlemiştir. Ayrıca, bu çalışmada ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücülerin polaritelerine göre ekstraksiyon veriminin değiştiği bildirilmiştir. Lee vd. (2011), *D. kiusiana* bitki türü ile yaptıkları çalışmada bitkinin kök, yaprak ve gövde kısımlarının ekstraksiyon verimini belirlemek için 5 farklı çözücü (kloroform, metanol, etanol, etil asetat ve su) ile çalışmışlardır. Ekstraksiyon verimini toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarına göre değerlendirerek optimum ekstraksiyon çözücüsünü metanol olarak tespit etmişlerdir. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda, optimum ekstraksiyon koşullarının çalışılan numuneye göre değiştiği bulunmuştur.

4.1.2. Optimum ekstraksiyon çözücü oranının belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünün kuru herba örneği 4 saatlik ekstraksiyon süresi ve 25 °C'lik ekstraksiyon sıcaklığı parametreleri sabit tutularak saf su ile hacimce 9 farklı (% 10, % 20, % 30, % 40, % 50, % 60, % 70, % 80 ve % 90'lık) oranda hazırlanmış metanol çözücüsü ile ayrı ayrı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.

Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Belirlenen absorbans değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon grafiği yardımıyla örneklerdeki toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünde farklı çözücü oranlarının kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları

Çözücü Oranı (%)		Absorbans	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g kuru ağırlık)
10	1	0,311	11,912
	2	0,307	11,778
	3	0,310	11,890
	4	0,310	11,911
Standart sapma		0,002	0,064
% RSD		0,516	0,538
20	1	0,325	12,500
	2	0,331	12,719
	3	0,330	12,674
	4	0,332	12,764
Standart sapma		0,003	0,115
% RSD		0,876	0,911

Çizelge 4.2'nin devamı

30	1	0,410	15,876
	2	0,412	15,960
	3	0,401	15,544
	4	0,400	15,476
Standart sapma		0,006	0,240
% RSD		1,477	1,525
40	1	0,631	24,716
	2	0,636	24,932
	3	0,629	24,666
	4	0,639	25,043
Standart sapma		0,004	0,178
% RSD		0,704	0,718
50	1	0,750	29,474
	2	0,760	29,910
	3	0,760	29,882
	4	0,751	29,550
Standart sapma		0,006	0,224
% RSD		0,741	0,753
60	1	0,739	29,044
	2	0,751	29,533
	3	0,746	29,336
	4	0,750	29,496
Standart sapma		0,006	0,223
% RSD		0,745	0,758
70	1	0,771	30,344
	2	0,765	30,096
	3	0,760	29,876
	4	0,760	29,872
Standart sapma		0,006	0,224
% RSD		0,733	0,745
80	1	0,751	29,526
	2	0,740	29,072
	3	0,738	29,020
	4	0,735	28,891
Standart sapma		0,007	0,276
% RSD		0,932	0,948
90	1	0,681	26,730
	2	0,691	27,116
	3	0,681	26,742
	4	0,680	26,674
Standart sapma		0,005	0,202
% RSD		0,740	0,754

Çizelge 4.2'deki veriler incelendiğinde; % 70'lik çözücü oranına kadar çözücü oranının artması ile toplam fenolik madde miktarının doğru orantılı olarak arttığı ve % 70'lik çözücü oranından sonra ise azalmaya başladığı görülmektedir. Bu sonuç, Khairi vd. (2009)'nin elde ettiği sonucu desteklemektedir. En yüksek toplam fenolik madde miktarının hacimce % 70'lik metanol çözücüsü ile elde edildiği bulunmuştur. Bu nedenle, optimum çözücü oranı olarak hacimce % 70'lik metanol seçilmiştir.

Elde edilen bu sonuç, literatür sonuçları ile uyumludur. Literatür çalışmaları incelendiğinde, Süntar (2011) ve Alberti vd. (2014) çözücü oranını hacimce % 85 metanol bulurken, Li (2005) ise hacimce % 70 etanol olarak belirlemiştir. Yağcıoğlu (2015), adaçayı bitkisinin etanol çözücüsü ile ekstraksiyonun da çözücü oranının artmasıyla belirli bir noktaya kadar ekstraksiyon veriminin arttığını daha sonra da azalmaya başladığını bildirmiştir. Yapılan çalışmalar çözücü miktarının artmasının kütle transferini arttırarak ekstraksiyon verimini iyileştirdiğini ortaya koymuştur (Galvan vd. 2012). Lee vd. (2011), *D. kiusiana* bitki türü ile yaptıkları çalışmada bitkinin kök, yaprak ve gövde kısımlarının ekstraksiyon verimini belirlemek amacıyla metanol çözücüsünün hacimce 4 farklı (25, 50, 75, 100) oranı ile çalışmışlardır. Toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarı analiz sonuçlarına göre optimum çözücü oranını % 75 (V/V) olarak belirlemişlerdir. Khiari vd. (2009), çözücü derişiminin etki ettiği yoğunluk ve dinamik viskozite gibi fiziksel özelliklerin difüzyon ve ekstraksiyon hızını etkilediğini ve ayrıca, çözücü derişimi artışının polar bileşenlerin çözünürlüğünü azaltması nedeniyle ekstraksiyon verimini düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Toplam fenolik madde miktarının, maksimum ekstrakt elde edileceye kadar kütle transferinin artmasına bağlı olarak zamanla arttığı sonucuna varmışlardır.

4.1.3. Optimum ekstraksiyon sıcaklığının belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünün kuru herba örneği hacimce % 70'lik metanol çözeltisi kullanılarak sırasıyla 25 °C, 45 °C ve 65 °C olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta ayrı ayrı 4 saatlik ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.

Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerinin ve gallik asit kalibrasyon grafiğinin kullanılmasıyla çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türündeki toplam fenolik madde miktarları ekstraksiyon sıcaklığının bir fonksiyonu olarak gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık şeklinde ifade edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünde farklı ekstraksiyon sıcaklıklarının kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları

Sıcaklık (°C)		Absorbans	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g kuru ağırlık)
25	1	0,764	30,049
	2	0,766	30,128
	3	0,752	29,590
	4	0,759	29,866
Standart sapma		0,006	0,239
% RSD		0,785	0,799
45	1	0,820	32,276
	2	0,820	32,311
	3	0,821	32,351
	4	0,831	32,723
Standart sapma		0,005	0,207
% RSD		0,629	0,639
65	1	0,904	35,656
	2	0,916	36,116
	3	0,911	35,928
	4	0,916	36,120
Standart sapma		0,005	0,218
% RSD		0,599	0,607

Çizelge 4.3'teki verilere göre, en yüksek toplam fenolik madde miktarı 65 °C'de gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde elde edilmiştir. Bu nedenle, optimum ekstraksiyon sıcaklığı olarak 65 °C seçilmiştir. Bulgularımızın literatür değerleri aralığında olduğu tespit edilmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde, optimum ekstraksiyon sıcaklıklarını Yağcıoğlu (2015), adaçayı için 53,93 °C; Juntachote vd. (2006), limon otu için 25 °C; havlıcan, hint fesleğeni ve biberiye için 75 °C olarak belirlemişlerdir. Bulduk ve Gökçe (2017) ekstraksiyon sıcaklığını biberiye bitkisi ile yaptıkları çalışmada 73,78 °C, Demir vd. (2019), nar kabuğu ile yaptıkları çalışmada ise 78 °C olarak tespit etmişlerdir. Yağcıoğlu (2015), ekstraksiyon sıcaklığının toplam fenolik madde miktarı ile belirlenen ekstraksiyon veriminde belirleyici bir faktör olduğunu bildirmiştir. Prasad vd. (2011), yaptıkları çalışmada ekstraksiyon sıcaklığındaki artışın suyun di-elektrik sabitini azalttığını ve çözücü özelliğini değiştirip fenolik maddelerin daha iyi ekstrakte edilebilmesini sağladığını belirtmişlerdir. Fakat sıcaklıktaki fazla artışın fenolik maddelerin bozunmasına ya da diğer bileşenlerle reaksiyona girmesine neden olabileceğini ve bu durumun bileşenlerin stabilitesini bozarak toplam fenolik madde miktarında azalmaya neden olacağını da vurgulamışlardır. Literatür araştırmaları; çalışılan numuneye, çözücüye ve çözücü oranına göre ekstraksiyon sıcaklıklarının değiştiğini göstermiştir.

4.1.4. Optimum ekstraksiyon süresinin belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünün kuru herba örneği hacimce % 70'lik metanol çözeltisi kullanılarak 65 °C'lik ekstraksiyon sıcaklığında sırasıyla 4, 8, 16 ve 24 saat olmak üzere 4 farklı ekstraksiyon süresinde ayrı ayrı ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.

Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda absorbens değerleri belirlenmiştir. Belirlenen absorbens değerleri kullanılarak gallik asit kalibrasyon doğrusu yardımıyla toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden mg GAE/g kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir. Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünde farklı ekstraksiyon sürelerinin kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları Çizelge 4.4'te listelenmiştir.

Çizelge 4.4. Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünde farklı ekstraksiyon sürelerinin kullanılması ile belirlenen toplam fenolik madde miktarları

Süre (saat)		Absorbans	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g kuru ağırlık)
4	1	0,919	36,268
	2	0,921	36,327
	3	0,911	35,932
	4	0,912	35,974
Standart sapma		0,005	0,201
% RSD		0,549	0,556
8	1	0,927	36,560
	2	0,931	36,728
	3	0,928	36,623
	4	0,931	36,712
Standart sapma		0,002	0,079
% RSD		0,212	0,215
16	1	0,981	38,728
	2	0,974	38,450
	3	0,972	38,367
	4	0,986	38,920
Standart sapma		0,006	0,255
% RSD		0,651	0,659
24	1	1,008	39,829
	2	0,990	39,098
	3	0,995	39,305
	4	0,999	39,448
Standart sapma		0,008	0,308
% RSD		0,771	0,781

Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türündeki toplam fenolik madde miktarının farklı ekstraksiyon süresiyle değişiminin gösterildiği Çizelge 4.4'teki veriler incelendiğinde; en yüksek toplam fenolik madde miktarının 24 saatlik ekstraksiyon süresi ile elde edildiği bulunmuştur. Bu nedenle, optimum ekstraksiyon süresi olarak 24 saat seçilmiştir.

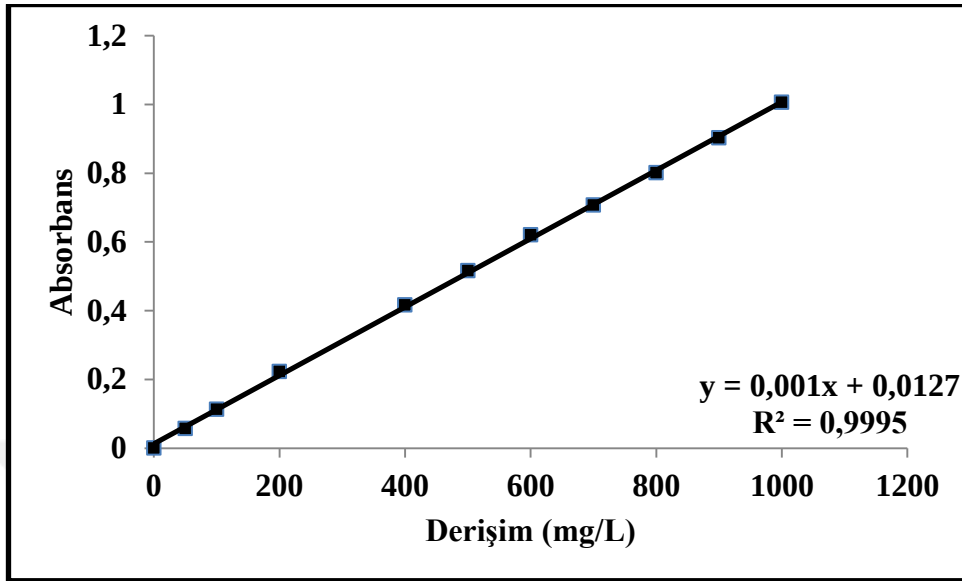
Hong and Kim (2010), *Perilla frutescens* var. *acuta* bitkisinde ekstraksiyon optimizasyonu yaptığı çalışmasında ekstraksiyon süresinin artmasının toplam fenolik ve flavonoid madde miktarında önemli bir artışa neden olduğu sonucuna varmış ve ekstraksiyon süresini 24 saat olarak saptamıştır. Atıcı ve Bulduk (2020), *Fraxinus Excelsior*; Bulduk ve Gökçe (2017), biberiye; Demir vd. (2019), nar kabuğu ve Yağcıoğlu (2015), *Salvia officinalis* L. bitkilerinde ekstraksiyon optimizasyonu gerçekleştirdikleri çalışmalarında ekstraksiyon süresi artıkça ekstraksiyon veriminin belirli bir süreye kadar arttığını ve daha sonra azaldığını belirlemişlerdir.

Gerçekleştirilen ekstraksiyon optimizasyonu deneyleri sonucunda; çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünün optimum ekstraksiyon koşulları ekstraksiyon çözücüsü olarak suda hazırlanmış hacimce % 70'lik metanol çözeltisinin kullanılmasıyla 65 °C'lik ekstraksiyon sıcaklığında ve 24 saat süresince ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesi olarak belirlenmiştir.

4.2. Biyokimyasal Karakterizasyon

4.2.1. Toplam fenolik madde miktarı

Toplam fenolik madde miktarı, önceden ekstraksiyonu yapılmış örneklerin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılarak Şekil 4.1'de gösterilen kalibrasyon grafiği yardımıyla saptanmıştır.



Şekil 4.1. Toplam fenolik madde miktar tayini için hazırlanmış galik asit kalibrasyon grafiği

D. sericea ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımları için elde edilen toplam fenolik madde miktarları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam fenolik madde miktarları

Dönem	Kısım		Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g kuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	35,041	39,270
		2	34,772	39,685
		3	35,148	39,191
	Standart sapma		0,194	0,265
	% RSD		0,554	0,674
	Yaprak	1	32,000	39,445
		2	31,840	39,030
		3	31,370	39,515
	Standart sapma		0,327	0,262
	% RSD		1,032	0,666

Çizelge 4.5'in devamı

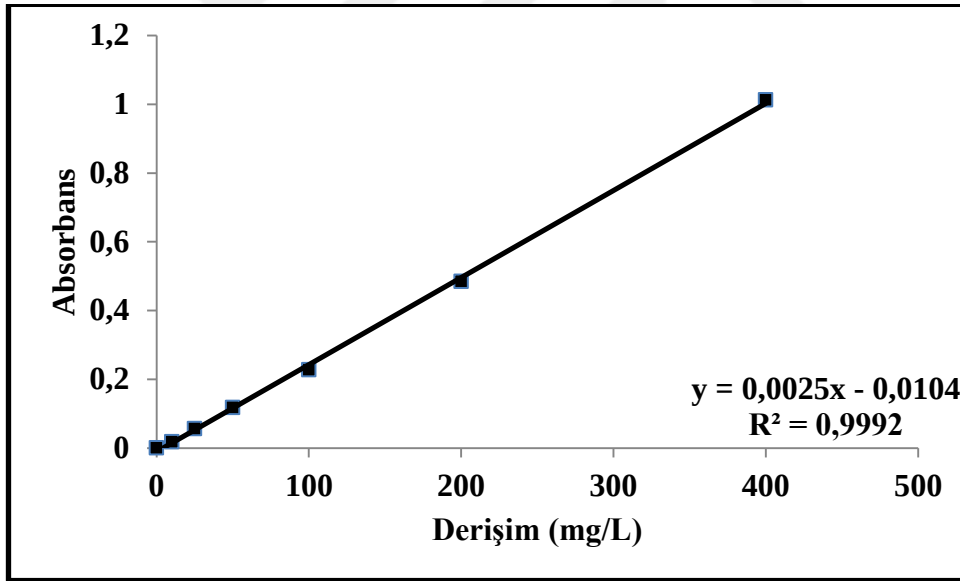
Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	39,205	73,325
		2	38,835	73,440
		3	38,646	73,210
	Standart sapma		0,285	0,115
	% RSD		0,732	0,157
	Herba	1	36,005	52,880
		2	35,970	53,470
		3	36,385	52,840
	Standart sapma		0,230	0,353
	% RSD		0,637	0,665
	Yaprak	1	35,945	41,975
		2	36,000	41,860
		3	35,840	41,895
	Standart sapma		0,081	0,059
	% RSD		0,226	0,141
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	29,450	75,085
		2	28,825	74,850
		3	29,003	74,890
	Standart sapma		0,322	0,126
	% RSD		1,107	0,168
	Yaprak	1	27,155	69,720
		2	26,700	69,340
		3	26,825	69,070
	Standart sapma		0,235	0,327
	% RSD		0,874	0,471

Çizelge 4.5 incelendiğinde; *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türü için toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 26,89-38,90 mg GAE/g ve 39,33-74,94 mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Her iki bitki türü karşılaştırıldığında *D. gnidioides* bitki türünde toplam fenolik madde miktarı, *D. sericea* türüne kıyasla oldukça fazla bulunmuştur. *D. gnidioides* bitki türünde toplam fenolik madde miktarı çiçeklenme döneminde en az iken, çiçeklenme sonuna doğru gittikçe artan bir eğilim gösterdiği tespit edilmiştir. Bitki kısımları incelendiğinde ise toplam fenolik madde miktarı çiçek kısmında oldukça fazla bulunmuştur. *D. sericea* bitki türünde ise toplam fenolik madde miktarının sırasıyla çiçeklenme dönemi, çiçeklenme öncesi dönem ve çiçeklenme sonrası dönemde azaldığı görülmüştür. En fazla toplam fenolik madde miktarı ise çiçek kısmında belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, toplam fenolik madde miktarının bitki türüne, çeşidine, gelişim dönemine, bitki kısımlarına, yetiştiği bölgeye vb. faktörlere göre değiştiği belirtilmiştir (Tosun 2006; Küpeli vd. 2007; Grubesić vd. 2012; Zengin vd. 2012; Sanda vd. 2015; Balkan vd. 2016; Tongur vd. 2018), Çalışmadan elde edilen veriler, literatür çalışmalarını desteklemektedir.

Arkan (2011), *D. oleoides* ve *D. sericea* bitki türlerinin dört farklı çözücü (etanol, etil asetat, metanol ve hekzan) ile toplam fenolik madde miktarlarını belirlemiştir. *D. oleoides* ve *D. sericea* metanol ekstraktında toplam fenolik madde miktarını sırasıyla 186,212 mg GAE/g kuru bitki ve 185,121 mg GAE/g kuru bitki olarak bulmuştur. Lee vd. (2011), *D. kiusiana* bitki türünün farklı kısımlarındaki toplam fenolik madde miktarını beş farklı çözücü kullanarak incelemiştir. Metanol ekstraktında toplam fenolik madde miktarını mg GAE/g cinsinden yaprak, gövde ve kök için sırasıyla 39,01, 13,76 ve 25,27 aralığında belirlemiştir. Manojlovic vd. (2014), *D. blagayana* bitki türünün toplam fenolik madde miktarını iki farklı çözücü (metanol ve kloroform) ile tespit etmişlerdir. Metanol ekstraktında mg GAE/g cinsinden yaprak kısmında 77,45 ve gövde kısmında 75,88 olarak bildirmişlerdir. Tongur vd. (2018), *D. gnidioides* ve *D. sericea* bitki türlerinin iki farklı çözücü (aseton ve metanol) ile toplam fenolik madde miktarını sırasıyla 954,7-1219,3 mg GAE/g bitki ve 602,4-667,6 mg GAE/g bitki aralığında belirlemiştir.

4.2.2. Toplam flavonoid madde miktarı

Toplam flavonoid madde miktarı analizini gerçekleştirebilmek için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Kullanılan kalibrasyon doğrusu Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Toplam flavonoid madde tayini için hazırlanmış kateşin kalibrasyon grafiği

Farklı gelişim dönemlerinde toplanan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki belirlenen toplam madde miktarları Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farkı kısımlarındaki toplam flavonoid madde miktarları

Dönem	Kısım		Toplam flavonoid madde miktarı (mg CE/gkuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	28,620	15,000
		2	28,488	15,020
		3	28,400	15,032
	Standart sapma		0,111	0,016
	% RSD		0,388	0,108
	Yaprak	1	28,820	11,216
		2	28,344	10,970
		3	28,601	11,107
	Standart sapma		0,238	0,123
	% RSD		0,833	1,111
0Çiçeklenme Dönemi	Çiçek	1	29,632	31,220
		2	29,288	30,920
		3	29,284	30,864
	Standart sapma		0,200	0,191
	% RSD		0,679	0,617
	Herba	1	30,440	24,480
		2	30,820	24,220
		3	30,464	24,096
	Standart sapma		0,213	0,196
	% RSD		0,696	0,808
	Yaprak	1	22,072	12,195
		2	22,452	12,056
		3	22,116	12,382
	Standart sapma		0,208	0,164
	% RSD		0,936	1,340
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	22,236	12,046
		2	22,428	12,244
		3	22,168	12,010
	Standart sapma		0,135	0,126
	% RSD		0,605	1,041
	Yaprak	1	25,272	12,562
		2	25,244	12,622
		3	25,192	12,616
	Standart sapma		0,041	0,033
	% RSD		0,161	0,262

Toplam flavonoid madde miktarı analiz sonuçlarının verildiği Çizelge 4.6 incelendiğinde; *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türleri için toplam flavonoid madde miktarı sırasıyla 22,21-30,57 mg CE/g kuru ağırlık ve 11,10-31,00 mg CE/g kuru ağırlık aralığında tespit edilmiştir. Bu iki bitki türü karşılaştırıldığında *D. sericea* bitki türünde

toplam flavonoid madde miktarı daha fazla bulunmuştur. *D. sericea* bitki türünde toplam flavonoid madde miktarının çiçeklenme öncesi dönemden çiçeklenme sonuna doğru bir azalma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. *D. gnidioides* bitki türünde ise toplam flavonoid madde miktarı çiçeklenme öncesi dönemden çiçeklenme dönemine kadar artarken, çiçeklenme sonuna doğru azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Her iki bitki türünde de en yüksek flavonoid toplam madde miktarı, çiçeklenme döneminde çiçek ve herba kısmında saptanmıştır. Ayrıca; toplam flavonoid madde miktarının bitki türüne, bitki gelişme dönemine ve bitkinin kısımlarına göre değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.6).

Toplam flavonoid madde miktarı analizleri sonucu elde edilen bulgular, literatür çalışmaları ile uyumludur. Arkan (2011), *D. oleoides* ve *D. sericea* bitki türleri ile yaptığı çalışmada dört farklı çözücü ile toplam flavonoid madde miktarının sırasıyla 11,586-272,940 mg RE/g bitki ve 4,71-180,19 mg RE/g bitki arasında değişim gösterdiğini bulmuştur. Lee vd.(2011), *D. kiusiana* bitki türünün toplam flavonoid madde miktarını beş farklı çözücü ile yaprak, gövde ve kök için sırasıyla 2,45-14,06 mg RE/g bitki, 3,02-9,18 mg RE/g bitki ve 2,73-10,07 mg RE/g bitki olarak belirlemişlerdir.

Manojlovic vd. (2014), *D. blagayana* bitkisinin iki farklı çözücü ile yaprak ve gövde kısmındaki toplam flavonoid madde miktarını sırasıyla 26,79-27,98 mg RE/g bitki ve 26,79-29,95 mg RE/g bitki olarak tespit etmişlerdir. Tongur vd. (2018), *D. gnidioides* ve *D. sericea* bitki türlerinde toplam flavonoid madde miktarını iki farklı çözücü ile sırasıyla 144,2-244,5 mg RE/g bitki ve 39,1-121,3 mg RE/g bitki olarak saptamıştır.

4.2.3. DPPH metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarı

Toplam antioksidan aktivite miktarı analizi için önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. DPPH radikalinin % 50'sini inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanan E_{c50} değerleri mg/mg DPPH cinsinden Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D.gnidioides* bitki türlerinin DPPH metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarları

Dönem	Kısım		Toplam antioksidan aktivite miktarı (mg/mg DPPH)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	34,629	56,399
		2	34,359	56,094
		3	34,414	55,774
	Standart sapma		0,143	0,313
	% RSD		0,414	0,558
	Yaprak	1	29,373	91,402
		2	29,601	92,738
		3	29,773	92,075
	Standart sapma		0,201	0,668
	% RSD		0,679	0,726

Çizelge 4.7'nin devamı

Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	20,853	15,092
		2	20,565	15,073
		3	20,422	15,083
	Standart sapma		0,220	0,009
	% RSD		1,066	0,061
	Herba	1	20,853	18,202
		2	24,319	18,348
		3	24,108	18,275
	Standart sapma		1,943	0,073
	% RSD		8,414	0,400
	Yaprak	1	18,889	86,412
		2	18,992	86,373
		3	19,197	86,394
	Standart sapma		0,157	0,019
	% RSD		0,825	0,022
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	25,025	63,890
		2	25,297	63,757
		3	25,245	63,809
	Standart sapma		0,144	0,067
	% RSD		0,573	0,104
	Yaprak	1	27,396	107,818
		2	27,349	108,491
		3	27,834	107,977
	Standart sapma		0,268	0,352
	% RSD		0,972	0,325

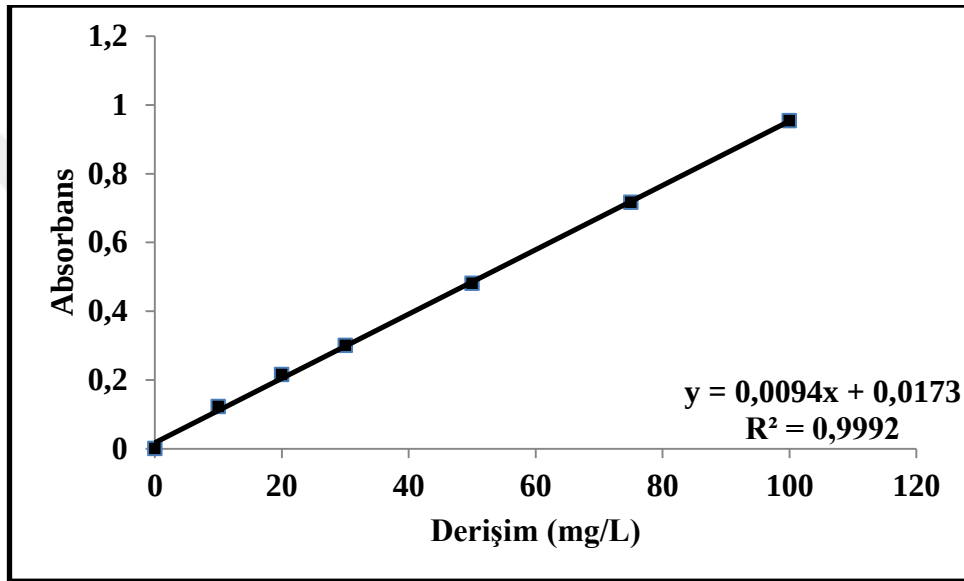
Çizelge 4.7’de verilen sonuçlar incelendiğinde, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türleri için antioksidan aktivite miktarları sırasıyla 19,03-34,47 mg/mg DPPH ve 15,08-108,10 mg/mg DPPH olarak belirlenmiştir. Her iki bitki türü karşılaştırıldığında *D. gnidioides* bitki türünde antioksidan aktivite miktarı daha fazla bulunmuştur. *D. gnidioides* bitki türünde toplam antioksidan aktivite miktarının çiçeklenme döneminden çiçeklenme sonrası dönemine doğru azalma eğiliminde olduğu ve en az çiçeklenme öncesi dönemde bulunduğu tespit edilmiştir. *D. sericea* bitki türünde ise en fazla çiçeklenme döneminde ve en az çiçeklenme sonrası dönemde belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında bulunan sonuçlar literatür sonuçları ile değerlendirildiğinde uyumlu verilerin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, antioksidan aktivite miktarına toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarlarının etkili olduğu bildirilmiştir (Cavlak ve Yağmur 2016; El 2008; Özden ve Özden 2014). Çalışma kapsamında toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarının fazla bulunduğu dönemlerde (Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6) antioksidan aktivite miktarı da fazla bulunmuştur ve elde edilen sonuçlar literatür çalışmalarını desteklemektedir.

Manojlovic vd. (2014), *D. blagayana* bitki türünde kloroform ve metanol olmak üzere iki farklı çözücü ile çalışarak, bitkinin yaprak ve gövdesinde Ec 50 değerini sırasıyla 20,95-25,24 µg/mL ve 20,25-21,09 µg/mL olarak belirlemiştir. (Tundis vd. 2020), *D. laureola* bitki türünde üç farklı çözücü (diklorometan, hekzan ve metanol) ile bitkinin Ec 50 değerinin 32,2-74,3 µg/mL arasında olduğunu kaydetmiştir.

4.2.4. FRAP metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarı

FRAP metodu kullanılarak toplam antioksidan aktivite miktarını belirlemek amacıyla önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerin UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Kullanılan kalibrasyon grafiği Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Toplam antioksidan aktivite analizi için hazırlanmış troloks kalibrasyon grafiği

Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin FRAP metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarları Çizelge 4.8'de listelenmektedir.

Çizelge 4.8. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin FRAP metodu ile belirlenen toplam antioksidan aktivite miktarları

Dönem	Kısım		Toplam antioksidan aktivite miktarı (mg TE/g kuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	42,469	43,430
		2	42,128	43,411
		3	42,245	43,143
	Standart sapma		0,173	0,161
	% RSD		0,409	0,371
	Yaprak	1	44,311	43,870
		2	44,224	44,311
		3	43,286	44,809
	Standart sapma		0,568	0,469
	% RSD		1,293	1,059
Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	50,314	95,122
		2	51,061	96,089
		3	50,323	95,266
	Standart sapma		0,428	0,522
	% RSD		0,847	0,546
	Herba	1	47,202	74,135
		2	47,399	75,265
		3	48,199	75,102
	Standart sapma		0,528	0,611
	% RSD		1,109	0,816
	Yaprak	1	53,914	49,099
		2	53,090	48,054
		3	53,923	48,198
	Standart sapma		0,478	0,566
	% RSD		0,891	1,169
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	40,500	43,391
		2	41,438	43,296
		3	41,496	42,338
	Standart sapma		0,559	0,582
	% RSD		1,359	1,354
	Yaprak	1	38,623	43,018
		2	37,618	43,411
		3	38,576	42,463
	Standart sapma		0,567	0,476
	% RSD		1,482	1,109

Çizelge 4.8’de verilen sonuçlar incelendiğinde, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türleri için antioksidan aktivite miktarları sırasıyla 38,27-53,64 ve 42,96-95,49 mg TE/mg kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. Her iki bitki türü karşılaştırıldığında, *D. gnidioides* bitki türünde antioksidan aktivite miktarı daha fazla bulunmuştur. Her iki bitki türünde de antioksidan aktivite miktarı çiçeklenme döneminde en fazla,

çiçeklenme sonrası ve çiçeklenme öncesi dönemlerinde ise birbirine yakın değerlerdedir. Her iki bitki türünde de en fazla antioksidan aktivite miktarı çiçeklenme döneminde çiçek kısmında tespit edilmiştir.

DPPH ve FRAP metotları kullanılarak elde edilen toplam antioksidan aktivite miktarı sonucu en yüksek çiçeklenme döneminde belirlenmiştir. Literatür çalışmaları ile uyumlu olarak toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarı ile antioksidan aktivite miktarı arasında ilişki saptanmıştır (Allal vd. 2019; Balkan vd. 2016; Büyüktuncel 2013; Cavlak ve Yağmur 2016; Özden ve Özden 2014).

4.2.5. Toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı

Her iki bitki türünde de üç farklı dönemde toplanan bitkilerin farklı kısımlarındaki toplam klorofil ve karotenoid miktarlarını belirlemek amacıyla kuru bitki örnekleri hacimce % 80’lik aseton çözeltisi ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Farklı dönemlerde toplanan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam klorofil miktar analiz sonuçları Çizelge 4.9’da ve toplam karotenoid analiz sonuçları Çizelge 4.10’da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam klorofil miktarları

Dönem	Kısım		Toplam klorofil miktarı (mg/g kuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	0,522	0,497
		2	0,515	0,493
		3	0,518	0,490
	Standart sapma		0,004	0,004
	% RSD		0,708	0,742
	Yaprak	1	0,459	0,526
		2	0,464	0,522
		3	0,464	0,519
	Standart sapma		0,003	0,003
	% RSD		0,645	0,637

Çizelge 4.9'un devamı

Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	0,039	0,078
		2	0,041	0,071
		3	0,041	0,077
	Standart sapma		0,001	0,004
	% RSD		2,818	5,088
	Herba	1	0,224	0,068
		2	0,219	0,079
		3	0,223	0,076
	Standart sapma		0,003	0,006
	% RSD		1,322	7,988
	Yaprak	1	0,443	0,533
		2	0,433	0,533
		3	0,439	0,544
	Standart sapma		0,005	0,006
	% RSD		1,131	1,193
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	0,788	0,234
		2	0,780	0,231
		3	0,779	0,230
	Standart sapma		0,005	0,002
	% RSD		0,631	0,979
	Yaprak	1	1,033	0,371
		2	1,034	0,377
		3	1,023	0,374
	Standart sapma		0,006	0,003
	% RSD		0,566	0,792

Klorofil miktarı analiz sonuçları incelendiğinde, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türleri için toplam klorofil miktarı mg/g kuru ağırlık cinsinden sırasıyla 0,041-1,030 ve 0,074-0,537 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). *D. sericea* bitki türünün toplam klorofil miktarının, *D. gnidioides* türünden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. En yüksek klorofil miktarı *D. gnidioides* bitki türündeki çiçeklenme öncesi dönemde ve *D. sericea* bitki türünde çiçeklenme sonrası dönemde bulunmuştur. En az klorofil miktarı ise her iki bitki türünde de çiçeklenme döneminde belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Literatür çalışmaları ile uyumlu olarak en çok klorofil miktarı yaprak kısmında ve en az ise çiçek kısmında tespit edilmiştir (Aşçı 2020; Bat vd. 2020; Murathan ve Kaya 2020).

Bu konuda yapılan çalışmalarda; bitkilerde bulunan klorofil miktarının bitkinin fizyolojik faaliyeti, sağlığı, stresi ve besin elementi eksikliği gibi konularda bilgi sahibi olmamızı sağladığı bildirilmiştir. Aynı zamanda klorofil miktarının artmasıyla artan fotosentez kapasitesinin bitki verimini de arttığı sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, antioksidan etkiye sahip olduğu bilinen klorofillerin miktarını belirlemenin oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır (Aşçı 2020; Bat vd. 2020; Doğan vd. 2020; Murathan ve Kaya 2020; Kaya ve Aladağ 2020; Zeren vd. 2017).

Aşçı (2020), nane (*Mentha piperita*) bitkisi ile yaptığı çalışmada toplam klorofil miktarını 1,34 mg/g olarak belirlemiştir. Doğan vd. (2020), farklı üzüm çeşitleri ile yaptıkları çalışmada asma yapraklarında ortalama toplam klorofil miktarını 1,71 mg/g olarak bulmuşlardır. Murathan ve Kaya (2020), Hass ve Fuerte avokado çeşidi ile yaptıkları çalışmada, toplam klorofil miktarını Hass çeşidinde sırasıyla meyve ve yaprakta 0,011-0,023 mg/g, Fuerte çeşidinde ise sırasıyla meyve ve yaprakta 0,008-0,022 mg/g olarak belirlemişlerdir. Tongur (2014), *D. gnidioides* ve *D. sericea* bitki çeşitleri ile üç farklı çözücü ile klorofil a ve klorofil b miktarını tespit etmiştir. Klorofil a miktarını *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde sırasıyla 1,450-4,476 mg/g aralığında ve 0,315-0,759 mg/g aralığında ve klorofil b miktarını da sırasıyla 0,584-2,682 mg/g aralığında ve 2,043-4,171 mg/g aralığında bulmuştur.

Çalışmadan elde edilen toplam klorofil miktarı verileri literatür çalışmaları ile uyumludur. Her iki bitki türünde de yapraklardaki toplam klorofil miktarı asma ve nane yapraklarında elde edilen verilere yakındır (Aşçı 2020; Doğan vd. 2020). Her iki bitki türünde de bitkinin farklı dönemlerinde farklı kısımlarının içeriğinin ayrıntılı olarak incelendiği bir çalışmaya rastlanmadığı için farklı dönem ve kısımlarda elde edilen veriler literatür ile kıyaslanamamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışması sonucunda önemli tespitler ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.10'da, farklı gelişim dönemlerinde toplanan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam karotenoid miktarları verilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam karotenoid miktarları

Dönem	Kısım		Toplam karotenoid miktarı (mg/g kuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	0,519	0,385
		2	0,509	0,381
		3	0,519	0,388
	Standart sapma		0,006	0,003
	% RSD		1,146	0,884
	Yaprak	1	0,464	0,382
		2	0,476	0,369
		3	0,473	0,377
	Standart sapma		0,006	0,006
	% RSD		1,230	1,649

Çizelge 4.10'un devamı

Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	0,126	0,275
		2	0,120	0,274
		3	0,132	0,259
	Standart sapma		0,006	0,009
	% RSD		4,535	3,335
	Herba	1	0,195	0,113
		2	0,190	0,119
		3	0,188	0,116
	Standart sapma		0,004	0,003
	% RSD		1,896	2,685
	Yaprak	1	0,299	0,356
		2	0,311	0,363
		3	0,302	0,349
	Standart sapma		0,006	0,007
	% RSD		2,107	2,014
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	0,404	0,257
		2	0,391	0,251
		3	0,395	0,234
	Standart sapma		0,007	0,012
	% RSD		1,747	4,875
	Yaprak	1	0,505	0,346
		2	0,506	0,353
		3	0,517	0,352
	Standart sapma		0,007	0,004
	% RSD		1,351	1,144

Çizelge 4.10'da verilen sonuçlar incelendiğinde, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türleri için toplam karotenoid miktarı sırasıyla 0,126-0,516 mg/g kuru ağırlık ve 0,116-0,385 mg/g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. En yüksek karotenoid miktarı; her iki bitki türünde de çiçeklenme öncesi dönemde ve en az karotenoid miktarı her iki bitki türünde de çiçeklenme döneminde bulunmuştur.

Karotenoid bileşenleri, ışık ve oksijenin neden olduğu klorofilin parçalanmasını önleyerek ve absorbe ettiği ışığı klorofile aktararak fotosentezde çok önemli rol alırlar ve klorofil içeren bütün bitkilerde bulunurlar. Oldukça yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu bilinen karotenoidler aynı zamanda A vitamininin öncül maddesidirler. Sadece bitkiler tarafından sentezlenip hayvanlara beslenme yoluyla geçen karotenoidlerin bitkilerdeki miktarını belirlemek oldukça önemlidir (Amrani-Allalou vd. 2019; Demirtaş ve Kırnak 2009; Diken 2009; Doğan vd. 2020; Duru 2008; Erge 2007; Ghafoor vd. 2020; Jan vd. 2017; Mihaylova vd. 2018; Pintea vd. 2013).

Yapılan çalışmada en az toplam karotenoid miktarı, her iki bitki türünde de çiçeklenme döneminde herba kısmında tespit edilmiştir. Literatür çalışmaları ile uyumlu olarak toplam karotenoid miktarı gelişim dönemine ve bitki kısmına göre değişmektedir. Karotenoid miktarı aynı zamanda bitkinin ışığa maruz kalma süresi, toprak çeşidi, iklim, rakım, yetiştiği bölge ve yıl gibi faktörlere bağlı olarak da

değişmektedir (Koca 2006, Murathan ve Kaya 2020, Oluk vd. 2012, Sönmez ve Ellialtıoğlu 2014, Şengün 2019, Tongur 2014, Tongur vd. 2018, Veeru vd. 2009, Wiszniewska vd. 2015).

Tongur (2014), *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde farklı çözücüler ile toplam karotenoid içeriklerini sırasıyla 6,05-159,03 mg/100 g arasında ve 11,85-44,18 mg/100 g arasında belirlemiştir. Amrani-Allalou vd. (2019), bazı tıbbi bitkiler ile yaptıkları çalışmada; *Brassica oleracea*, *Amaranthus spinosus*, *Amaranthus polygonoides*, *Petroselinum crispum*, *Boerhaavia diffusa*, *Capsicum annuum*, *Ipomoea pes-tigridis*, *Lactuca sativa*, *Portulaca oleracea* ve *Tamarindus indica* bitki türleri için toplam karotenoid miktarını sırasıyla 27,8, 24,6, 20,6, 18,4, 2,80, 3,79, 4,31, 2,87, 4,20 ve 4,77 mg/100 g kuru ağırlık olarak rapor etmişlerdir. Ghafoor vd. (2020), kurutma yöntemlerinin zencefil bitkisinin biyokimyasal içeriği üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında toplam karotenoid miktarını 13,17 µg/g olarak tespit etmişlerdir. Mihaylova vd. (2018), bazı tıbbi bitkilerin biyokimyasal içeriğini inceledikleri çalışmada; *Tanacetum vulgare* (19,11), *Polygonum hydropiper* (17,14), *Silene vulgaris* (753,08), *Urtica dioica* L. (175,82), *Centaurium erythraea* (23,29) ve *Rosa canina* (175,61) bitki türlerinde toplam karotenoid içeriğini µg/g kuru ağırlık olarak belirtmişlerdir. Pintea vd. (2013), dört farklı *Calendula officinalis* L. çiçeği ile yaptıkları çalışmada; toplam karotenoid miktarını saplı çiçek kısmında 103,8 mg/100 g taze bitki ve taç yapraklarında ise 8 mg/100 g taze bitki olarak bulmuşlardır.

4.2.6. Toplam antosiyanin miktarı

Farklı dönemlerde toplanan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde farklı kısımlarındaki toplam antosiyanin miktarlarını belirlemek amacıyla daha önce optimize edilen metot ile elde edilen ekstraktlar kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktların UV-Visible spektrofotometre cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerine ait analiz sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam antosiyanin miktarları

Dönem	Kısım		Toplam antosiyanin miktarı (mg/kg kuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	7,388	5,825
		2	6,973	5,511
		3	6,070	5,514
	Standart sapma		0,674	0,180
	% RSD		9,893	3,210
	Yaprak	1	0,399	1,687
		2	0,434	2,350
		3	0,384	1,800
	Standart sapma		0,026	0,355
	% RSD		6,335	18,225

Çizelge 4.11'in devamı

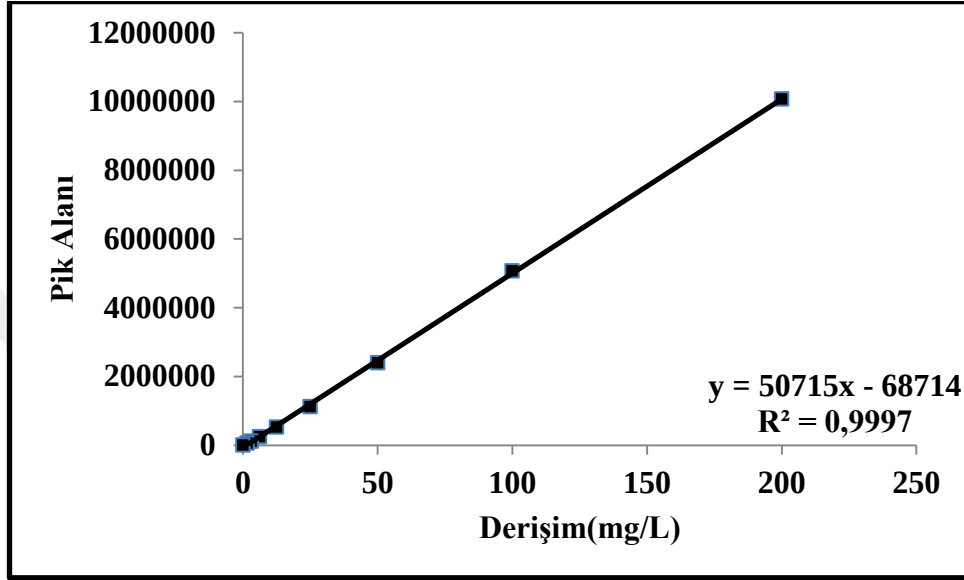
Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	18,235	25,249
		2	17,697	20,583
		3	16,676	20,787
	Standart sapma		0,792	2,637
	% RSD		4,518	11,875
	Herba	1	6,346	8,889
		2	6,750	8,000
		3	6,128	6,434
	Standart sapma		0,315	1,243
	% RSD		4,920	15,987
	Yaprak	1	0,701	10,869
		2	0,763	9,614
		3	0,743	9,285
	Standart sapma		0,032	0,836
	% RSD		4,284	8,428
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	9,852	5,442
		2	10,452	4,073
		3	10,904	4,305
	Standart sapma		0,528	0,733
	% RSD		5,073	15,908
	Yaprak	1	2,054	1,383
		2	2,206	1,611
		3	2,672	1,839
	Standart sapma		0,322	0,228
	% RSD		13,934	14,150

D. sericea ve *D. gnidioides* bitki türlerinde toplam antosiyanin miktarı sırasıyla 0,41-17,54 mg/kg kuru ağırlık ve 1,61-22,21 mg/kg kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir. Her iki bitki türünde de en yüksek antosiyanin miktarı çiçeklenme döneminde ve çiçek kısmında elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

Özden ve Özden (2014), yaptıkları çalışmada sert çekirdekli, yumuşak çekirdekli ve üzüksü olmak üzere 3 farklı sınıfa ait 14 renkli meyve ile ilgili yaptıkları çalışmada antosiyanin miktarının 4,41-3436,14 mg/kg taze ağırlık arasında dağılım gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışma sonucunda renk değerleri ile antosiyanin içeriği arasında bağlantı olduğunu tespit etmişlerdir. Literatür sonuçları incelendiğinde, antosiyanin içeriğinin daha çok kırmızı veya mor renkli bitkilerde veya sebzelerde olduğu görülmüştür. Antosiyanin analiz sonuçlarında çiçek kısmında antosiyanin miktarının en yüksek çıkması da bu sonuç ile uyumludur (Akal 2019; Çetin vd. 2012; Damar 2010; Özden ve Özden 2014; Özen ve Akbulut 2008).

4.2.7. C vitamini miktarı

Farklı dönemlerde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki C vitamini miktarları HPLC cihazında belirlenmiştir. Farklı derişimlerde hazırlanan C vitamini standart çözeltilerinin HPLC cihazı kullanılarak pik alanı değerleri belirlenmiştir. Pik alanı ve derişim değerleri kullanılarak C vitamini kalibrasyon grafiğı çizilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. C vitamini kalibrasyon grafiğı

Farklı dönemlerde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki C vitamini miktarları Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki C vitamini miktarları

Dönem	Kısım		C vitamini miktarı (mg/100 g kuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	27,238	50,586
		2	26,429	51,428
		3	26,408	50,475
	Standart sapma		0,473	0,521
	% RSD		1,774	1,026
	Yaprak	1	27,513	39,262
		2	27,398	40,396
		3	27,598	37,690
	Standart sapma		0,100	1,358
	% RSD		0,364	3,473

Çizelge 4.12'nin devamı

Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	26,763	36,962
		2	26,650	35,893
		3	27,053	35,490
	Standart sapma		0,208	0,761
	% RSD		0,774	2,107
	Herba	1	25,320	32,439
		2	25,832	31,822
		3	25,093	31,377
	Standart sapma		0,378	0,533
	% RSD		1,489	1,673
	Yaprak	1	24,604	30,035
		2	22,824	29,982
		3	22,535	29,347
	Standart sapma		1,121	0,383
	% RSD		4,805	1,285
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	23,680	30,431
		2	24,151	29,654
		3	24,751	28,942
	Standart sapma		0,536	0,745
	% RSD		2,217	2,510
	Yaprak	1	21,505	28,107
		2	21,259	28,323
		3	20,479	27,953
	Standart sapma		0,536	0,186
	% RSD		2,541	0,660

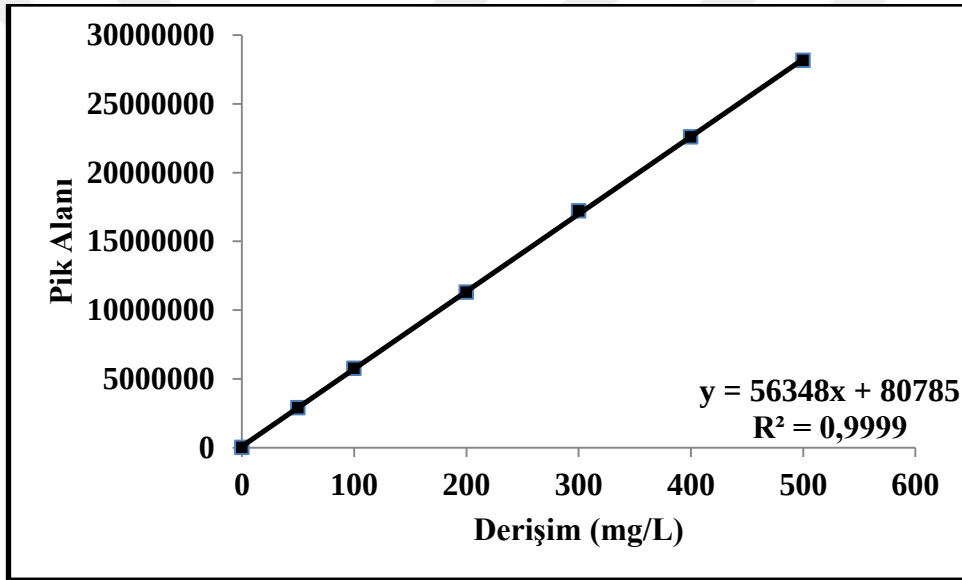
C vitamini analizi sonuçlarının verildiği Çizelge 4.12'de, *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde sırasıyla C vitamini miktarları 21,08-27,50 mg/100 g kuru ağırlık ve 28,13-50,83 mg/100 g kuru ağırlık'tır. *D. gnidioides* bitki türünde elde edilen C vitamini miktarı, *D. sericea* türünden oldukça fazla bulunmuştur. *D. sericea* bitki türünde gelişim dönemleri arasında C vitamini içeriği açısından çok fark gözlenmemiştir. *D. gnidioides* bitki türünde ise en yüksek C vitamini miktarı çiçeklenme öncesi dönemde tespit edilmiştir.

Şat ve Öz (2015), yaptıkları çalışmada C vitamini miktarını maydanoz yaprağı, pazı sapı ve ıspanakta sırasıyla 127,8, 60 ve 51 mg/100 g olarak belirlemişlerdir. Kasım ve Kasım (2019), C vitamini miktarını domates, kırmızıbiber ve patlıcanda sırasıyla 19,8, 150,7 ve 3,7 mg/100 g olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar incelendiğinde, çalışmada kullanılan *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin oldukça yüksek C vitamini içeriğine sahip olduğu görülmektedir.

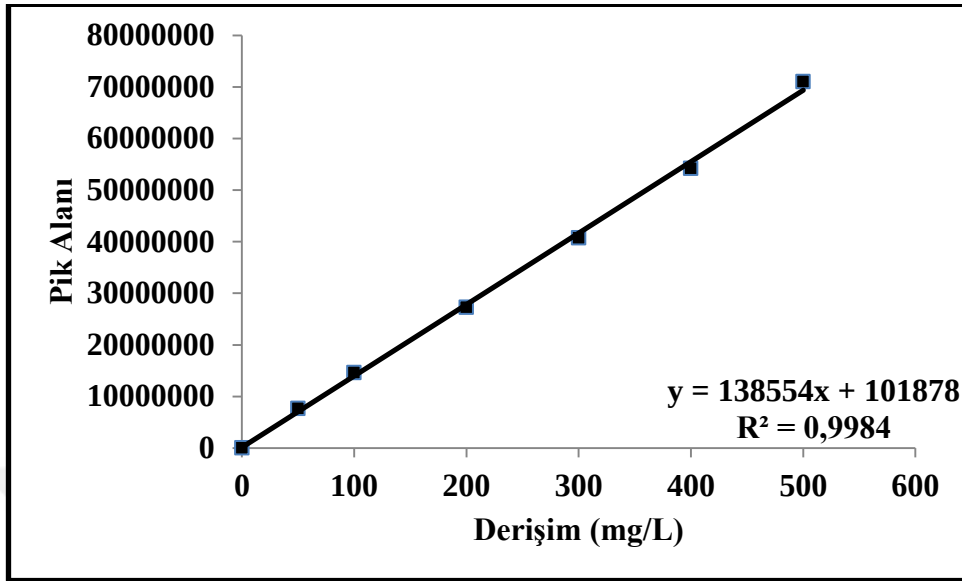
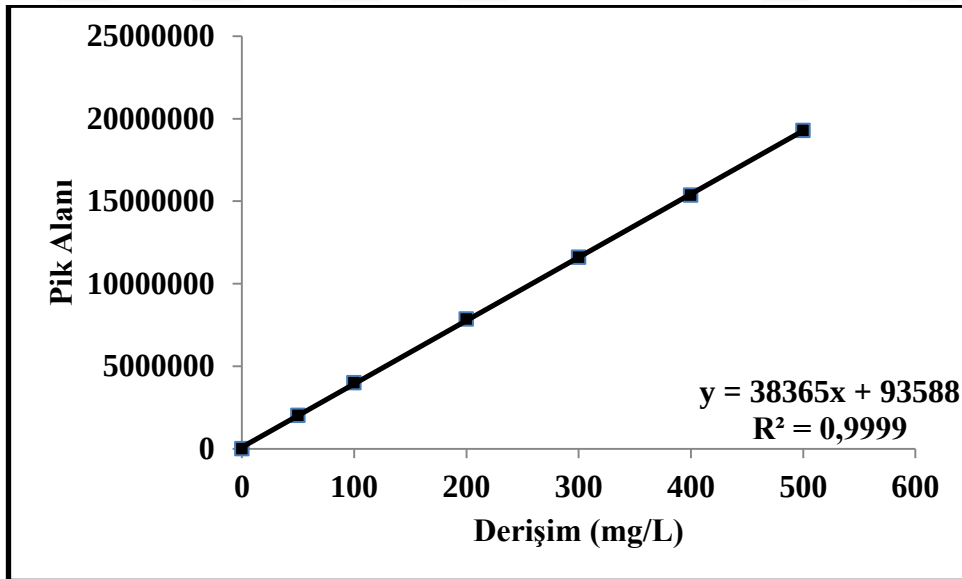
4.2.8. Fenolik ve flavonoid bileşen miktarı

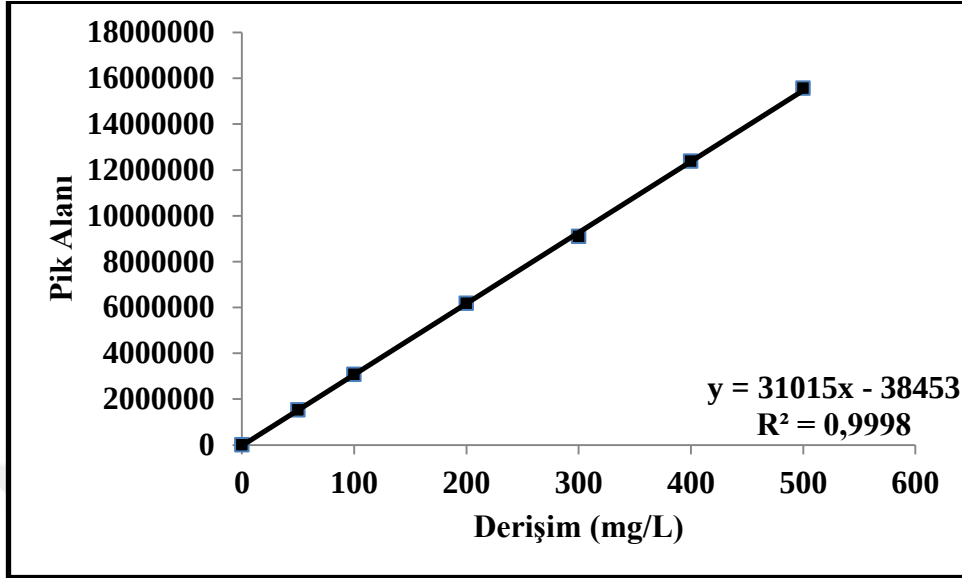
Fenolik ve flavonoid bileşen miktar analizlerini gerçekleştirebilmek amacıyla önceden ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerin HPLC cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır.

Fenolik ve flavonoid bileşen miktarlarını belirleyebilmek amacıyla; kafeik asit, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, rosmarinik asit, kamferol, kateşin, vanilik asit, şiringik asit, sinapik asit, rutin, kersetin, klorojenik asit, epikateşin, ferulik asit ve ellajik asit olmak üzere 15 farklı standart ile çalışılmıştır. Her bir standart için farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerin HPLC cihazı ile pik alanı değerleri belirlenmiştir. Her bir standart için ayrı ayrı derişim değerlerine karşılık gelen pik alanı değerleri ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Kullanılan kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5-4.19'da gösterilmiştir.

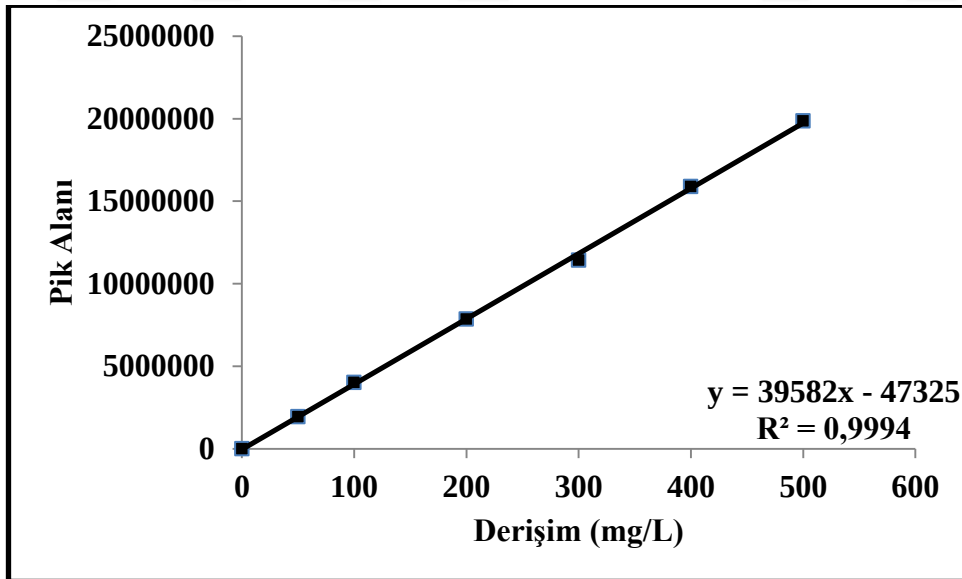


Şekil 4.5. Kafeik asit kalibrasyon grafiği

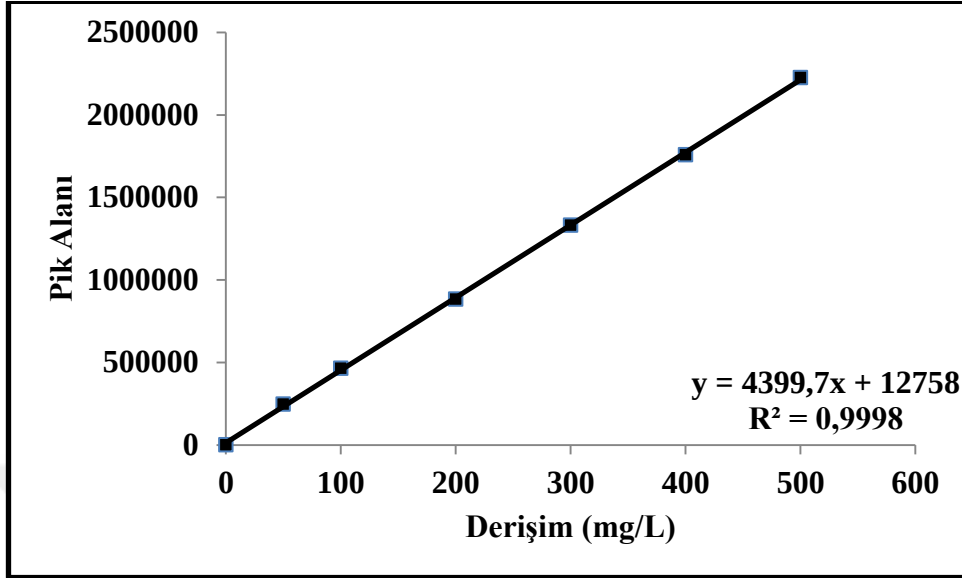
Şekil 4.6. *p*-Kumarik asit kalibrasyon grafiğiŞekil 4.7. *o*-Kumarik asit kalibrasyon grafiği



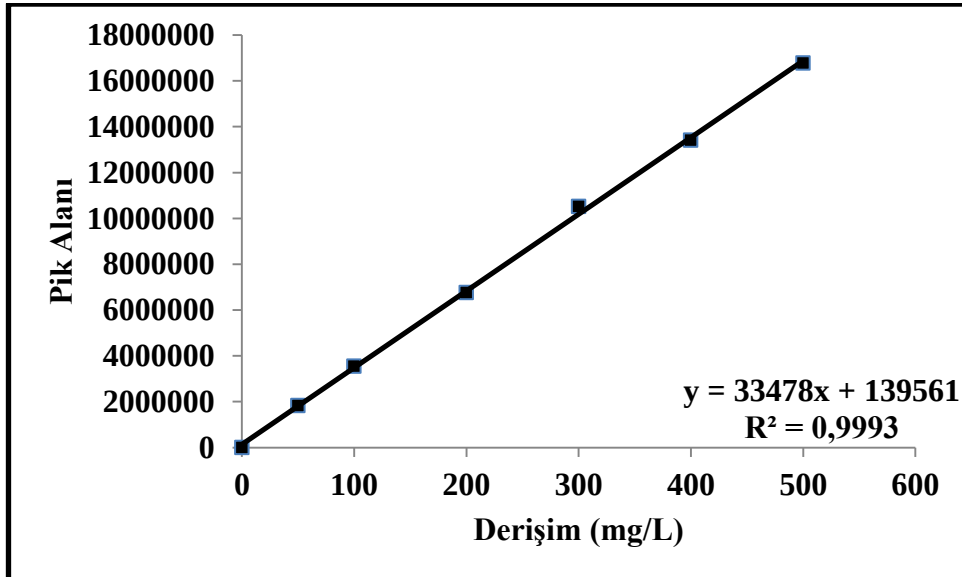
Şekil 4.8. Rosmarinik asit kalibrasyon grafiğı



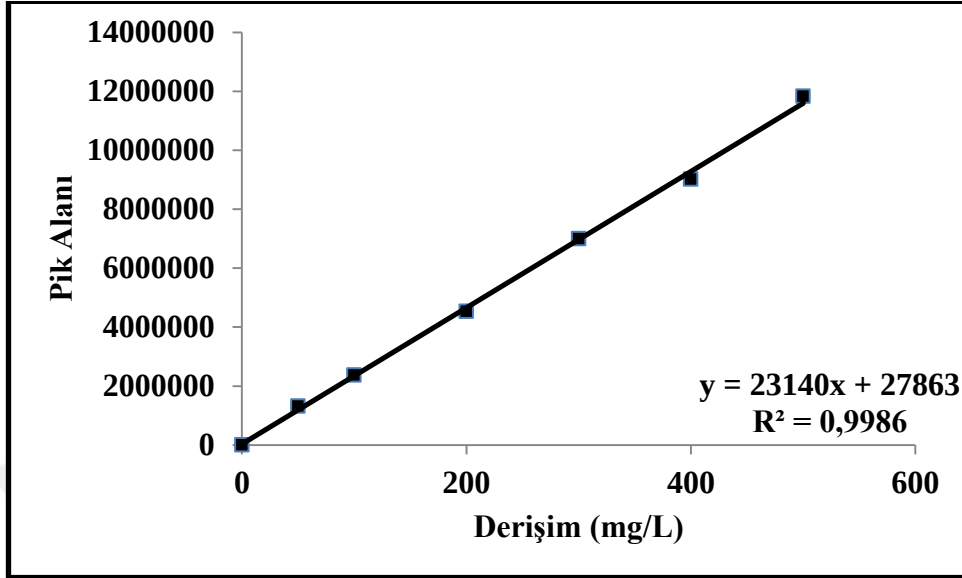
Şekil 4.9. Kamferol kalibrasyon grafiğı



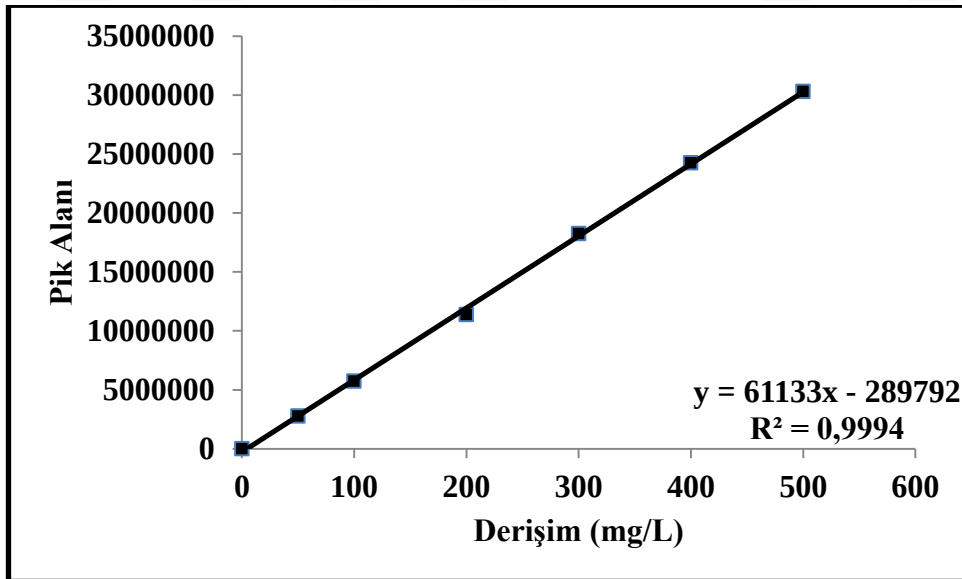
Şekil 4.10. Kateşin kalibrasyon grafiği



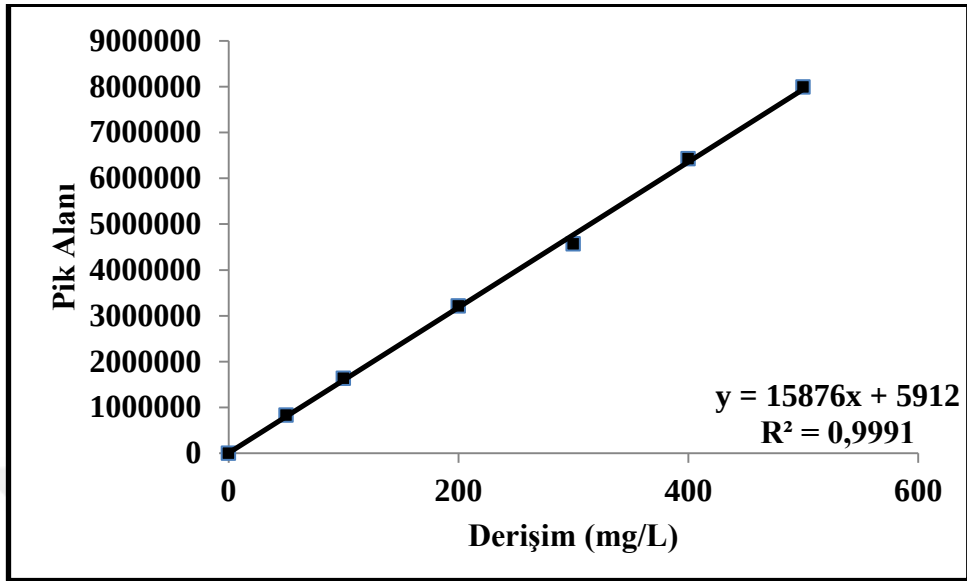
Şekil 4.11. Vanilik asit kalibrasyon grafiği



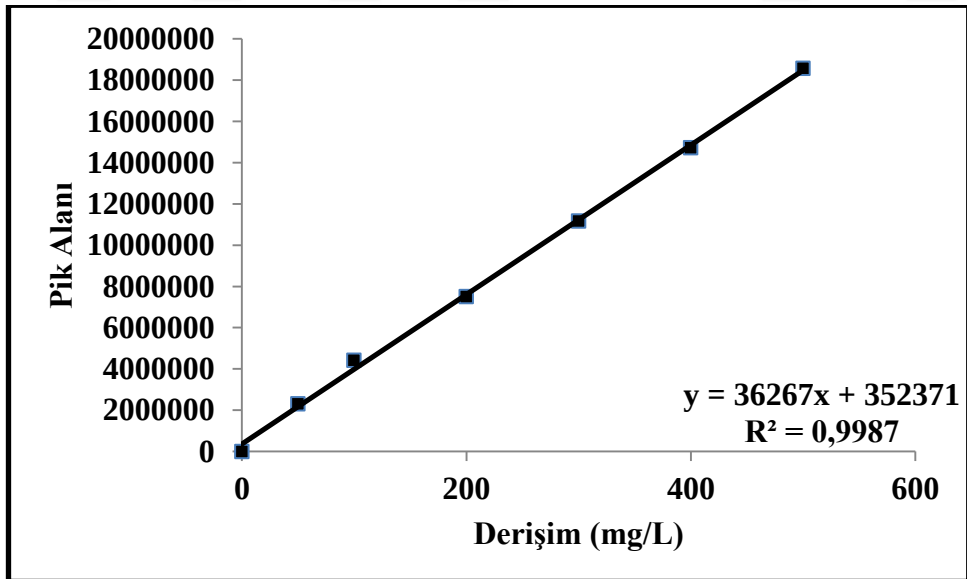
Şekil 4.12. Şiringik asit kalibrasyon grafiği



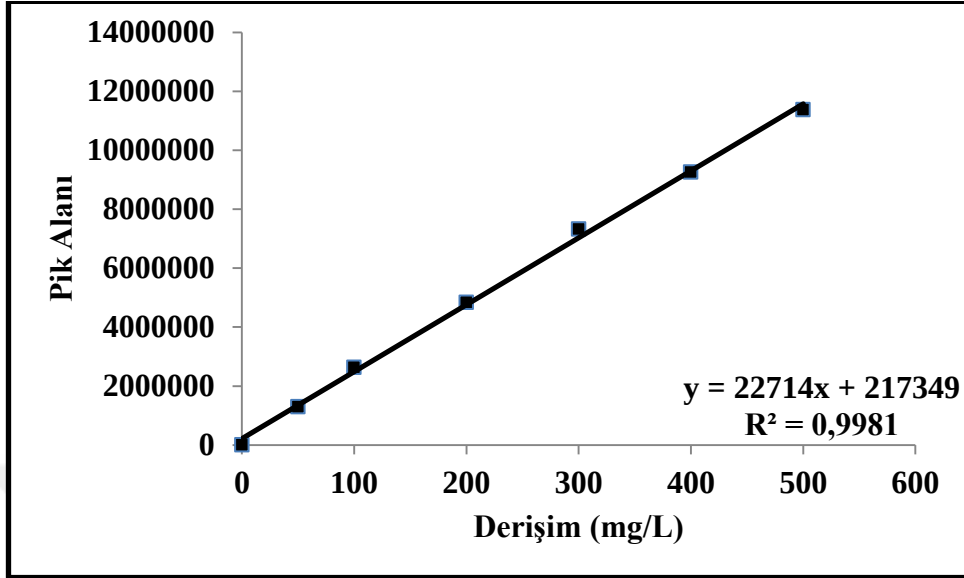
Şekil 4.13. Sinapik asit kalibrasyon grafiği



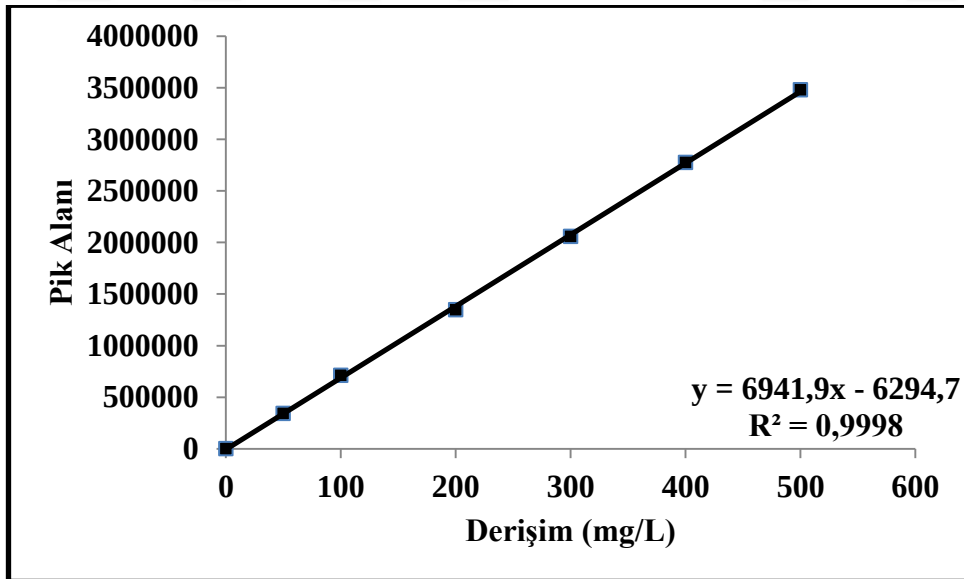
şekil 4.14. Rutin kalibrasyon grafiği



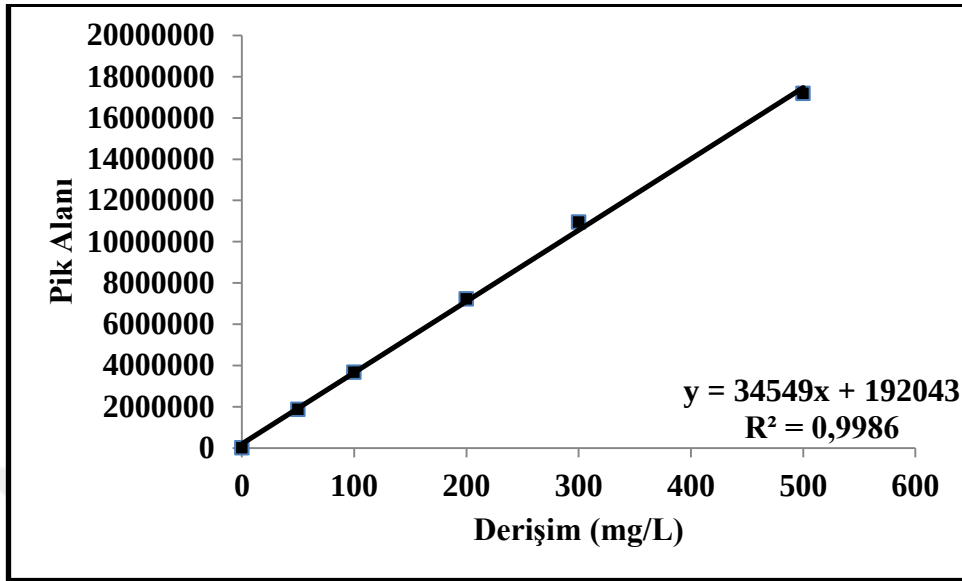
şekil 4.15. Kersetin kalibrasyon grafiği



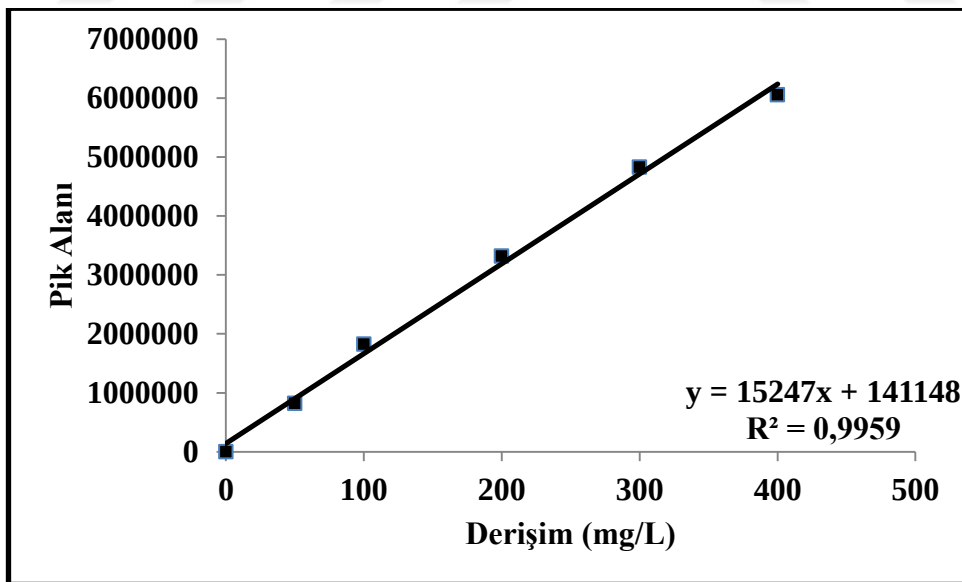
şekil 4.16. Klorojenik asit kalibrasyon grafiği



şekil 4.17. Epikateşin kalibrasyon grafiği



Şekil 4.18. Ferulik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.19. Ellajik asit kalibrasyon grafiği

Elde edilen kalibrasyon doğruları kullanılarak farklı dönemlerde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki fenolik ve flavonoid bileşen miktarları belirlenmiştir.

D. sericea bitki türünde kateşin, şiringik asit, sinapik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve epikateşin belirlenmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.13'te ve Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* bitki türünün farklı kısımlarındaki kateşin, şiringik asit ve sinapik asit miktarları

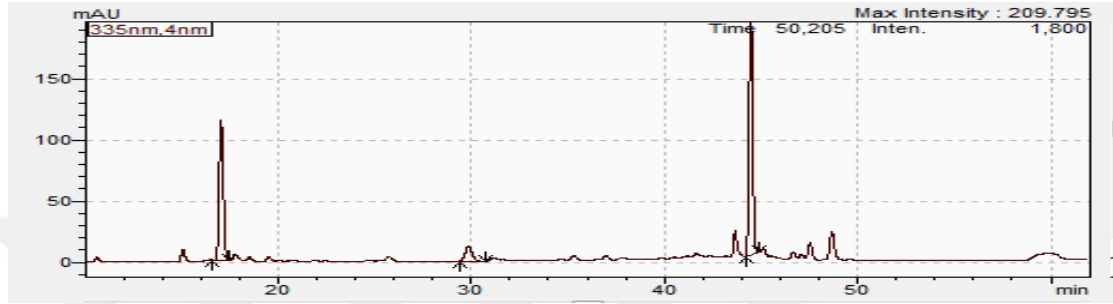
Dönem	Kısım		Kateşin (mg/kg kuru ağırlık)	Şiringik asit (mg/kg kuru ağırlık)	Sinapik asit (mg/kg kuru ağırlık)
Çiçeklenme öncesi dönemi	Herba	1	167,67	70,22	186,82
		2	165,34	71,84	188,52
		3	166,50	71,03	187,67
	Standart sapma		1,16	0,81	0,85
	% RSD		0,70	1,14	0,45
	Yaprak	1	192,52	89,00	114,98
		2	193,03	89,23	114,75
		3	192,77	89,11	114,87
	Standart sapma		0,25	0,11	0,12
	% RSD		0,13	0,13	0,10
Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	58,70	-	-
		2	59,25	-	-
		3	58,97	-	-
	Standart sapma		0,27	-	-
	% RSD		0,46	-	-
	Herba	1	45,79	-	-
		2	44,09	-	-
		3	44,94	-	-
	Standart sapma		0,85	-	-
	% RSD		1,89	-	-
	Yaprak	1	-	26,11	-
		2	-	26,70	-
		3	-	25,26	-
	Standart sapma		-	0,72	-
	% RSD		-	2,78	-
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	-	45,22	-
		2	-	45,94	-
		3	-	45,58	-
	Standart sapma		-	0,36	-
	% RSD		-	0,79	-
	Yaprak	1	-	21,90	-
		2	-	21,83	-
		3	-	21,87	-
	Standart sapma		-	0,04	-
	% RSD		-	0,16	-

Çizelge 4.13'te verilen analiz sonuçları incelendiğinde; *D. sericea* bitki türünde kateşin, şiringik asit ve sinapik asit miktarının sırasıyla 44,94-192,77, 21,86-89,11 ve 114,87-187,67 mg/kg kuru ağırlık aralığında olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.14. Farklı gelişim dönemlerindeki toplanmış *D. sericea* bitki türünün farklı kısımlarındaki rosmarinik asit, klorojenik asit ve epikateşin miktarları

Dönem	Kısım		Rosmarinik asit (mg/kg kuru ağırlık)	Klorojenik asit (mg/kg kuru ağırlık)	Epikateşin (mg/kg kuru ağırlık)
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	1829,81	1386,47	325,43
		2	1824,72	1384,36	323,61
		3	1827,27	1385,41	323,41
	Standart sapma		2,55	1,05	1,11
	% RSD		0,14	0,08	0,34
	Yaprak	1	2021,99	1710,10	403,65
		2	2023,84	1710,64	399,80
		3	2022,91	1710,37	400,06
	Standart sapma		0,92	0,27	2,15
	% RSD		0,05	0,02	0,54
Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	153,62	1730,54	58,05
		2	153,85	1725,03	56,91
		3	153,73	1727,79	55,47
	Standart sapma		0,11	2,76	1,29
	% RSD		0,07	0,16	2,27
	Herba	1	137,12	989,78	148,11
		2	137,65	993,47	147,83
		3	137,39	991,63	147,76
	Standart sapma		0,27	1,85	0,19
	% RSD		0,19	0,19	0,13
	Yaprak	1	154,37	929,34	184,20
		2	157,22	936,34	183,95
		3	155,80	932,84	182,23
	Standart sapma		1,42	3,50	1,08
	% RSD		0,91	0,38	0,59
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	239,86	728,32	54,17
		2	238,98	729,36	54,03
		3	239,42	728,84	53,65
	Standart sapma		0,44	0,52	0,27
	% RSD		0,18	0,07	0,50
	Yaprak	1	148,87	797,83	32,76
		2	148,24	800,68	32,54
		3	148,56	799,25	32,58
	Standart sapma		0,31	1,42	0,12
	% RSD		0,21	0,18	0,37

Çizelge 4.14'te verilen analiz sonuçları incelendiğinde; *D. sericea* bitki türünde rosmarinik asit, klorojenik asit ve epikateşin miktarlarının sırasıyla 137,39-2023, 729-1728 ve 33-401 mg/kg aralığında olduğu görülmektedir. Üç bileşenin de çiçeklenme öncesi dönemde en yüksek miktarda var olduğu anlaşılmaktadır. *D. Sericea* bitki türünde çiçeklenme öncesi dönemde herba kısmında yapılan analiz sonucu elde edilen örneğe ait kromatogram Şekil 4.20'de verilmiştir. 335 nm dalga boyundaki kromatogramda Sinapik asit, rosmarinik asit ve klorojenik miktarı belirlenmiştir.



Şekil 4.20. Çiçeklenme öncesi dönemde toplanan *D. sericea* bitki türünün herba kısmında fenolik ve flavonoid bileşen analizinde 335 nm dalga boyunda elde edilen kromatogram

D. gnidioides bitki türünde kafeik asit, rosmarinik asit, sinapik asit, rutin, klorojenik asit ve ferulik asit belirlenmiştir. Analiz sonuçlarından elde değerler Çizelge 4.15'te ve Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.15. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. gnidioides* bitki türünün farklı kısımlarındaki kafeik asit, rosmarinik asit ve sinapik asit miktarları

Dönem	Kısım		Kafeik asit (mg/kg kuru ağırlık)	Rosmarinik asit (mg/kg kuru ağırlık)	Sinapik asit (mg/kg kuru ağırlık)
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	291,30	58,22	326,52
		2	295,15	57,69	320,69
		3	293,22	57,96	324,29
	Standart sapma		1,93	0,26	2,94
	% RSD		0,66	0,46	0,91
	Yaprak	1	574,10	630,61	258,77
		2	575,16	631,83	258,04
		3	574,63	631,22	258,43
	Standart sapma		0,53	0,61	0,36
	% RSD		0,09	0,01	0,14

Çizelge 4.15'in devamı

Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	4275,98	488,71	124,91
		2	4265,19	487,95	124,90
		3	4265,62	488,33	125,27
	Standart sapma		6,11	0,38	0,21
	% RSD		0,14	0,08	0,17
	Herba	1	2017,74	432,84	187,19
		2	2023,26	446,82	187,46
		3	2020,50	439,83	185,28
	Standart sapma		2,76	6,99	1,19
	% RSD		0,14	1,59	0,64
	Yaprak	1	860,36	332,72	199,26
		2	854,93	338,54	199,82
		3	858,00	335,63	199,45
	Standart sapma		2,72	2,91	0,28
	% RSD		0,32	0,87	0,14
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	156,44	166,04	163,22
		2	155,46	160,63	163,51
		3	155,95	163,34	162,74
	Standart sapma		0,49	2,71	0,39
	% RSD		0,32	1,66	0,24
	Yaprak	1	-	266,69	215,48
		2	-	270,40	213,41
		3	-	268,54	209,46
	Standart sapma		-	1,85	3,06
	% RSD		-	0,69	1,44

Çizelge 4.15'te verilen analiz sonuçları incelendiğinde, *D. gnidioides* bitki türünde kafeik asit, rosmarinik asit ve sinapik asit içeriğinin sırasıyla 155-4268, 58-631 ve 125-323 mg/kg kuru ağırlık aralığında bulunduğu görülmektedir. Bitkinin gelişim dönemine göre üç fenolik bileşeninde miktarlarının oldukça fazla değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Kafeik asit ve rosmarinik asit en fazla çiçeklenme döneminde, sinapik asit ise en fazla çiçeklenme öncesi dönemde belirlenmiştir. Üç bileşen de en az çiçeklenme sonrası dönemde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. gnidioides* bitki türünün farklı kısımlarındaki rutin, klorojenik asit ve ferulik asit miktarları

Dönem	Kısım		Rutin (mg/kg kuru ağırlık)	Klorojenik asit (mg/kg kuru ağırlık)	Ferulik asit (mg/kg kuru ağırlık)
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	306,25	602,39	298,83
		2	308,72	602,63	299,51
		3	304,54	603,06	299,52
	Standart sapma		2,10	0,34	0,40
	% RSD		0,69	0,06	0,13
	Yaprak	1	483,03	1287,49	176,90
		2	480,89	1284,77	177,44
		3	484,68	1288,00	172,48
	Standart sapma		1,90	1,73	2,72
	% RSD		0,39	0,13	1,55
Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	-	1305,10	-
		2	-	1306,45	-
		3	-	1305,78	-
	Standart sapma		-	0,67	-
	% RSD		-	0,05	-
	Herba	1	-	4234,39	-
		2	-	4228,50	-
		3	-	4231,45	-
	Standart sapma		-	2,95	-
	% RSD		-	0,07	-
	Yaprak	1	-	3593,42	-
		2	-	3595,75	-
		3	-	3594,64	-
	Standart sapma		-	1,17	-
	% RSD		-	0,03	-
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	287,91	1833,99	-
		2	282,88	1833,67	-
		3	281,01	1834,90	-
	Standart sapma		3,57	0,64	-
	% RSD		1,26	0,03	-
	Yaprak	1	455,11	3240,34	-
		2	445,90	3243,90	-
		3	447,31	3242,32	-
	Standart sapma		4,96	1,78	-
	% RSD		1,10	0,06	-

D. gnidioides bitki türünde rutin, klorojenik asit ve ferulik asit miktarının sırasıyla 283-482, 602-4231 ve 175-299 mg/kg aralığında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.16). Ferulik asit bitkinin sadece çiçeklenme öncesi döneminde bulunmuştur. Çiçeklenme döneminde rutin bileşeni tespit edilememiş olup, bu dönemde en fazla klorojenik asit bulunmuştur.

Literatür sonuçlarına göre; fenolik bileşen içeriği bitkinin gelişim dönemine, bitkinin kısmına, yıla, iklime, yetiştiği bölgeye, toprak cinsine ve bitkinin güneş görme sıklığı gibi birçok faktöre bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. Ayrıca; fenolik bileşenlerin stabil olmadığı, bozunduğu ya da birbirine dönüştüğü de yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler de bu bilgileri doğrulamaktadır (Allal vd. 2019; Balkan vd. 2016; Büyüktuncel 2013; Cavlak ve Yağmur 2016; Manojlovic vd. 2014; Özden ve Özden 2014; Şengün 2019, Tongur vd. 2018, Veeru vd. 2009, Wiszniewska vd. 2015).

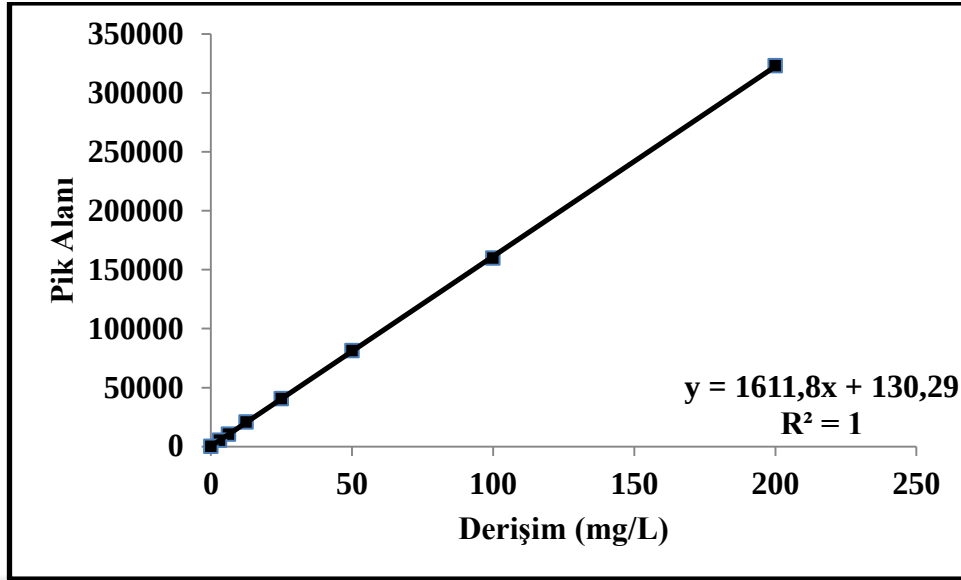
Tongur (2014), *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerini farklı çözücüler ile ekstrakte ederek antioksidan aktivitelerini incelediği çalışmasında; fenolik bileşen içeriğini 12 farklı standart ile HPLC-DAD cihazında belirlemiştir. 7 farklı bileşen (klorojenik asit, şiringik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kersetin, luteolin ve apigenin) varlığını tespit etmiştir.

Tosun (2016), *Daphne* türlerinin kimyasal içeriği ile ilgili yaptığı derleme çalışmasında; *D. genkwa*'nın çiçek ve tomurcuklarında, genkvanin, apigenol, 7-metil-luteolol ve luteolol; *D. bholua*'da genkvanin, *D. gnidium*'in yapraklarında orientin, izoorientin, apigenol, apigenol-7-O-glukozit, luteolol, luteolol-7-O-glukozit, *D. mucronata*'da, karyatin, pakipodol, apigenol ve *D. odora*'nın köklerinde ise apigenol ve luteolol varlığından söz etmiştir.

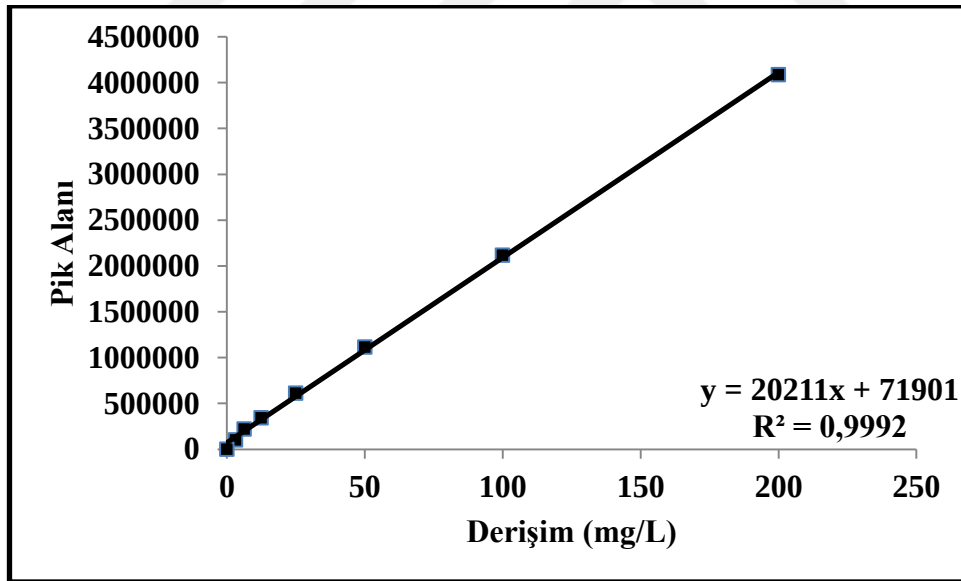
4.2.9. Organik asit bileşen miktarı

Organik asit bileşen miktarı analizlerini gerçekleştirebilmek amacıyla ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerin HPLC cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır.

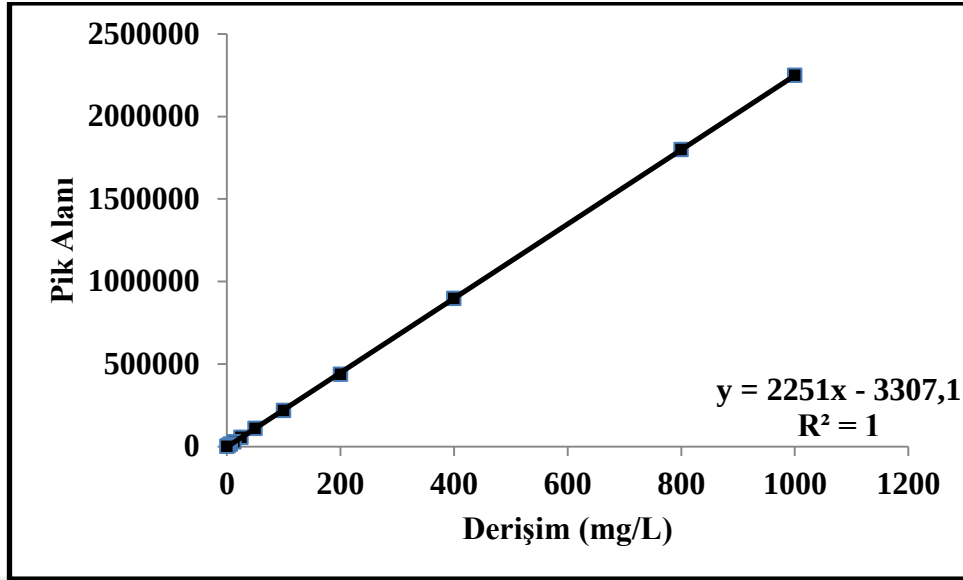
Organik asit bileşen miktarını belirleyebilmek amacıyla malik asit, okzalik asit, sitrik asit, süksinik asit ve tartarik asit olmak üzere 5 farklı standart ile çalışılmıştır. Her bir standart için farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerin her biri için HPLC cihazı kullanılarak pik alanı değerleri belirlenmiştir. Her bir standart için ayrı ayrı derişim değerleri ve pik alanı değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon grafikleri Şekil 4.21-4.25'de gösterilmiştir.



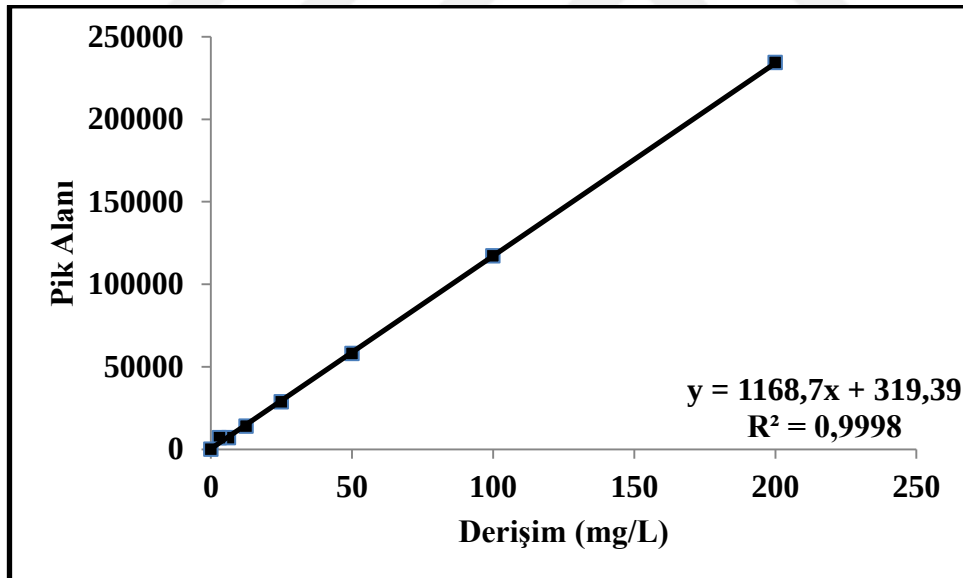
Şekil 4.21. Malik asit kalibrasyon grafiği



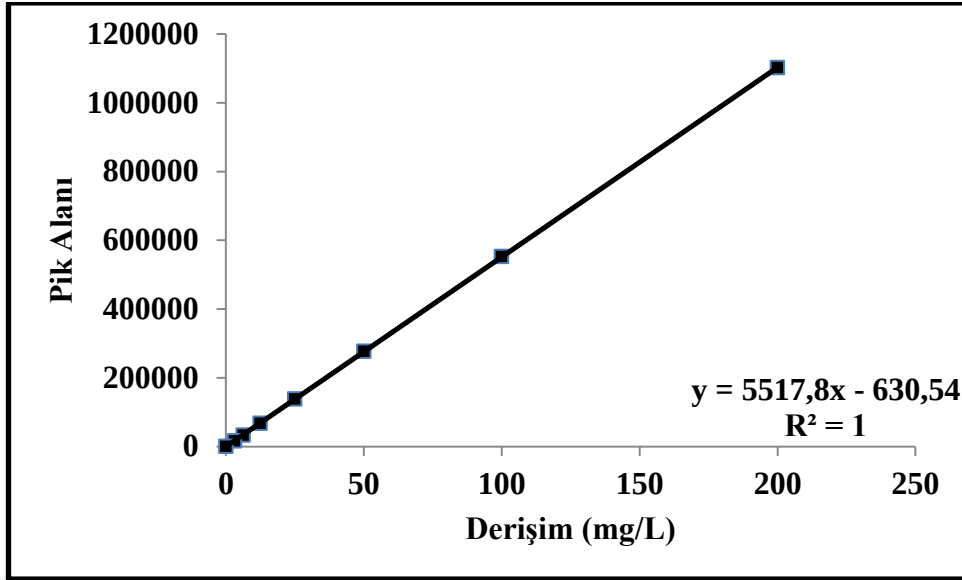
Şekil 4.22. Okzalik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.23. Sitrik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.24. Süksinik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 4.25. Tartarik asit kalibrasyon grafiği

D. sericea bitki türünde, kalibrasyon grafiği çizilen 5 ayrı organik asit bileşeninden hiçbirisi tespit edilememiştir. *D. gnidioides* bitki türünde ise sadece malik asit belirlenmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.17’de verilmiştir.

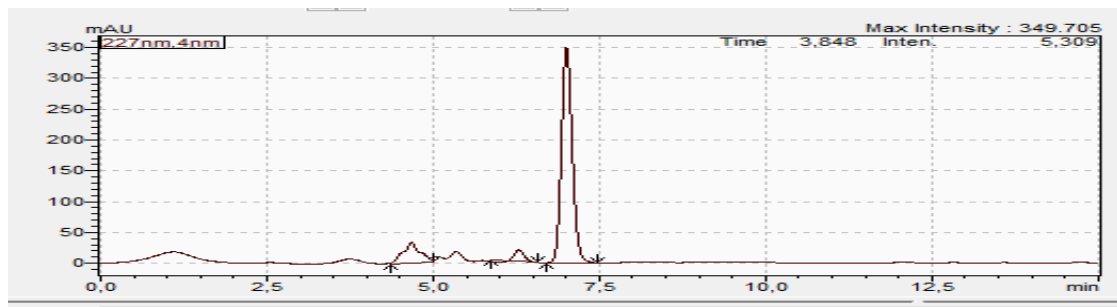
Çizelge 4.17. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. gnidioides* bitki türünün farklı kısımlarındaki malik asit miktarları

Dönem	Kısım	Malik asit miktarı (mg/g kuru ağırlık)
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1
		2
		3
	Standart sapma	
	% RSD	
	Yaprak	1
		2
		3
	Standart sapma	
	% RSD	

Çizelge 4.17'nin devamı

Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	30,008
		2	29,590
		3	29,799
	Standart sapma		0,209
	% RSD		0,702
	Herba	1	30,769
		2	30,932
		3	30,851
	Standart sapma		0,082
	% RSD		0,265
	Yaprak	1	36,626
		2	36,901
		3	36,764
	Standart sapma		0,137
	% RSD		0,374
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	39,664
		2	39,111
		3	39,388
	Standart sapma		0,276
	% RSD		0,702
	Yaprak	1	26,482
		2	26,573
		3	26,527
	Standart sapma		0,046
	% RSD		0,172

Organik asit bileşen miktarını belirleyebilmek amacıyla malik asit, okzalik asit, sitrik asit, süksinik asit ve tartarik asit olmak 5 farklı standart ile çalışılmış, *D. sericea* bitki türünde malik asit, okzalik asit, sitrik asit, süksinik asit ve tartarik asit tespit edilememiştir. *D. gnidioides* bitki türünde ise 25,53-39,38 mg/ g kuru ağırlık aralığında malik asit belirlenmiştir (Şekil 4.26). Malik asit miktarı en fazla çiçeklenme sonrası dönemde ve en az da çiçeklenme öncesi dönemde bulunmuştur (Çizelge 4.17).

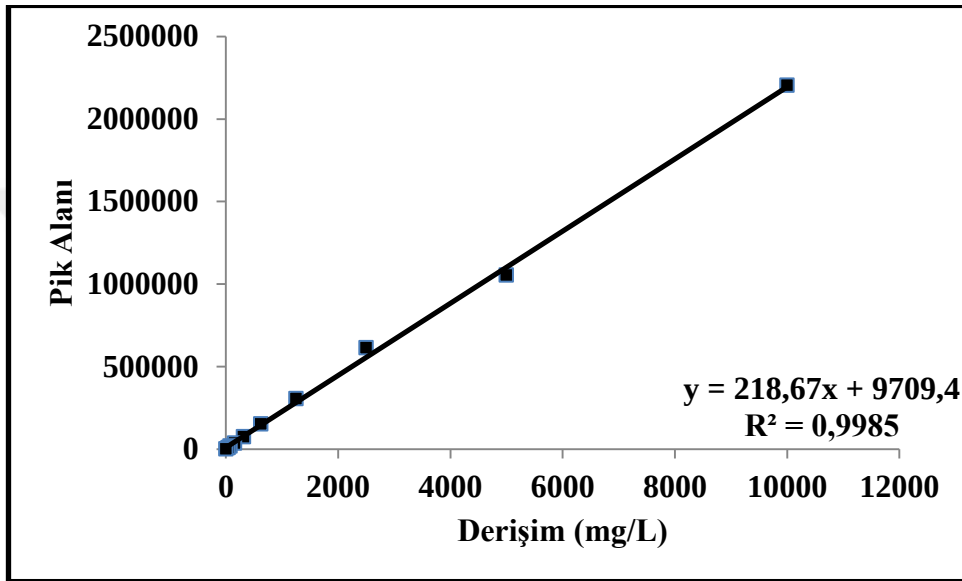


Şekil 4.26. Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. gnidioides* bitki türünün herba kısmına ait organik asit analizinde elde edilmiş kromatogram

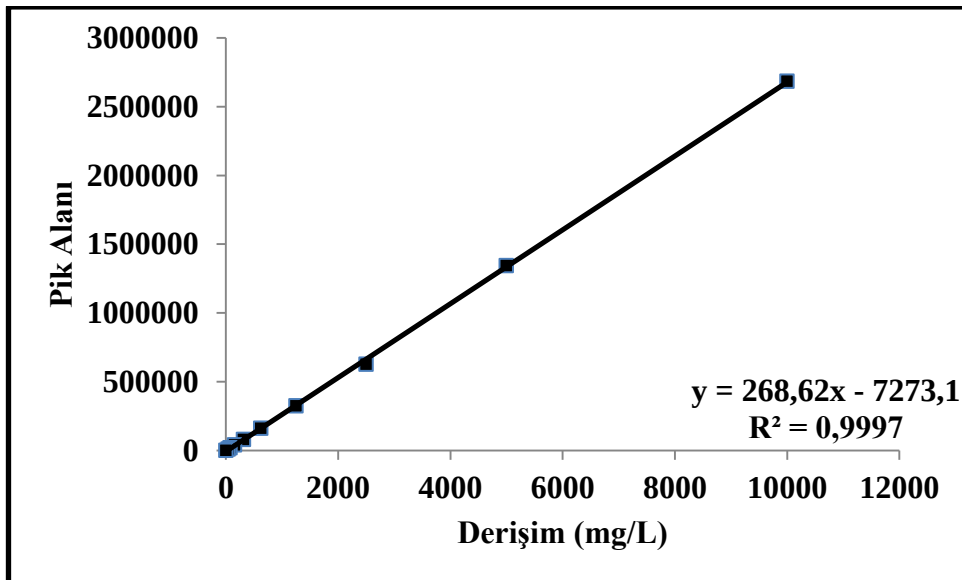
4.2.10. Şeker bileşen miktarı

Şeker bileşen miktarı analizlerini gerçekleştirebilmek amacıyla ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerin HPLC cihazında 3 tekrarlı ölçümleri yapılmıştır.

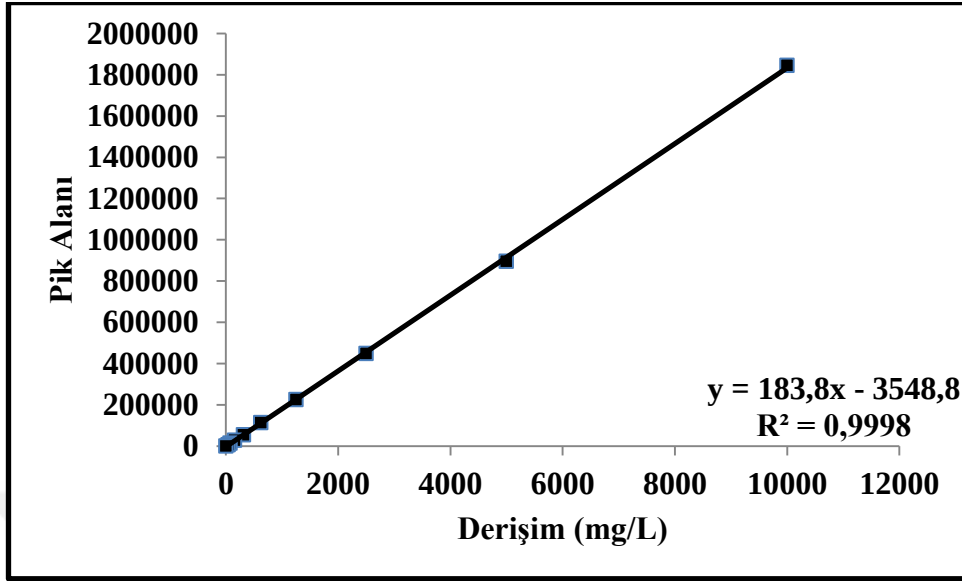
Şeker bileşen miktarını belirleyebilmek amacıyla fruktoz, glukoz ve sakkaroz olmak üzere 3 farklı şeker standardı ile çalışılmıştır. Her bir standart için farklı derişimlerde hazırlanan çözeltilerin herbiri için HPLC cihazı kullanılarak pik alanı değerleri belirlenmiş ve kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.27-4.29’da gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Fruktoz kalibrasyon grafiğı



Şekil 4.28. Glukoz kalibrasyon grafiğı



Şekil 4.29. Sakkaroz kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiği çizilen 3 şeker bileşeninden fruktoz ve sakkaroz her iki bitki türünde de belirlenmemiştir. Her iki bitki türünde de sadece glukoz bileşeni tespit edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki glukoz miktarları

Dönem	Kısım		Glukoz miktarı (mg/g kuru ağırlık)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	5,56	3,36
		2	5,64	3,34
		3	5,58	3,38
	Standart sapma		0,04	0,02
	%RSD		0,74	0,54
	Yaprak	1	5,79	3,03
		2	5,87	2,97
		3	6,00	3,01
	Standart sapma		0,10	0,03
	%RSD		1,76	1,02

Çizelge 4.18'in devamı

Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	5,08	3,04
		2	5,12	2,99
		3	5,21	3,01
	Standart sapma		0,06	0,02
	%RSD		1,29	0,73
	Herba	1	6,50	1,94
		2	6,39	1,92
		3	6,35	1,96
	Standart sapma		0,08	0,02
	%RSD		1,23	0,96
	Yaprak	1	6,58	3,11
		2	6,56	3,14
		3	6,77	3,08
	Standart sapma		0,12	0,03
	%RSD		1,77	0,96
Çiçeklenme sonrası dönemi	Herba	1	7,36	4,90
		2	7,41	4,87
		3	7,40	4,86
	Standart sapma		0,02	0,02
	%RSD		0,34	0,50
	Yaprak	1	6,86	2,24
		2	6,92	2,23
		3	6,96	2,30
	Standart sapma		0,05	0,04
	%RSD		0,67	1,75

Fruktoz şeker bileşeni *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde sırasıyla 5,14-7,39 mg/g kuru ağırlık aralığında ve 1,94-4,87 mg/g kuru ağırlık aralığında belirlenmiştir. *D. sericea* bitki türünde tespit edilen glukoz miktarı, *D. gnidioides* bitki türünde tespit edilenden oldukça fazladır. Her iki bitki türünde de en fazla glukoz miktarı çiçeklenme sonrası dönemde bulunmuştur (Çizelge 4.18).

4.2.11. Toplam sabit yağ verimi

Toplam sabit yağ miktarı analizi sokslet yağ ekstraksiyon cihazında gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3 tekrarlı ölçümler yapılarak toplam yağ miktarı % cinsinden hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinin farklı kısımlarındaki toplam yağ verimi değerleri

Dönem	Kısım		Yağ verimi (%)	
			<i>D. sericea</i>	<i>D. gnidioides</i>
Çiçeklenme öncesi dönem	Herba	1	2,630	2,655
		2	2,610	2,640
		3	2,580	2,700
	Standart sapma		0,025	0,031
	%RSD		0,965	1,170
	Yaprak	1	2,800	2,900
		2	2,890	2,920
		3	2,920	2,980
	Standart sapma		0,062	0,042
	%RSD		2,176	1,419
Çiçeklenme dönemi	Çiçek	1	4,130	0,720
		2	4,260	0,880
		3	4,300	0,750
	Standart sapma		0,089	0,085
	%RSD		2,101	10,857
	Herba	1	4,920	1,840
		2	4,900	1,800
		3	4,880	1,870
	Standart sapma		0,020	0,035
	%RSD		0,408	1,912
	Yaprak	1	2,720	3,040
		2	2,780	3,130
		3	2,820	3,220
	Standart sapma		0,050	0,090
	%RSD		1,815	2,875
Çiçeklenme sonrası dönem	Herba	1	2,510	2,510
		2	2,550	2,550
		3	2,480	2,480
	Standart sapma		0,035	0,035
	%RSD		1,397	1,397
	Yaprak	1	3,040	3,040
		2	2,990	3,100
		3	3,080	3,180
	Standart sapma		0,045	0,070
	%RSD		1,485	2,261

Çizelge 4.19’da verilen analiz sonuçlarına göre, toplam % yağ verimi değerleri *D. sericea* ve *D. gnidioides* bitki türlerinde sırasıyla 2,51-4,90 aralığında ve 0,78-3,13 aralığında tespit edilmiştir.

D. sericea bitki türünde çiçeklenme öncesi ve sonrası dönemlerdeki toplam yağ verimi değerleri birbirine yakın olarak hesaplanmıştır. *D. gnidioides* bitki türünün tersine, *D. sericea* bitki türünde en fazla toplam yağ verimi çiçeklenme döneminde ve çiçek kısmında elde edilmiştir.

D. gnidioides bitki türünde çiçeklenme öncesi ve sonrası dönemde toplam yağ verimi değerleri oldukça yakın iken, çiçeklenme döneminde oldukça az olarak belirlenmiştir. Her üç dönemde de en çok toplam yağ verimi bitkinin yaprak kısmında hesaplanmıştır.

4.2.12. Yağ bileşenleri

Yağ bileşenleri analizi GC-MS cihazında yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen yağ bileşenleri ve bunların relatif yüzde miktarları *D. sericea* bitki türü için Çizelge 4.20’de ve *D. gnidioides* bitki türü için Çizelge 4.21’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. sericea* bitki türünün farklı kısımlarındaki yağ bileşen değerleri

Yağ bileşenleri (g yağ bileşeni/100 g kuru ağırlık)	Çiçeklenme öncesi		Çiçeklenme dönemi			Çiçeklenme sonrası	
	Herba	Yaprak	Çiçek	Herba	Yaprak	Herba	Yaprak
Miristik asit	-	0,56	-	-	-	0,90	0,71
Palmitik asit	13,07	17,10	5,47	7,07	13,93	21,48	19,55
Stearik asit	2,06	1,86	2,00	0,60	1,82	2,47	2,15
Oleik asit	14,12	18,23	57,44	59,19	31,70	11,88	15,52
Pentakosan	-	-	-	-	-	-	0,67
Linoleik asit	5,47	7,73	22,62	24,17	7,74	8,99	7,27
Linolenik asit	7,25	8,54	1,13	1,67	4,49	7,91	8,31
Fitol	3,94	4,87	-	0,70	4,04	10,46	10,43
Araşidik asit	3,11	1,74	1,49	0,54	2,30	3,77	2,14
11-eikosenoik asit	-	-	0,34	0,29	-	-	-
Heksakosan	4,03	3,86	1,79	1,05	3,78	4,37	3,87
Oktakosan	0,95	0,90	0,24	-	-	0,87	0,77
Behenik asit	2,20	0,70	0,76	0,36	0,93	2,46	0,97
Nonakosan	25,94	23,29	4,53	4,02	20,88	20,83	15,95
Siklotetrakosan	9,00	2,30	0,72	-	-	-	-
Lignoserik asit	-	1,8	0,07	-	1,74	-	0,66
1-eikosanol	-	-	-	-	-	-	6,63
Hentriakontan	3,46	3,47	0,42	0,34	1,47	-	-
Tanımlanamayanlar	5,42	3,60	0,99	-	5,18	4,52	5,13

Çizelge 4.20 incelendiğinde, *D. sericea* bitki türünde nonakosan, linoleik asit, palmitik asit ve oleik asit majör yağ bileşenleri olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.21. Farklı gelişim dönemlerinde toplanmış *D. gnidioides* bitki türünün farklı kısımlarındaki yağ bileşen değerleri

Yağ bileşenleri (g yağ bileşeni/100 g kuru ağırlık)	Çiçeklenme öncesi		Çiçeklenme dönemi			Çiçeklenme sonrası	
	Herba	Yaprak	Çiçek	Herba	Yaprak	Herba	Yaprak
Palmitik asit	14,89	9,57	2,43	0,77	-	12,60	14,92
Triakosan	-	-	6,84	1,85	-	-	-
Tetrakosan	-	-	0,95	-	-	-	-
Stearik asit	3,08	1,88	0,73	-	-	1,45	1,85
Oleik asit	21,19	12,21	4,88	-	-	8,05	7,92
Pentakosan	-	1,00	9,63	2,59	2,47	0,69	-
Linoleik asit	23,01	5,83	10,58	-	-	3,67	4,41
Linolenik asit	4,31	3,44	-	-	-	7,28	8,40
Heksatriakontan	-	-	0,96	0,64	0,80	-	-
Fitol	-	2,21	-	4,46	2,55	1,40	1,63
Araşidik asit	3,07	0,88	-	-	-	3,19	1,95
Heksakosan	-	5,87	19,41	6,96	6,98	2,70	2,92
Heptadekan	3,01	-	-	-	-	-	-
1-oktadekanol	-	-	-	0,90	-	-	-
Oktakosan	0,48	1,40	1,66	1,92	2,12	0,84	0,85
Behenik asit	3,73	1,27	-	-	-	4,33	1,83
Nonakosan	20,12	50,90	29,35	51,25	60,59	32,01	32,05
3-eikosen	-	-	-	3,86	-	0,98	-
1-oktadesen	1,46	-	-	-	-	-	-
1-kloroheptakosan	-	-	-	3,01	1,73	1,55	3,25
Lignoserik asit	1,65	-	-	-	-	2,19	1,39
Skualen	-	1,15	1,78	1,59	4,18	2,78	3,25
Triakontan	-	-	2,77	-	-	-	-
1-eikosanol	-	-	2,12	15,68	17,26	14,30	13,37
Hentriakontan	-	-	3,24	-	-	-	-
Tanımlanamayanlar		2,39	2,69	4,52	1,32	-	-

Çizelge 4.21’de verilen analiz sonuçları incelendiğinde, *D. gnidioides* bitki türünde nonakosan, 1-eikosanol, nonakosan, linoleik asit, palmitik asit ve oleik asit en yüksek miktarda belirlenen yağ bileşenleridir.

Zengin vd. (2012), *D. oleoides* subsp. *oleoides* ve *D. sericea* bitki türlerinin yağ bileşenlerini belirledikleri çalışmalarında; her iki bitki türü içinde palmitik asit, linolenik asit, linoleik asit, stearik asit, oleik asit ve vaksenik asidi majör bileşenler olarak tespit etmişlerdir. Uysal vd. (2016) *D. oleoides* bitki türü ile yaptıkları çalışmada, yağ verimini % 0,39 olarak belirlemişlerdir. Farklı iki lokasyondan topladıkları bitki örneğinde nonakosan (% 42,5 ve %27,2) ve heksadekanoik asiti (% 24,4 ve % 20,0) majör bileşenler olarak tanımlamışlardır. Ayrıca; bu çalışmada, *D. pontica* bitki türünün uçucu yağında hekzanhidrofarnesil aseton (% 8,6) ve karvakrol (% 8,5) majör bileşenler olarak tespit edilmiştir.

4.3. Rosmarinik asit analizi için metot optimizasyonu

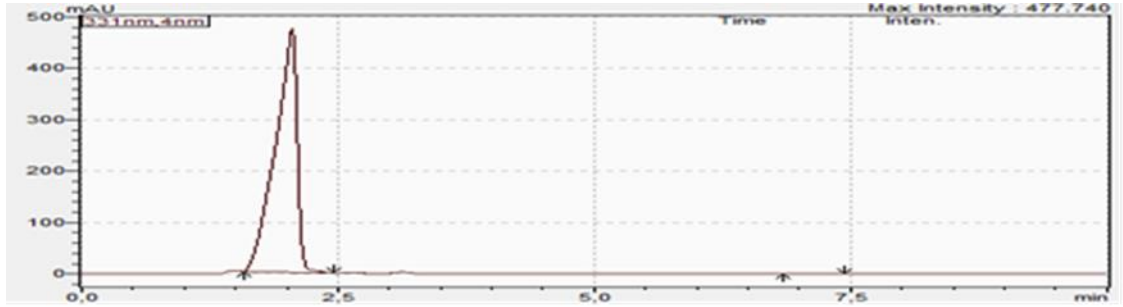
4.3.1. Optimum mobil faz bileşiminin belirlenmesi

Rosmarinik asit tayini için en uygun mobil fazın belirlenebilmesi amacıyla mobil faz olarak metanol (MeOH), asetonitril (ACN) ve su; pH'ı ayarlamak için de asetik asit (AA) ve formik asit (FA) kullanılarak çok sayıda mobil faz bileşimiyle denemeler yapılmıştır. Kullanılan mobil faz bileşimleri Çizelge 4.22'de verilmiştir.

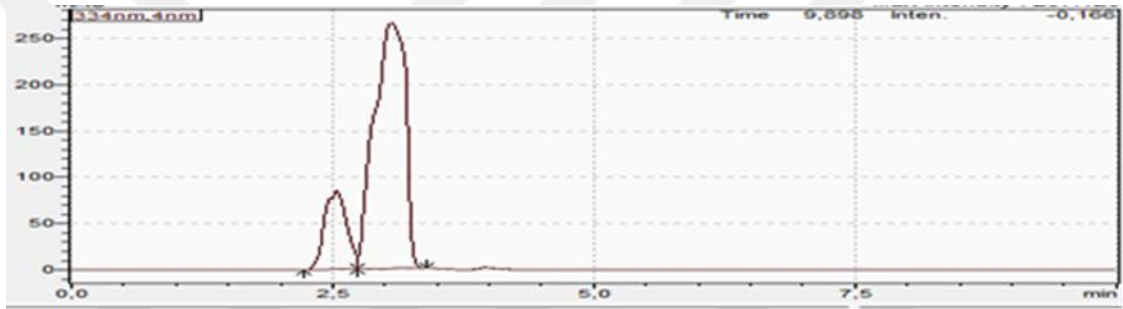
Çizelge 4.22. Kullanılan farklı mobil faz bileşimleri (V/V/V) ve hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri

Mobil faz bileşimi	USP kuyruklanma faktörü	Mobil faz bileşimi	USP kuyruklanma faktörü
ACN/Su (10/90)	YOK	MeOH/Su (70/30)	0,621
ACN/Su (20/80)	0,618	MeOH/Su (80/20)	0,590
ACN/Su (30/70)	0,643	MeOH/Su (90/10)	0,622
ACN/Su (40/60)	0,617	MeOH/Su/AA (40/60/0,1)	1,560
ACN/Su (50/50)	0,654	MeOH/Su/AA (40/60/0,5)	2,050
ACN/Su (60/40)	0,628	MeOH/Su/AA (40/60/1)	1,927
ACN/Su (70/30)	0,654	MeOH/Su/AA (40/60/2)	1,837
ACN/Su (80/20)	0,603	MeOH/Su/AA (50/50/0,5)	1,445
ACN/Su (90/10)	0,712	MeOH/Su/AA (50/50/1)	1,776
ACN/Su/AA (50/50/0,5)	0,622	MeOH/Su/AA (50/50/2)	1,782
ACN/Su/AA (50/50/1)	0,845	MeOH/Su/AA (90/10/0,1)	1,620
ACN/Su/AA (70/30/0,5)	1,339	MeOH/Su/AA (90/10/0,5)	1,279
ACN/Su/AA (70/30/1)	2,662	MeOH/Su/AA (90/10/1)	1,347
ACN/Su/AA (75/25/0,1)	0,938	MeOH/Su/FA (40/60/0,1)	1,095
ACN/Su/AA (75/25/0,5)	0,949	MeOH/Su/FA (40/60/0,5)	2,064
ACN/Su/AA (75/25/1)	1,028	MeOH/Su/FA (40/60/1)	1,217
ACN/Su/AA (75/25/2)	1,018	MeOH/Su/FA (40/60/2)	YOK
ACN/Su/AA (90/10/0,5)	1,288	MeOH/Su/FA (50/50/0,5)	1,814
ACN/Su/AA (90/10/1)	1,286	MeOH/Su/FA (50/50/1)	1,808
ACN/Su/AA (95/50,5)	1,574	MeOH/Su/FA (50/50/2)	1,804
ACN/Su/AA (95/5/1)	1,564	ACN/MeOH (10/90)	1,149
ACN/Su/AA (95/5/2)	1,498	ACN/MeOH (20/80)	4,375
ACN/Su/FA (50/50/0,5)	0,624	ACN/MeOH (30/70)	1,021
ACN/Su/FA (50/50/1)	0,626	ACN/MeOH (40/60)	2,198
ACN/Su/FA (70/30/0,5)	1,607	ACN/MeOH (50/50)	1,537
ACN/Su/FA (70/30/1)	1,542	ACN/MeOH (60/40)	0,640
ACN/Su/FA (75/25/0,1)	0,984	ACN/MeOH (70/30)	0,596
ACN/Su/FA (75/25/0,5)	0,983	ACN/MeOH (80/20)	1,215
ACN/Su/FA (75/25/1)	0,979	ACN/MeOH (90/10)	1,499
ACN/Su/FA (75/25/2)	0,987	ACN/MeOH/AA (10/90/0,5)	1,329
ACN/Su/FA (90/10/0,5)	1,350	ACN/MeOH/AA (10/90/1)	1,304
ACN/Su/FA (90/10/1)	1,331	ACN/MeOH/AA (10/90/2)	1,300
ACN/Su/FA (95/5/0,5)	1,483	ACN/MeOH/AA (50/50/0,5)	1,370
ACN/Su/FA (95/5/1)	1,537	ACN/MeOH/AA (50/50/1)	1,338
ACN/Su/FA (95/5/2)	1,464	ACN/MeOH/AA (50/50/2)	1,328
MeOH/Su (10/90)	YOK	ACN/MeOH/FA (10/90/0,5)	1,291
MeOH/Su (20/80)	YOK	ACN/MeOH/FA (10/90/1)	1,294
MeOH/Su (30/70)	YOK	ACN/MeOH/FA (10/90/2)	1,292
MeOH/Su (40/60)	0,680	ACN/MeOH/FA (50/50/0,5)	1,304
MeOH/Su (50/50)	1,059	ACN/MeOH/FA (50/50/1)	1,298
MeOH/Su (60/40)	0,615	ACN/MeOH/FA (50/50/2)	1,296

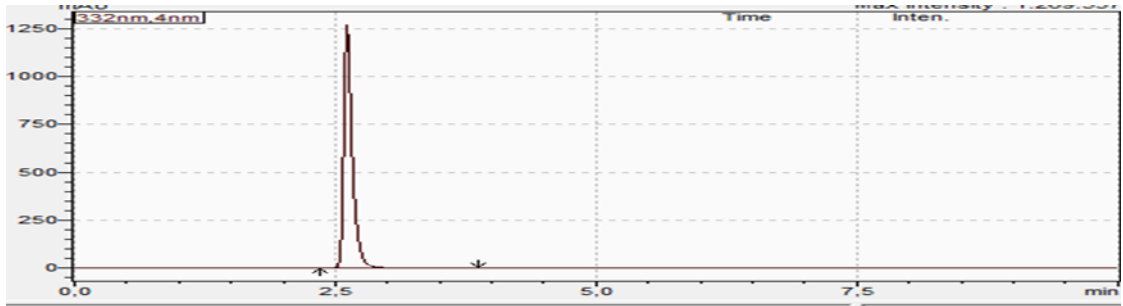
Farklı mobil faz denemelerinde elde edilen kromatogramlar Şekil 4.30-4.44'de gösterilmiştir.



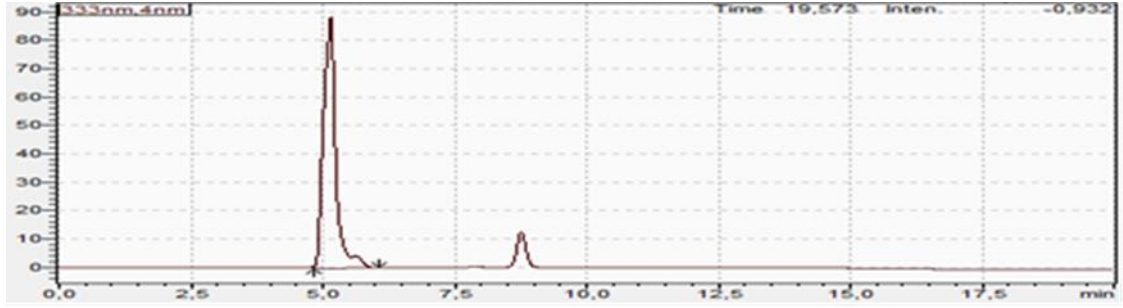
Şekil 4.30. ACN/Su (30/70, V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



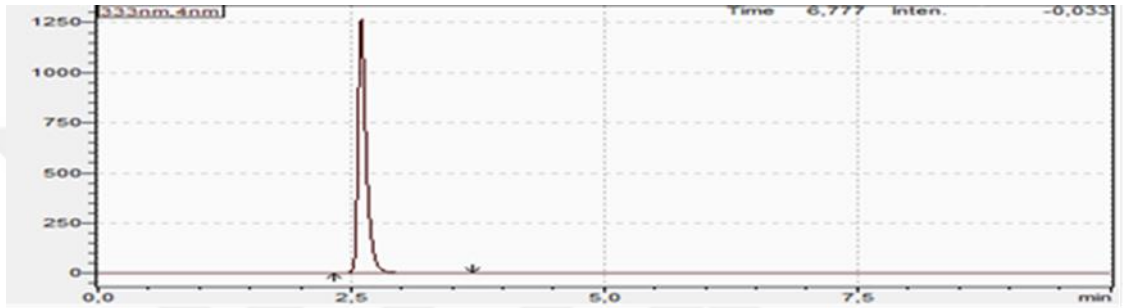
Şekil 4.31. ACN/Su/AA (50/50/1, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



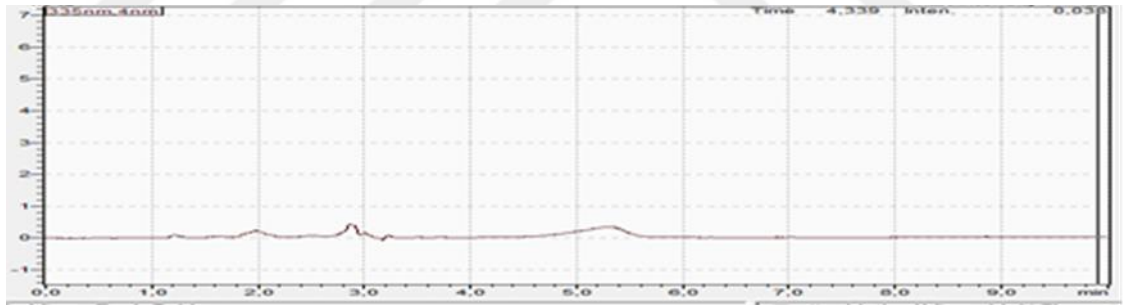
Şekil 4.32. ACN/Su/AA (95/5/2, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.33. ACN/Su/FA (75/25/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



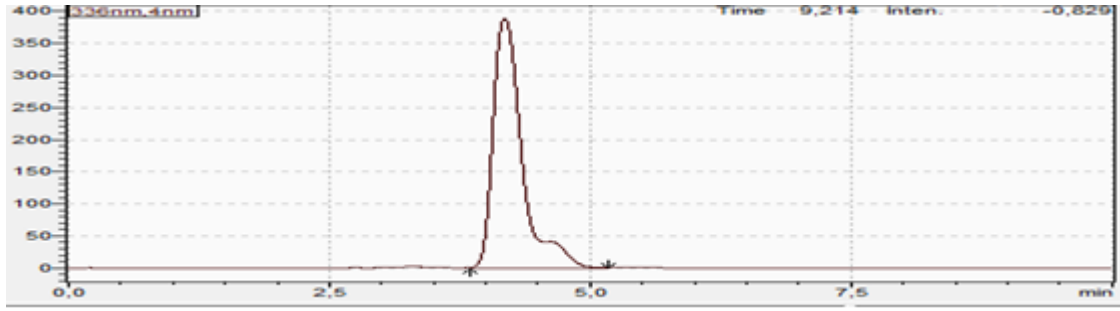
Şekil 4.34. ACN/Su/FA (95/5/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



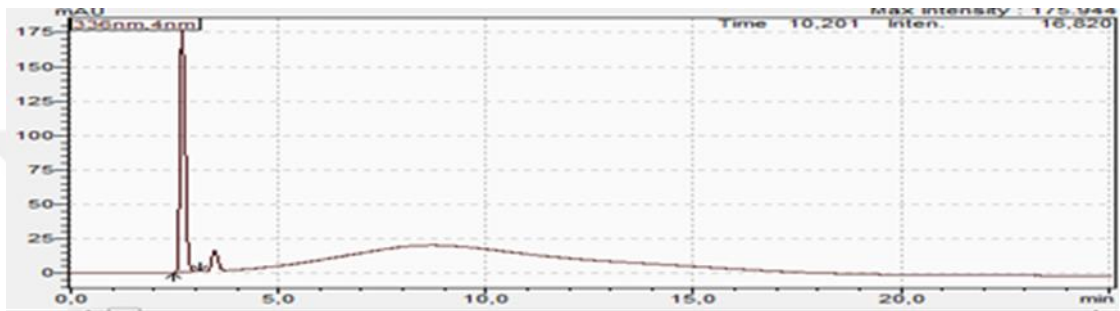
Şekil 4.35. MeOH/Su (10/90, V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



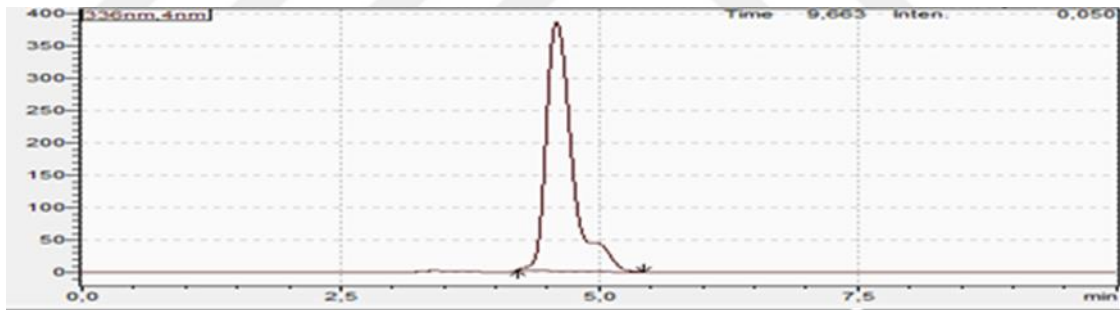
Şekil 4.36. MeOH/Su (60/40, V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



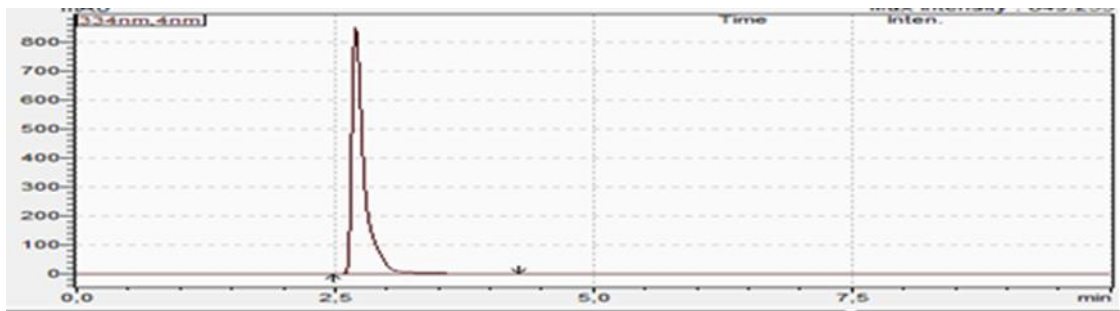
Şekil 4.37. MeOH/Su/AA (50/50/2, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



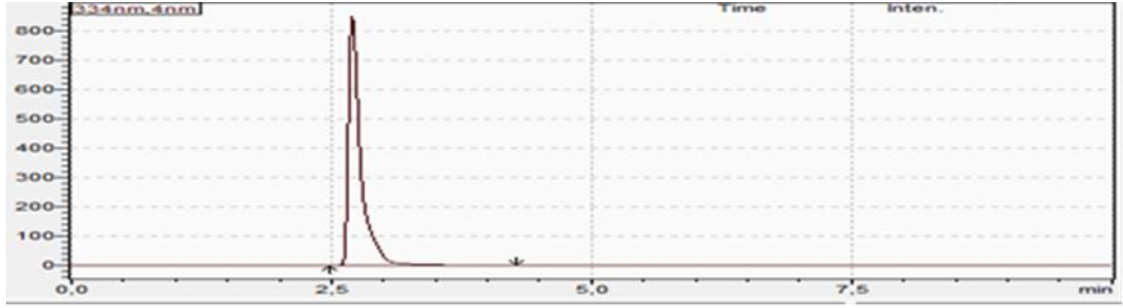
Şekil 4.38. MeOH/Su/AA (90/10/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



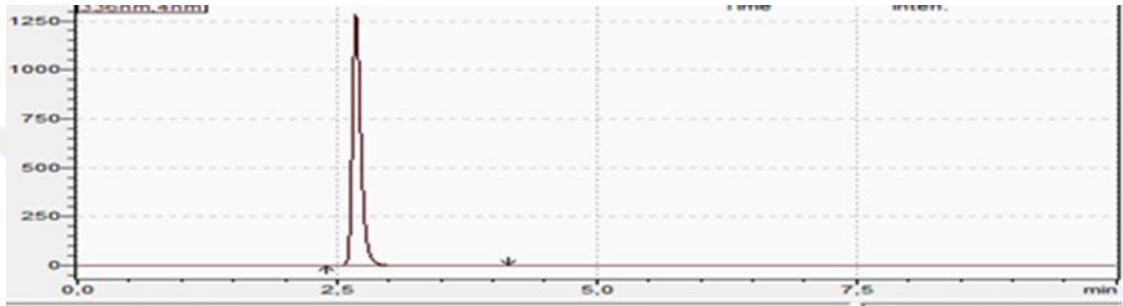
Şekil 4.39. MeOH/Su/FA (50/50/1, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



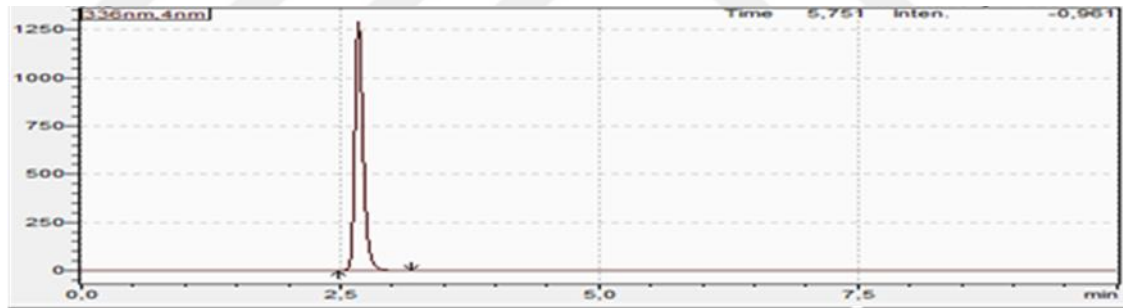
Şekil 4.40. ACN/MeOH (40/60, V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



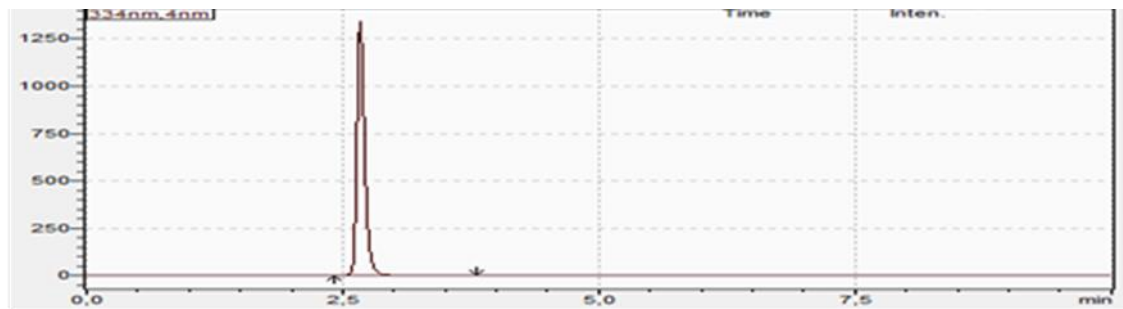
Şekil 4.41. ACN/MeOH (60/40,V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.42. ACN/MeOH/AA (10/90/1,V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.43. ACN/MeOH/FA (10/90/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.44. ACN/MeOH/FA (50/50/1, V/V/V) mobil faz bileşimi kullanıldığında elde edilen kromatogram

Farklı mobil faz bileşimleriyle yapılan deneyler sonucunda elde edilen bazı kromatogramlar incelendiğinde, Şekiller 4.28, 4.30, 4.34, 4.38 ve 4.39’da verilen kromatogramlarda ana piklerde kuyruklanma tespit edilmiştir. Şekiller 4.29, 4.31, 4.35, 4.36 ve 4.37’de verilen kromatogramlardaki piklerde ise bölünme görülmüştür. Şekil 4.33’te verilen kromatogramda herhangi bir pikin elde edilmediği tespit edilmiştir. Şekil 4.40, 4.41 ve 4.42’de verilen pikler düzgündür. En iyi sonuç veren piki tespit edebilmek amacıyla tüm deneylerde piklerin USP kuyruklanma faktörü (TF) değerleri Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır (Snyder vd. 1997).

$$TF = W_{0,005}/2f \quad (4.1)$$

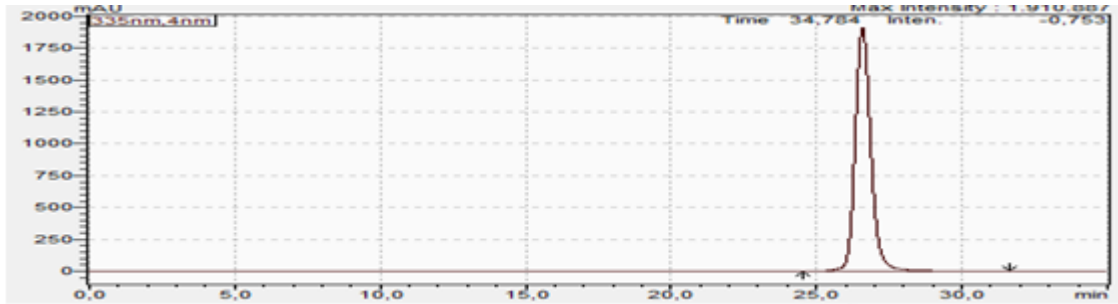
Buradaki TF, asimetri faktörünü; $W_{0,005}$, % 5 pik yüksekliğinde ölçülen pik genişliğini ve f , pikin başlangıç noktası ile pik yüksekliğinin maksimum olduğu noktanın izdüşümü arasındaki uzaklığı ifade etmektedir.

Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri Çizelge 4.22’de verilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre USP kuyruklanma faktörü değerinin en düşük olduğu Şekil 4.41’de kromatogramı verilen ACN/MeOH/FA (10/90/0,5, V/V/V) mobil faz bileşimi optimum mobil faz olarak seçilmiştir.

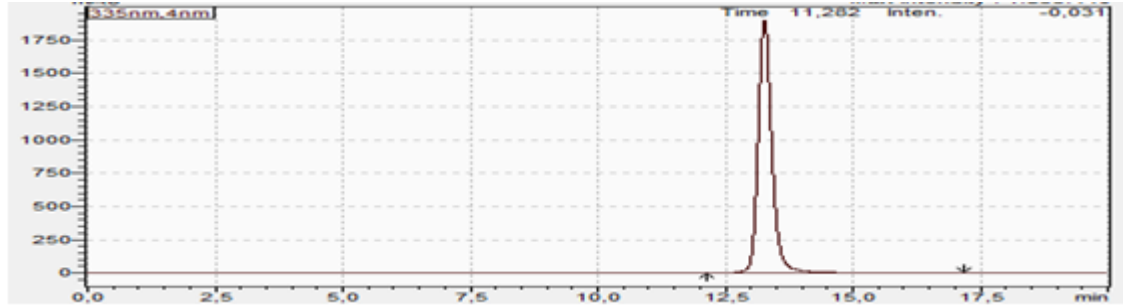
Bernatoniene vd. (2016); rosmarinik asit analizinde, mobil faz (A) MeOH ve mobil faz (B) hacimce % 0,5’lik AA çözeltisini kullanmışlardır. Oliveira vd. (2016); mobil faz (A) MeOH ve mobil faz (B) hacimce % 1’lik AA çözeltisini, Sik vd. (2020), mobil faz (A) MeOH, mobil faz (B) hacimce % 0,25’lik trifloro asetik asit çözeltisi ve mobil faz (C) suyu kullanmışlardır. Tepe ve Sökmen (2007); mobil faz (A) hacimce %2’lik AA ve mobil faz (B) hacimce %2’lik AA-ACN kullanmışlardır. Yapılan literatür çalışmalarında rosmarinik asit analizlerinde genellikle gradient elüsyon kullanıldığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise izokratik akış programı kullanılmıştır. Bu durum göz önüne alındığında ve kullanılan mobil faz bileşenleri incelendiğinde, birebir aynı sonuç elde edilmemesine rağmen; elde edilen sonuçların literatür çalışmaları ile uyumlu olduğu değerlendirilmiştir.

4.3.2. Optimum akış hızının belirlenmesi

Optimum akış hızının belirlenmesi için Çizelge 4.23’te verilen 22 farklı akış hızı denenmiştir. Tüm akış hızı deneylerinde; bir önceki bölümde belirlenen optimum mobil faz ACN/MeOH/FA (10/90/0,5, V/V/V) kullanılmıştır. Farklı akış hızlarında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.45-4.54’de gösterilmiştir.



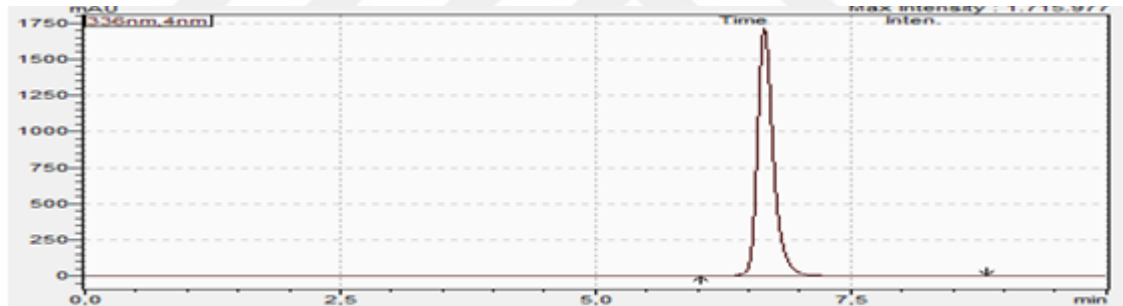
Şekil 4.45. 0,10 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.46. 0,20 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



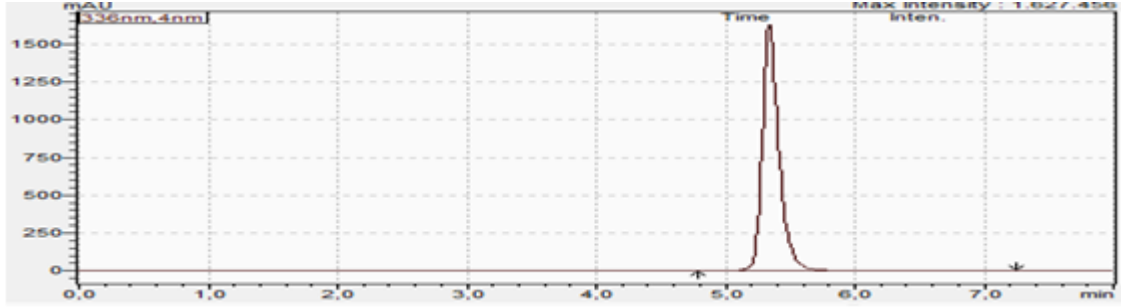
Şekil 4.47. 0,30 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



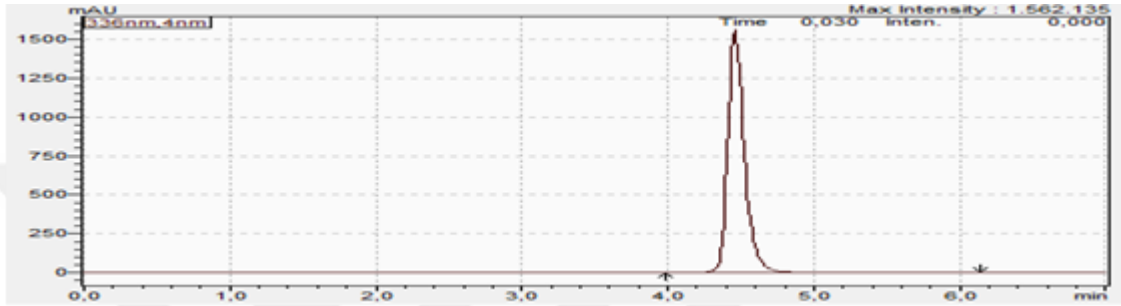
Şekil 4.48. 0,40 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



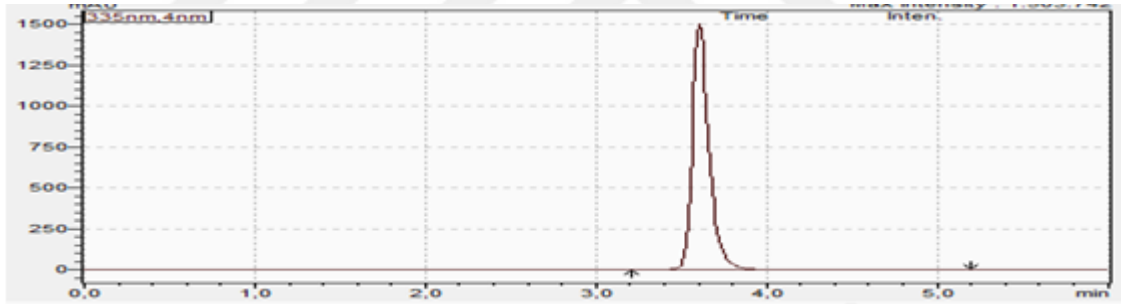
Şekil 4.49. 0,45 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



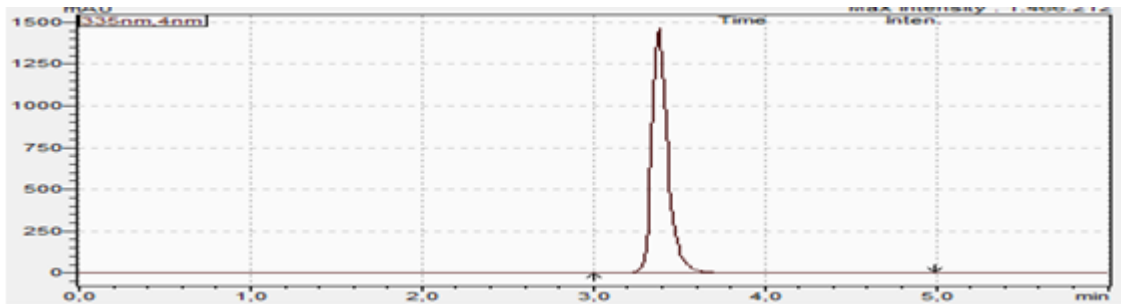
Şekil 4.50. 0,50 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



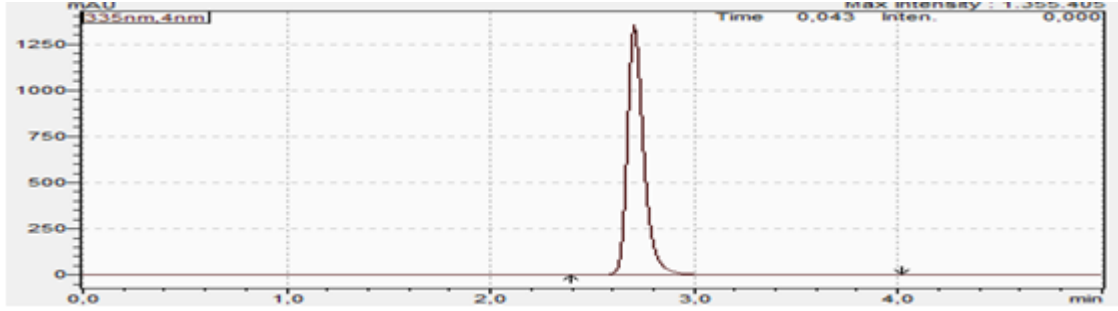
Şekil 4.51. 0,65 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.52. 0,75 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.53. 0,80 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.54. 1,00 mL/dk akış hızı kullanıldığında elde edilen kromatogram

En uygun akış hızını belirleyebilmek için teorik tabaka yüksekliği (H) değerleri aşağıda yer alan Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır (Tandoğan, 2012).

$$H = (L/N) \quad (4.2)$$

Eşitlikteki L , kullanılan kolonunun uzunluğunu ve N , teorik tabaka sayısını ifade etmektedir.

Teorik tabaka sayısı N 'yi hesaplamak için Eşitlik 4.3'ten yararlanılmıştır.

$$N = 16 (t_r/w_b)^2 \quad (4.3)$$

Burada t_r , alıkonma zamanını ve w_b , pik taban genişliğini belirtmektedir.

Kullanılan akış hızlarına göre alıkonma zamanı ve hesaplanan teorik tabaka yüksekliği değerleri Çizelge 4.23'te verilmiştir.

Çizelge 4.23. Kullanılan akış hızlarına göre alıkonma zamanı ve hesaplanan teorik tabaka yüksekliği değerleri

No	Akış Hızı (mL/dk)	t_r (dk)	H	No	Akış Hızı (mL/dk)	t_r (dk)	H
1	0,10	26,63	1,14	12	0,65	4,12	4,03
2	0,15	17,68	1,67	13	0,70	3,87	4,35
3	0,20	13,27	2,26	14	0,75	3,61	4,83
4	0,25	10,63	2,26	15	0,80	3,38	4,94
5	0,30	8,86	2,39	16	0,85	3,19	5,39
6	0,35	7,60	2,67	17	0,90	3,01	5,73
7	0,40	6,66	2,71	18	0,95	2,85	6,12
8	0,45	5,93	3,03	19	1,00	2,71	5,93
9	0,50	5,34	3,41	20	1,25	2,18	6,96
10	0,55	4,86	3,67	21	1,50	1,82	9,07
11	0,60	4,46	3,66	22	2,00	1,39	10,84

Çizelge 4.23'te verilen alıkonma zamanı, teorik tabaka yüksekliği değerleri ve pik şeklinin düzgünlüğü göz önüne alınarak optimum akış hızı 0,40 mL/dk olarak belirlenmiştir.

Bernatoniene vd. (2016), Oliveira ve Oliveira (2013), Tepe ve Sökmen (2007), Sik vd. (2020), yaptıkları çalışmalarda akış hızını 1,00 mL/dk olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmalarda gradient elüsyon kullanılmış olması ve bu çalışmada ise izokratik akış kullanılması elde edilen bu farklılığı açıklamaktadır.

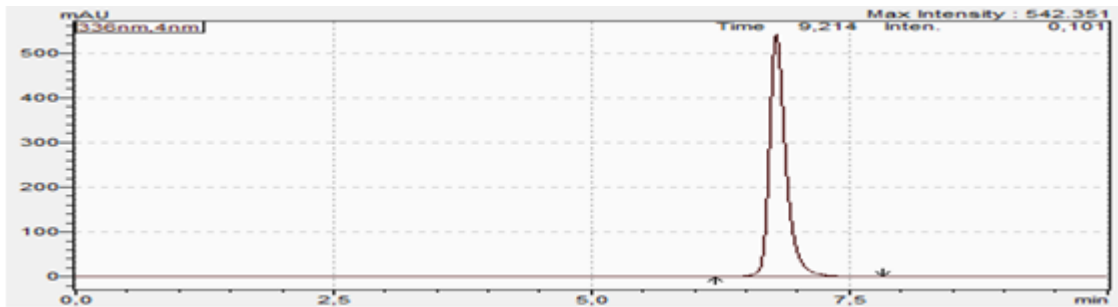
4.3.3. Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi

Optimum kolon sıcaklığının belirlenmesi için Çizelge 4.24'de verilen 14 farklı kolon sıcaklığı denenmiştir. Tüm kolon sıcaklığı denemelerinde daha önceki kısımlarda belirlenen optimum mobil faz ACN/MeOH/FA (10/90/0,5, V/V/V) ve optimum akış hızı (0,4 mL/dk) parametreleri kullanılmıştır.

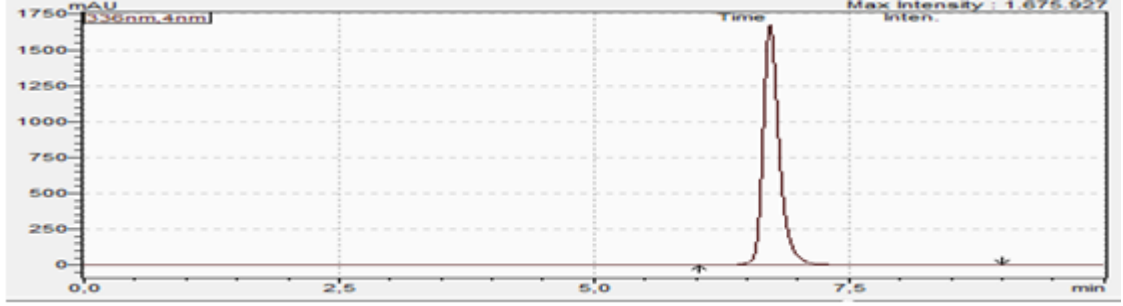
Çizelge 4.24. Çalışılan farklı kolon sıcaklıklarında hesaplanan pik alanları ve USP kuyruklanma faktörü değerleri

No	Sıcaklık (°C)	Pik alanı	USP	No	Sıcaklık (°C)	Pik alanı	USP
1	15	6969373	1,38	8	50	10118552	1,40
2	20	14242887	1,35	9	55	6369309	1,40
3	25	18550771	1,35	10	60	7335521	1,41
4	30	18570182	1,35	11	65	7952975	1,41
5	35	9384170	1,35	12	70	10049832	1,40
6	40	9717813	1,35	13	75	10081908	1,40
7	45	8862309	1,36	14	80	9511719	1,41

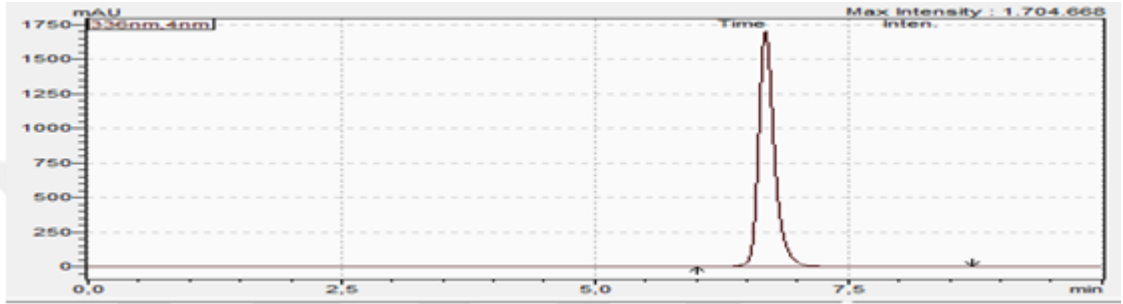
Farklı kolon sıcaklıklarında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.55-4.64'de gösterilmiştir.



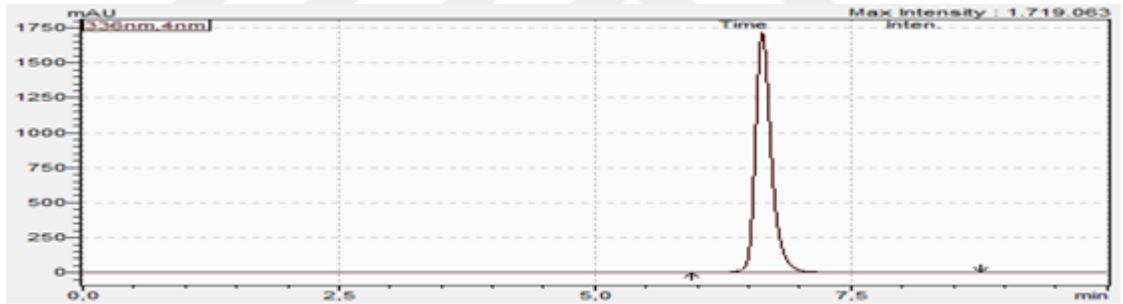
Şekil 4.55. 15 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



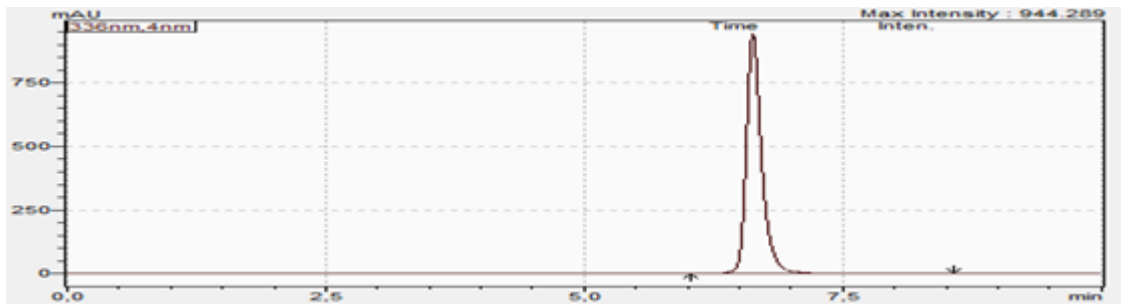
Şekil 4.56. 20 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



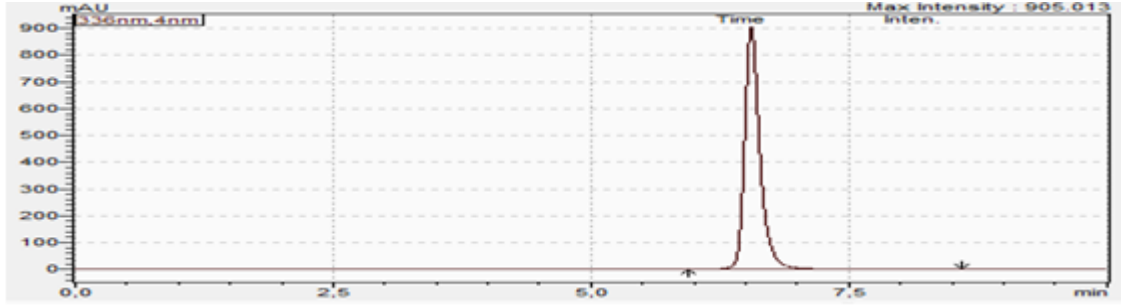
Şekil 4.57. 25 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



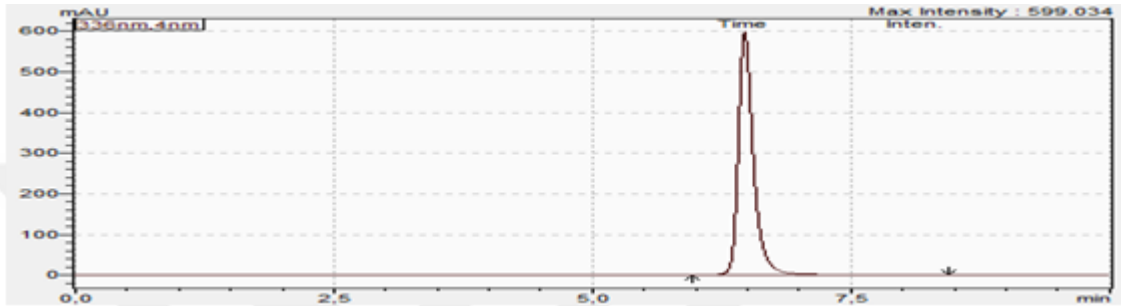
Şekil 4.58. 30 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



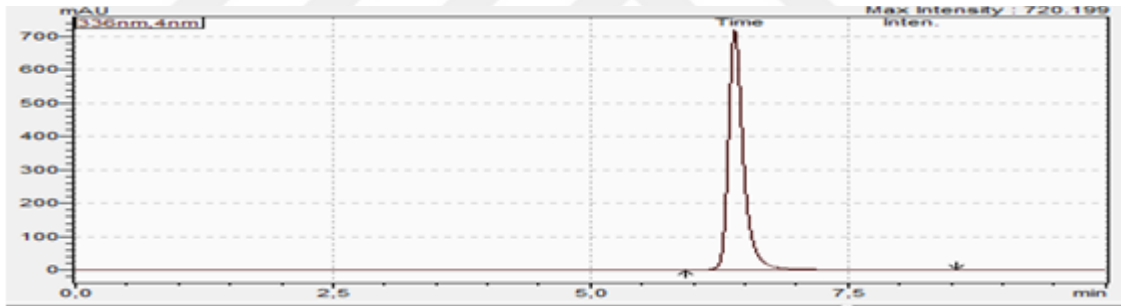
Şekil 4.59. 40 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



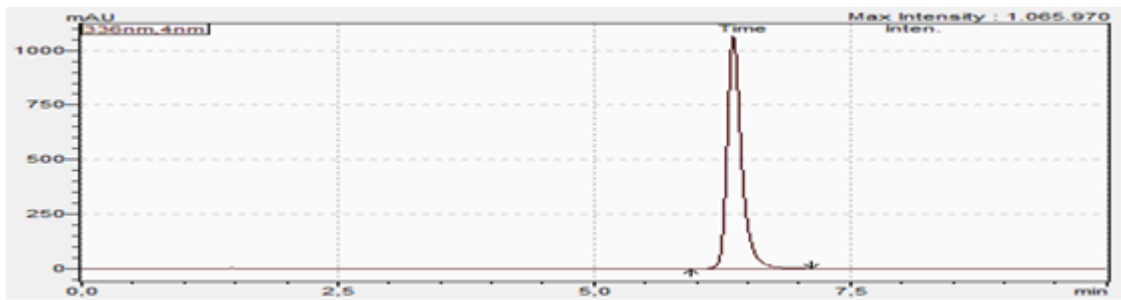
Şekil 4.60. 45 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



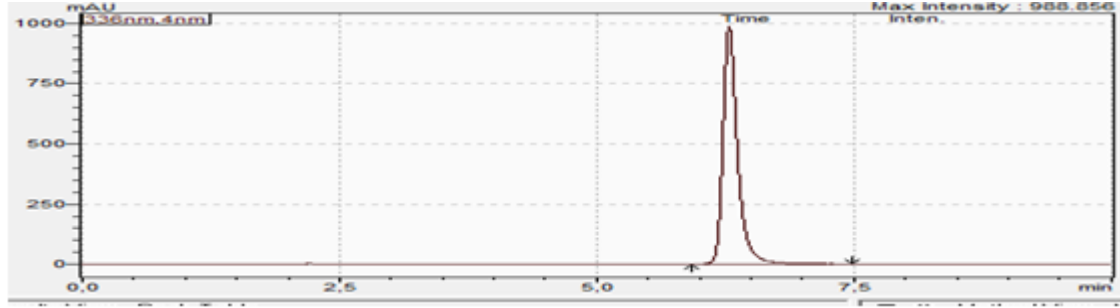
Şekil 4.61. 55 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.62. 65 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.63. 70 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.64. 80 °C kolon sıcaklığı kullanıldığında elde edilen kromatogram

Çizelge 4.24’te verilen pik alanları, kuyruklanma faktörü değerleri ve pik şeklinin düzgünlüğü göz önüne alınarak optimum kolon sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir.

Literatür çalışmalarında, rosmarinik asit tayini için kolon sıcaklığı olarak genellikle düşük sıcaklıklar tercih edilmiştir. Kolon sıcaklığı olarak Oliveira ve Oliveira (2013) 25 °C’yi, Oliveira vd. (2016) 30 °C’yi ve Sik vd. (2020) 35 °C’yi seçmişlerdir. Çalışma sonucunda belirlenen optimum kolon sıcaklığı değeri, literatürde bulunan değerler ile uyumludur.

4.3.4. Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi

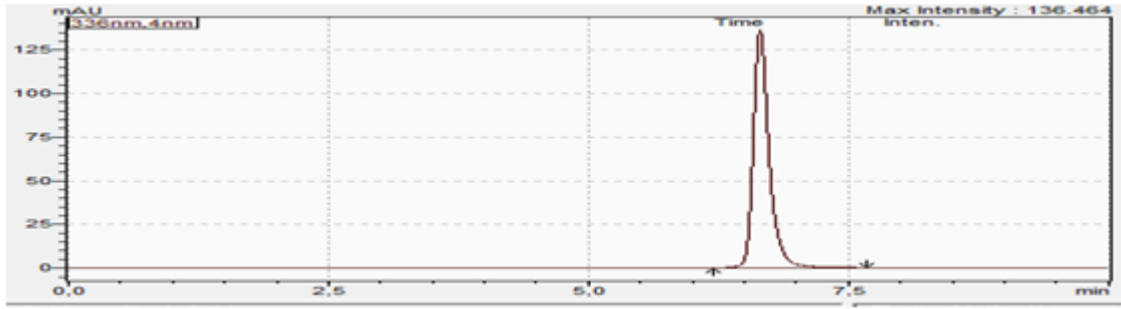
Optimum enjeksiyon hacminin belirlenmesi için Çizelge 4.25’te verilen 10 farklı enjeksiyon hacmi denenmiştir. Tüm enjeksiyon hacmi denemelerinde daha önceki kısımlarda belirlenen optimum mobil faz ACN/MeOH/FA (10/90/0,5, V/V/V), optimum akış hızı (0,4 mL/dk) ve optimum kolon sıcaklığı (30 °C) parametreleri kullanılmıştır.

Kullanılan farklı enjeksiyon hacimlerine göre hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri Çizelge 4.25’te gösterilmiştir.

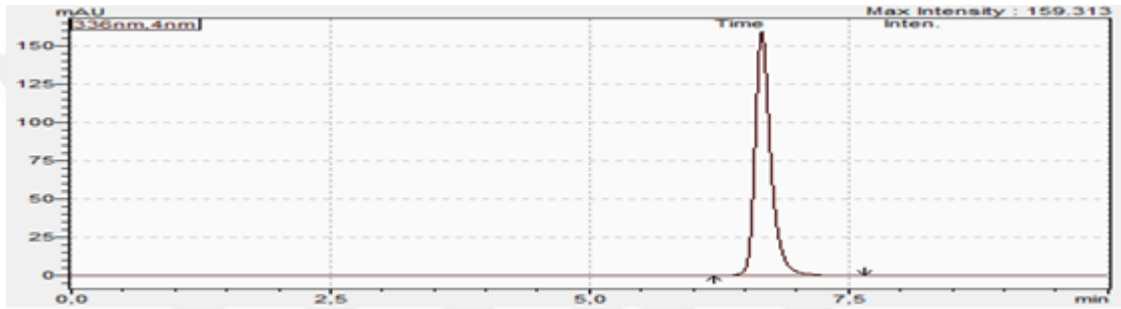
Çizelge 4.25. Kullanılan farklı enjeksiyon hacimlerine göre hesaplanan USP kuyruklanma faktörü değerleri

No	Enjeksiyon hacmi (µL)	USP
1	4	1,39
2	6	1,38
3	8	1,37
4	10	1,37
5	15	1,37
6	20	1,39
7	25	1,40
8	30	1,45
9	35	1,59
10	40	1,52

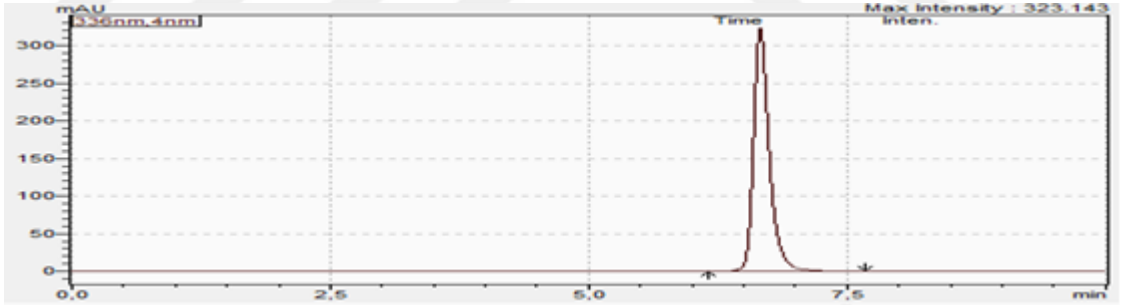
Farklı enjeksiyon hacimlerinde elde edilen kromatogramlar Şekil 4.65-4.74’de gösterilmiştir.



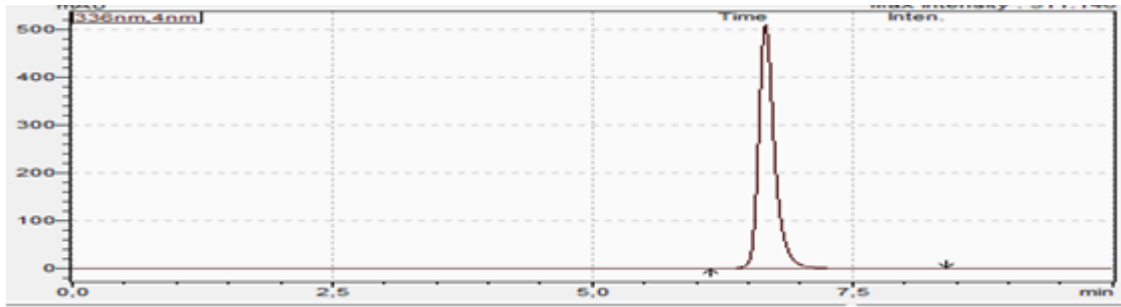
Şekil 4.65. 2 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



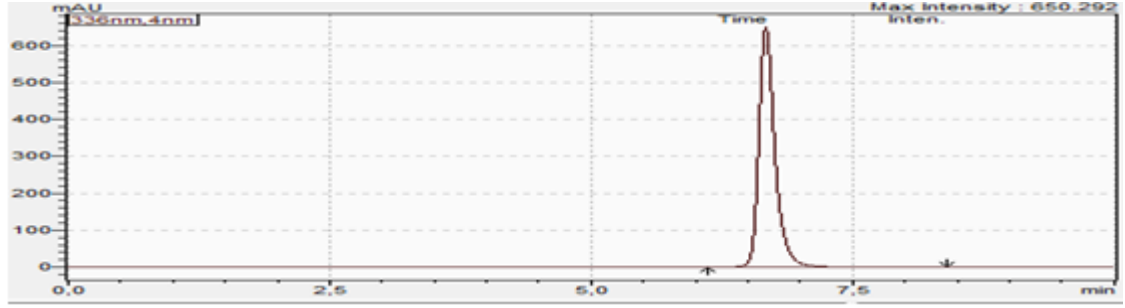
Şekil 4.66. 4 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



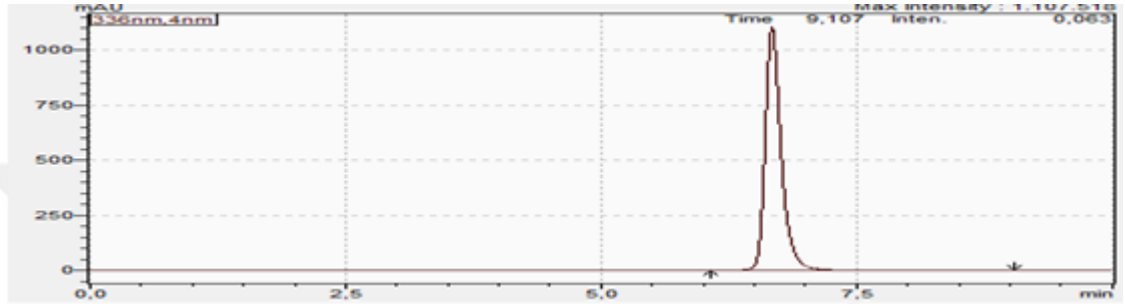
Şekil 4.67. 6 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



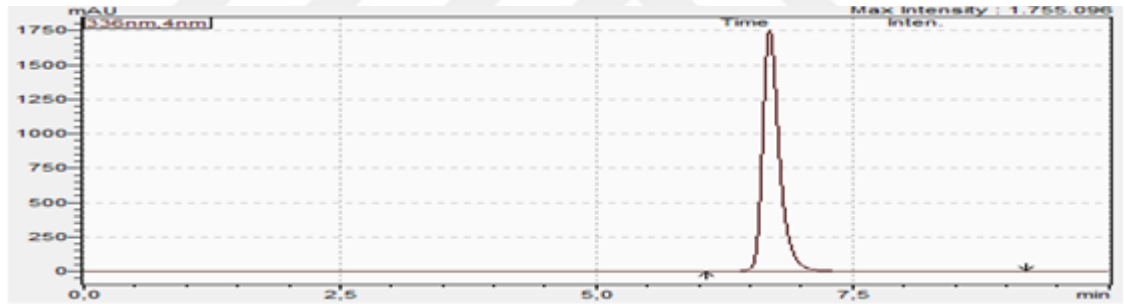
Şekil 4.68. 8 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



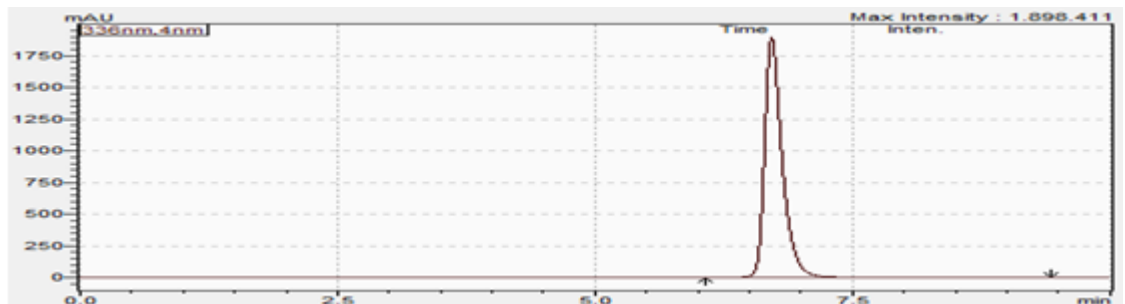
Şekil 4.69. 10 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



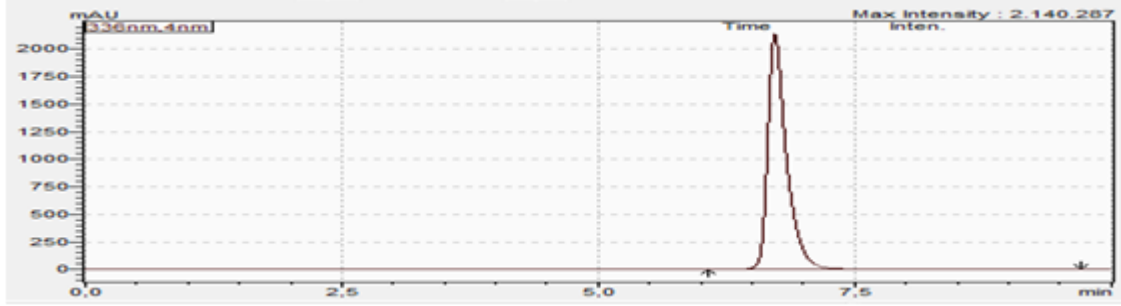
Şekil 4.70. 15 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



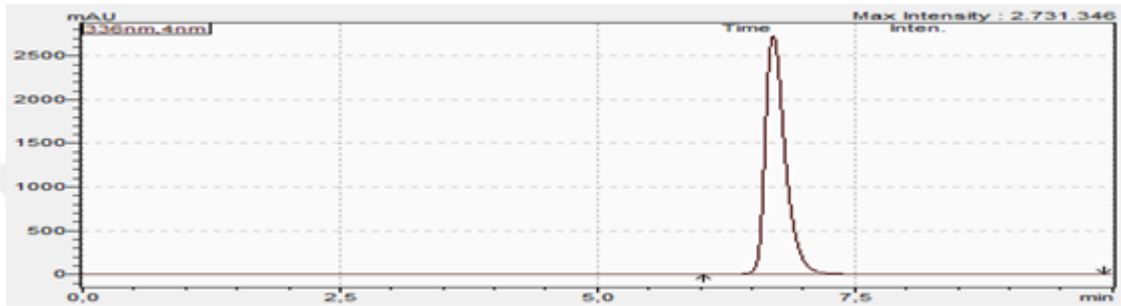
Şekil 4.71. 25 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.72. 30 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.73. 35 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram



Şekil 4.74. 40 µL enjeksiyon hacmi kullanıldığında elde edilen kromatogram

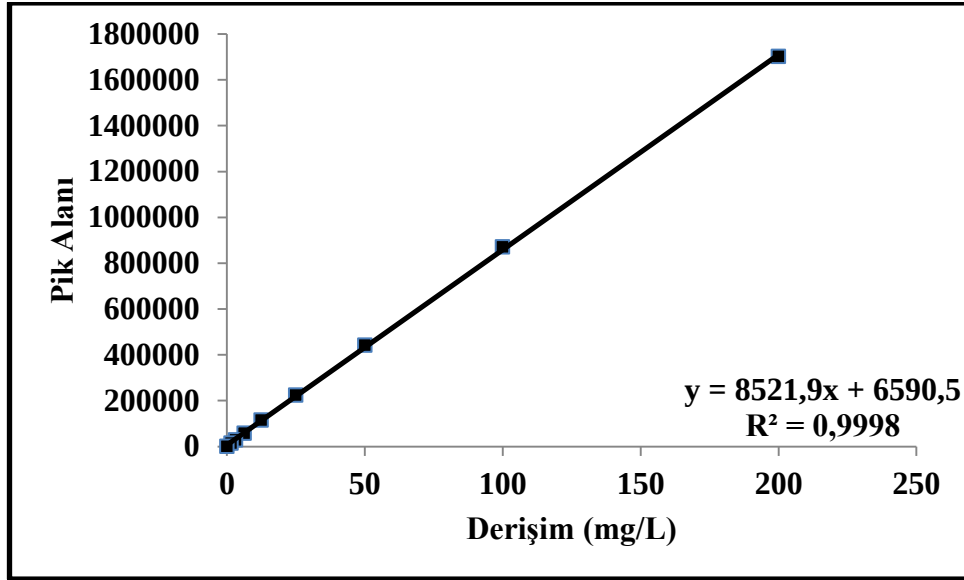
Yapılan enjeksiyon hacmi denemelerinde en düşük kuyruklanma faktörü değeri ve pik şekli göz önüne alınarak 10 µL'lik enjeksiyon hacmi optimum değer olarak seçilmiştir.

Literatür çalışmalarında rosmarinik asit tayini için enjeksiyon hacmi olarak Bernatoniene vd. (2016) 10 µL'yi, Oliveira vd. (2016) 20 µL'yi ve Sik vd. (2020) ise 2 µL'yi kullanmışlardır. Çalışma sonucunda belirlenen optimum enjeksiyon hacmi değeri, literatürde bulunan değerler ile aynı olmamasına rağmen, uyumlu bulunmuştur.

4.4. Rosmarinik Asit Analizi İçin Metot Validasyonu

4.4.1. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi

Rosmarinik asitin analiz metodunun doğrusallık parametresini belirlemek için 1 mg/L, 3 mg/L, 6 mg/L, 12 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L ve 200 mg/L olmak üzere 8 farklı derişimde rosmarinik asit standart çözeltisi kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Doğrusallık parametresinin belirlenmesi aşamasında yapılan çalışmalar 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.75'de verilmiştir.



Şekil 4.75. Rosmarinik asit tayini için hazırlanmış kalibrasyon grafiği

Rosmarinik asit tayini için çizilmiş olan kalibrasyon grafiğinde oldukça yüksek bir korelasyon (R^2) değeri ($R^2 = 0,9998$) elde edilmiştir.

4.4.2. Doğruluk parametresinin belirlenmesi

Doğruluk parametresini belirleyebilmek için hazırlanan 8 farklı derişimdeki rosmarinik asit standart çözeltisi HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir derişim için yapılan üç tekrarlı enjeksiyon sonunda ortalama pik alanı, ortalama derişim ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.26. Doğruluk parametresi verileri

Derişim (mg/L)	Ortalama pik alanı (n=3)	Ortalama derişim (mg/L) (n=3)	% Geri kazanım
200	1739443	203,42	101,71
100	887604	103,35	103,35
50	451315	52,09	104,18
25	241471	27,44	109,76
12	117486	12,87	107,28
6	60425	6,17	102,84
3	30271	2,63	87,59
1	15915	0,94	94,13
Ortalama (n=7)			101,36
Standart sapma			7,19
% RSD			7,09

Doğruluk parametresi analizleri sonucunda ortalama geri kazanım değeri % 101,36 olarak hesaplanmıştır. İlgili yasal mevzuatta ya da metot performans verilerinde aksi bir durum belirtilmedikçe, geri kazanım değerlerinin % 70 ile % 120 aralığında değişim göstermesi başarılı bir sonuç olarak kabul edilmektedir (SANCO 2011). Bu çalışmada elde edilen geri kazanım değeri, optimize edilen metodumuzun doğruluğunu kanıtlamaktadır.

4.4.3. Kesinlik parametresinin belirlenmesi

Rosmarinik asit analiz metodunun gün içi kesinlik parametresini belirlemek için düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı derişimde standart çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan 3 farklı derişimdeki rosmarinik asit standart çözeltileri gün içinde farklı saatlerde HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir derişim için ortalama pik alanı ve alıkonma zamanı belirlenmiştir. Gün içi kesinlik parametresi verileri 1. gün için Çizelge 4.27’de, 2. gün için Çizelge 4.28’de ve 3. gün için Çizelge 4.29’da verilmiştir.

Çizelge 4.27. Gün içi kesinlik parametresi verileri (1. Gün)

1.gün	Enjeksiyon numarası	Pik alanı	Alıkonma zamanı (dk)
Yüksek derişim (200 mg/L)	1. Enjeksiyon	1747455	6,637
	2. Enjeksiyon	1735882	6,653
	3. Enjeksiyon	1727434	6,662
Standart sapma		10051	0,013
% RSD		0,579	0,192
Orta derişim (25 mg/L)	1. Enjeksiyon	293222	6,645
	2. Enjeksiyon	290560	6,657
	3. Enjeksiyon	299585	6,666
Standart sapma		4638	0,011
% RSD		1,575	0,161
Düşük derişim (3 mg/L)	1. Enjeksiyon	30300	6,648
	2. Enjeksiyon	30217	6,661
	3. Enjeksiyon	30121	6,667
Standart sapma		89,79	0,010
% RSD		0,297	0,146

Çizelge 4.28. Gün içi kesinlik parametresi verileri (2. Gün)

2.gün	Enjeksiyon numarası	Pik alanı	Alıkonma zamanı (dk)
Yüksek derişim (200 mg/L)	1. Enjeksiyon	1748019	6,643
	2. Enjeksiyon	1719479	6,655
	3. Enjeksiyon	1737935	6,667
Standart sapma		14473	0,012
% RSD		0,834	0,175
Orta derişim (25 mg/L)	1. Enjeksiyon	290886	6,651
	2. Enjeksiyon	297175	6,661
	3. Enjeksiyon	295429	6,670
Standart sapma		3246	0,010
% RSD		1,102	0,148
Düşük derişim (3 mg/L)	1. Enjeksiyon	30939	6,656
	2. Enjeksiyon	30829	6,665
	3. Enjeksiyon	30699	6,669
Standart sapma		120	0,007
% RSD		0,390	0,102

Çizelge 4.29. Gün içi kesinlik parametresi verileri (3. Gün)

3.gün	Enjeksiyon numarası	Pik alanı	Alıkonma zamanı (dk)
Yüksek derişim (200 mg/L)	1. Enjeksiyon	1753107	6,643
	2. Enjeksiyon	1725699	6,653
	3. Enjeksiyon	1743725	6,655
Standart sapma		13929	0,006
% RSD		0,800	0,097
Orta derişim (25 mg/L)	1. Enjeksiyon	290414	6,650
	2. Enjeksiyon	296981	6,658
	3. Enjeksiyon	295468	6,660
Standart sapma		3439	0,005
% RSD		1,169	0,077
Düşük derişim (3 mg/L)	1. Enjeksiyon	30569	6,652
	2. Enjeksiyon	30399	6,661
	3. Enjeksiyon	30353	6,662
Standart sapma		114	0,006
% RSD		0,373	0,083

Günler arası kesinlik parametresini belirleyebilmek için düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı derişimde rosmarinik asit standart çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan üç farklı derişimdeki rosmarinik asit standart çözeltisi 3 farklı günde, günün aynı saatinde HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir derişim için ortalama pik alanı

ve alıkonma zamanı belirlenmiştir. Elde edilen günler arası kesinlik parametresi verileri Çizelge 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Günler arası kesinlik parametresi verileri (1., 2. ve 3. Gün)

	Enjeksiyon numarası	Pik alanı	Alıkonma zamanı (dk)
Yüksek derişim (200 mg/L)	1. Gün	1736924	6,651
	2. Gün	1735145	6,655
	3. Gün	1740844	6,650
Standart sapma		2916	0,003
% RSD		0,168	0,040
Orta derişim (25 mg/L)	1. Gün	294456	6,656
	2. Gün	294496	6,661
	3. Gün	294288	6,656
Standart sapma		111	0,003
% RSD		0,038	0,040
Düşük derişim (3 mg/L)	1. Gün	30213	6,659
	2. Gün	30823	6,663
	3. Gün	30440	6,658
Standart sapma		308	0,003
% RSD		1,011	0,042

Çizelge 4.27, Çizelge 4.28 ve Çizelge 4.29’da görüldüğü üzere, % RSD değerleri gün içi kesinlik için 1. gün 0,146-0,297, 2. gün 0,102-0,390 ve 3. gün 0,083-0,373 aralıklarında; günler arası kesinlik için ise 0,042-1,011 aralığında saptanmıştır.

Çalışılan numune derişimine göre kesinlik parametresinde olması gereken % RSD değerleri belirlenmiştir. Bizim çalıştığımız derişim aralığında % 5,3 RSD değerinin yeterli olacağı belirtilmiştir (AOAC,1993). Literatür çalışmaları incelendiğinde ise %1’ in altında olması yüksek bir kesinliğe sahip olduğunu göstermektedir (Shabir 2004).

Sonuç olarak rosmarinik analiz metodunun gün içi ve günler arası % RSD değerlerinin %1 ve %1 ’in altında değerlere sahip olması metodun iyi bir kesinliğe sahip olduğunu gösterir.

4.4.4. LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyon doğrusu denkleminde yararlanılmıştır. Hesaplama için öncelikle Eşitlik 3.1 kullanılarak standart sapma değeri hesaplanmıştır. Daha sonra, elde edilen standart sapma değeri ve kalibrasyon doğrusu eğim değeri kullanılarak Eşitlik 3.2 ve Eşitlik 3.3 yardımıyla sırasıyla LOD ve LOQ değerleri elde edilmiştir.

LOD değeri 0,37 mg/L ve LOQ değeri de 0,95 mg/L olarak hesaplanmıştır. Keith vd. (1983) bir analitik metotta kalibrasyon doğrusunda yer alan en düşük

derişimin LOQ değerine yakın olması gerektiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen LOQ değerinin (0,95 mg/L) kalibrasyon doğrusundaki en düşük derişime (1 mg/L) oldukça yakın olduğu görülmektedir.

4.4.5. Seçicilik parametresinin belirlenmesi

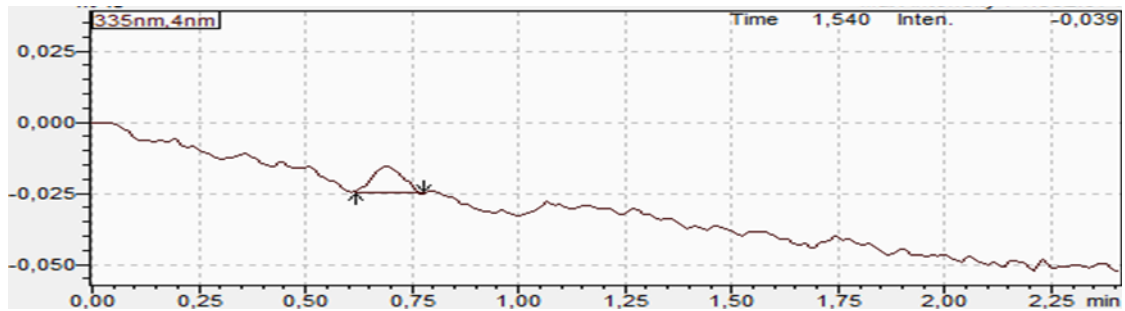
Hidrosinnamik asit türevi olan sinapik asit ve rosmarinik asit; östrojen eksiliğinden kaynaklı hastalıkların tedavisinde etkin rol oynamaktadırlar. Rosmarinik asit ve sinapik asit oksidatif stres parametreleri üzerine etki ederek tip 2 diyabette oldukça etkilidir. İki bileşen de aynı etki mekanizmasına sahip oldukları için aynı hastalıkların tedavisinde birlikte kullanılmaktadır. Aynı zamanda hidrosinnamik türevi olan sinapik asit ve rosmarinik asit mide ve bağırsak sisteminde kolaylıkla emilmektedir (Öktem-Okullu vd. 2020; Zych vd. 2020a; Zych vd. 2020b).

Seçicilik parametresi, verilen koşullarda iki bileşimin ayrılması olarak tanımlanmaktadır. Bu amaçla hidrosinnamik asit türevi olan sinapik asit ve rosmarinik asit üzerinde çalışılmış kör numune, rosmarinik asit standardı ve sinapik asit standartlarının alıkonma zamanları Çizelge 4.31’de verilmiştir.

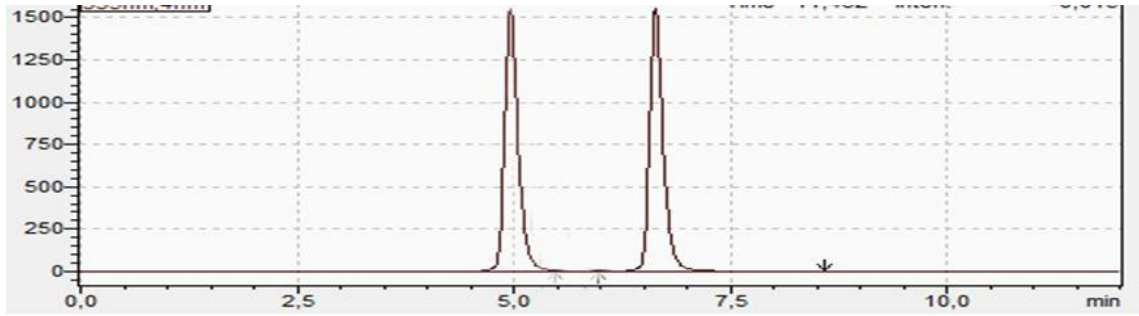
Çizelge 4.31. Seçicilik çalışması

Örneğin Adı	Alıkonma zamanı (dk)
Kör numune	Pik yok
Rosmarinik asit standardı	6,822
Sinapik asit standardı	4,859

Seçicilik çalışmasında elde edilen kromatogramlar, kör numune, rosmarinik asit standart çözeltisi ve sinapik asit standart çözeltisi için sırasıyla Şekil 4.76 ve Şekil 4.77’te gösterilmiştir.



Şekil 4.76. Seçicilik çalışmasında kullanılan kör numunenin kromatogramı



Şekil 4.77. Seçicilik çalışmasında kullanılan rosmarinik asit ve sinapik asit standartlarının kromatogramı

α (seçicilik faktörü) değeri, metodun seçiciliğinin bir ölçüsüdür ve α değerinin 1'den büyük olması beklenir. Bu amaçla Eşitlik 3.9'dan yararlanılarak α değeri 1,03 olarak aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

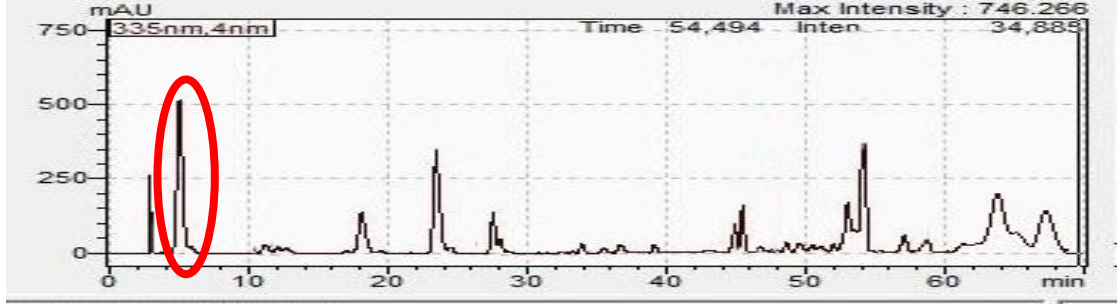
$$\alpha = \frac{t_A - t_0}{t_B - t_0} = \frac{6,822 - 0,69}{4,859 - 0,69} = 1,03$$

Bu sonuç, metodun seçiciliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

4.5. Optimize edilmiş metot ile *Daphne sericea* bitki türünde rosmarinik asit miktarının belirlenmesi

Çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitkisinin herba kısmı etüvde kurutulmuş, öğütülmüş ve analize hazır hale getirilmiştir. Çalışmanın önceki aşamasında optimize edilen ekstraksiyon koşulları kullanılarak kuru herba ekstrakte edilmiştir. Distile su ile hazırlanmış (V/V) % 70'lik metanol çözücüsü ile 65 °C'de 24 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstraktlar 0,45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra, HPLC cihazında ekstraktaki rosmarinik asit miktarı belirlenmiştir.

HPLC'de rosmarinik asit miktarını belirlemek için çalışmada metot optimizasyonu sonucu elde edilen metot parametreleri kullanılmıştır. Mobil faz ACN/MeOH/FA (V/V/V; 10/90/0,1), kolon sıcaklığı 30 °C, akış hızı 0,4 mL/dk'dır. Rosmarinik asit miktarını belirlemek için metot validasyon çalışmalarında doğrusallık parametresini belirlemek amacıyla elde edilen rosmarinik asit kalibrasyon doğrusundan faydalanılmıştır. Elde edilen pik alanı değeri, kalibrasyon doğrusunda kullanılmış ve numunedeki rosmarinik asit miktarı 146,48±2,87 mg/kg kuru bitki olarak belirlenmiştir (Şekil 4.78). Gradient elüsyonun kullanıldığı metotta rosmarinik asit miktarı 153,73±0,11 mg/kg kuru bitki olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.78. Çiçeklenme döneminde toplanan *D. sericea* bitki türünün herba kısmında optimize edilen metot ile rosmarinik asit analizi sonucu elde edilen kromatogram

Her iki metotta da belirlenen rosmarinik asit miktarı değerleri birbirine yakındır. Optimize edilen metodun ön plana çıkan olumlu yönü, alıkonma süresinin (6,82 dk) gradient elüsyonun kullanıldığı metodun alıkonma süresine (44,46 dk) göre oldukça kısa olmasıdır. Analizin daha kısa sürede tamamlanması mobil faz, enerji, iş gücü ve zaman sarfiyatının azalmasını sağlamıştır. Optimize edilen metodun olumsuz yönü ise aynı anda birden çok fenolik ve flavanoid bileşeninin analizine olanak sağlamamasıdır.

5. SONUÇLAR

- Yüksek lisans tezi kapsamında; çiçeklenme döneminde toplanmış *D. sericea* bitki türünün herba kısmında optimum ekstraksiyon koşulları, toplam fenolik madde miktarı analiz sonuçlarına göre belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon çözücüsü saf su ile hacimce % 70 oranında hazırlanmış metanol çözeltisi, optimum ekstraksiyon sıcaklığı 65 °C ve optimum ekstraksiyon süresi 24 saat olarak bulunmuştur.

- Çalışma kapsamında her iki bitki türünde üç farklı gelişme döneminde farklı bitki kısımlarında yapılan analizler sonucu iki bitkinin de kapsamlı olarak biyokimyasal karakterizasyonu ortaya koyulmuştur.

- *D. sericea* bitki türünde yapılan analizler sonucunda toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı değerleri sırasıyla 26,89-38,90 mg GAE/g ve 22,21-30,57 mg CE/g aralığında belirlenmiştir. İki farklı metot ile antioksidan aktivite değeri belirlenmiştir. DPPH ve FRAP metodu ile antioksidan aktivite miktarları sırasıyla 19,03-34,47 mg/mg DPPH ve 38,27-53,64 mg TE/mg aralığında belirlenmiştir. Her iki metot ile belirlenen sonuçlar birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı değerleri sırasıyla 0,041-1,030 mg/g kuru ağırlık ve 0,126-0,516 mg/g kuru ağırlık aralığında tespit edilmiştir. Antosiyanin miktarı ise; 0,41-17,54 mg/kg kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. C vitamini analizi HPLC cihazında gerçekleştirilmiş ve C vitamini miktarı 21,08-27,50 mg/100 g aralığında bulunmuştur. *D. sericea* bitki türünde çalışılan beş farklı organik asit bileşen standardı belirlenememiştir. HPLC cihazında gerçekleştirilen fenolik ve flavonoid bileşen miktarlarının belirlenmesi analizlerinde 15 farklı standart ile çalışılmış ve kateşin, şiringik asit, sinapik asit, rosmarinik asit, klorojenik asit ve epikateşin tespit edilmiştir. Sokslet ekstraksiyonu ile yağ verimi % 2,51-4,90 aralığında bulunmuştur. Elde edilen bu yağların GC-MS ile analiz edilmesi sonucunda; nonakosan, linoleik asit, palmitik asit ve oleik asit majör yağ bileşenleri olarak tespit edilmiştir.

- *D. gnidioides* bitki türünde yapılan analizler sonucunda toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı değerleri sırasıyla 39,33-74,94 mg GAE/g ve 11,10-31,00 mg CE/g aralığında belirlenmiştir. İki farklı metot ile antioksidan aktivite değeri belirlenmiştir. DPPH ve FRAP metodu ile antioksidan aktivite miktarları sırasıyla 15,08-108,10 mg/mg DPPH ve 42,96-95,49 mg TE/mg aralığında belirlenmiştir. Her iki metot ile belirlenen sonuçlar birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı değerleri sırasıyla 0,074-0,537 mg/g kuru ağırlık ve 0,116-0,385 mg/g kuru ağırlık aralığında tespit edilmiştir. Antosiyanin miktarı ise; 1,61-22,21 mg/kg kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. C vitamini analizi HPLC cihazında gerçekleştirilmiş ve C miktarı 28,13-50,83 mg/100 g aralığında bulunmuştur. *D. gnidioides* bitki türünde çalışılan beş farklı organik asit bileşen standardından tespit edilen malik asit miktarı 25,53-39,38 mg/g aralığında saptanmıştır. HPLC cihazında gerçekleştirilen fenolik ve flavonoid bileşen madde miktarlarının belirlenmesi analizlerinde 15 farklı standart ile çalışılmış ve kafeik asit, rosmarinik asit, sinapik asit, rutin, klorojenik asit ve ferulik asit tespit edilmiştir. Sokslet ekstraksiyonu ile yağ verimi değeri % 0,78-% 3,13 aralığında bulunmuştur. Elde edilen bu yağların GC-MS ile analiz edilmesi sonucunda; nonakosan, 1-eikosanol heksakosan, linoleik asit, palmitik asit ve oleik asit majör yağ bileşenleri olarak tespit edilmiştir.

- Rosmarinik asit analizi için metot optimizasyonu çalışmalarında; optimum mobil faz bileşimi ACN/MeOH/FA (10/90/0,5, V/V/V), optimum akış hızı 0,4 mL/dk, optimum kolon sıcaklığı 30 °C ve optimum enjeksiyon hacmi 10 µL olarak bulunmuştur.
- Doğrusallık parametresinin belirlenmesi için 1 mg/L ile 200 mg/L derişim aralığında rosmarinik asit kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve bu doğrunun korelasyon katsayısı değeri 0,9998 olarak hesaplanmıştır.
- Doğruluk çalışması sonucunda geri kazanım değeri % 101,36 olarak tespit edilmiştir.
- Gün içi kesinlik parametresi için % RSD değerleri 1. gün için 0,297-0,146 aralığında, 2. gün için 0,390-0,102 aralığında ve 3. gün için 0,373-0,083 aralığında bulunmuş ve günler arası % RSD değeri de 1,011 olarak hesaplanmıştır.
- Rosmarinik asit analizi için LOD ve LOQ değerleri sırası ile 0,37 mg/L ve 0,95 mg/L olarak hesaplanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Açar, Ö.Ç., Kırış, S., Diler, F. ve Avcı, A. 2013. Pestisit analizleri için metot validasyonu ve ölçüm belirsizliği hesaplanması açıklamalı uygulama rehberi. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı Kalıntı/Pestisit Birimi, Ankara.
- Açıkgöz Sağlam, I. 2016. Ülkemizde yetişen farklı armut türlerinin meyve, dal ve yapraklarında arbutin analizi metot optimizasyonu. Yüksek lisans tezi, Uşak Üniversitesi, Uşak, 125 s.
- Adham, A.N. 2015. Comparative extraction methods, phytochemical constituents, fluorescence analysis and HPLC validation of rosmarinic acid content in *Mentha piperita*, *Mentha longifolia* and *Osimum basilicum*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(6):130-139.
- Akal Yeşilören, G. 2019. Siyah havuç posasından antosiyanin ekstraksiyonu. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 219 s.
- Akıcı, N. 2018. Bazı *salvia* türlerinin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 56 s.
- Akyüz, E. 2011. *Digitalis ferruginea* ssp. *schischkinii* ve bazı endemik digitalis türlerinin ekstraktlarında mevcut kardiyak glikozitleri ve fenolik bileşiklerin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 119 s.
- Alberti, A., Zielinski, A.A.F., Zardo, D.M., Demiate, I.M., Nogueire, A. and Mafra, L.I. 2014. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 49:151-158.
- Allal, A., Bellifa, S., Benmansour, N., Selles, C., Semaoui, M., Hassaine, H. and Muselli, A. 2019. Essential oil and hydrosol extract chemical profile, antioxidant and antimicrobial potential of *Daphne gnidium* L. from Algeria. *TEOP*, 22(5):1277-1288.
- Amrani-Allalou, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Mapelli-Brahm, P., Sait, S., Tenore, G. C., Benmeziane, A., Kadri, N., Madani, K. And Martínez, A.J.M. 2019. Antioxidant activity, carotenoids, chlorophylls and mineral composition from leaves of *Pallenis spinosa*: an Algerian medicinal plant. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, DOI: 10.1515/jcim-2017-0081.
- Anonim, 1994. Reviewer guidance, validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1-33.
- Anonim, 2009. Determination of biophenols in olive oils by HPLC. International Olive Council (IOC), 29:1-8.
- AOAC, 1993. Peer Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA.
- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 16th Ed. Ass. of Official Analysis, Washington.

- Arkan, T. 2011. *Daphne oleoides* subsp. *oleoides* ve *Daphne sericea*'nın farklı çözücülerle antioksidan özellikleri. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 62 s.
- Arnon, D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology*, 24:1-15.
- Arslan, N., Baydar, H., Kızıl, S., Karık, Ü., Şekeroğlu, N. ve Gümüşçü, A. 2010. Tıbbi Aromatik Bitkiler Üretiminde Değişimler ve Yeni Arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongresi, ss. 483-507, 11-15 Ocak, Ankara.
- Aşçı, Ö. 2020. *Mentha piperita* L.'de dışsal borlu gübre uygulamasının verim ve toplam fenolik madde birikimi üzerine etkileri. *International Journal of Science and Technology Research*, 4:1-5.
- Atıcı, Y. ve Bulduk, İ. 2020. Dişbudak ağacı (*fraxinus excelsior*) yapraklarından klorojenik asit ekstraksiyonunun yüzey yanıt metodolojisi ile optimizasyonu ve toplam fenolik içeriklerinin tayin edilmesi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 8:33-47.
- Aydınlık, Z. 2012. Niğde ilinde üretilen üzüm pekmezi örneklerinin fenolik madde içeriğinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Niğde Üniversitesi, Niğde, 60 s.
- Balkan, İ., Taşkın, T., Doğan, H. T., Deniz, İ., Akaydın, G. ve Yeşilada, E. 2016. A comparative investigation on the in vitro anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial potentials of subextracts from the aerial parts of *Daphne oleoides* Schreb. subsp. *oleoides*. *Industrial Crops and Products*, 95:695-703.
- Bat, M., Tunçtürk, R., Tunçtürk, M. 2020. Ekinezya (*Echinacea purpurea* L.) bitkisinde kuraklık stresi ve deniz yosunu uygulamalarının bazı fizyolojik parametreler üzerine etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(1):99-107.
- Baydar, H. ve Gürel, F. 1998. Antalya doğal florasında bal arısı (*apis mellifera*)'nın polen toplama aktivitesi, polen tercihi ve farklı polen tiplerinin morfolojik ve kalite özellikleri. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry-Academic Journals*, 22:475-482.
- Bayraktar, Ö. V., Öztürk, G. ve Arslan, D. 2017. Türkiye'de bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin üretimi ve pazarlamasındaki gelişmelerin değerlendirilmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26(2):216-229.
- Bengü, A.Ş., Yılmaz, H.Ç., Türkeku İ. Ve Işık, H. 2019. Doğadan toplanan ve kültürü yapılan *pleurotus ostreatus* ve *agaricus bisporus* mantarlarının toplam protein, vitamin ve yağ asidi içeriklerinin belirlenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(2):222-229.
- Bernatoniene, J., Cizauskaite, U., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Kalveniene, Z. And Kopustinskiene, D.M. 2016. Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves. *Industrial Crops and Products*, 84:72-79.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E. and Caboni, M.F. 2004. Antioxidant phenols in barley (*hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among

- extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:5195-5200.
- Bulduk, İ. ve Gökçe, S. 2017. Yüzey yanıt metodolojisi ile biberiye yapraklarından rosmarinik asit ekstraksiyonunun optimizasyonu. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5:441-454.
- Büyüktuncel, E. 2012. Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2):209-242.
- Büyüktuncel, E. 2013. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17:93-103.
- Cavlak, S. ve Yağmur, C. 2016. Bazı poşet çayların toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 34(4):11-19.
- Choi, S.H., Jang, G.W., Choi, S.I., Jung, T.D., Cho, B.Y., Sim, W.S, Han, X., Lee, J.S., Kim, D.Y., Kim, D.B. and Lee, O.H. 2019. Development and validation of an analytical method for carnosol, carnosic acid and rosmarinic acid in food matrices and evaluation of the antioxidant activity of rosemary extract as a food additive. *Antioxidants*, 8:76-88.
- Chua, L.S., Laua, C.H., Chewa, C.Y., Ismail, N.I.M.I. and Soontornngun, N. 2018. Phytochemical profile of orthosiphon aristatus extracts after storage: rosmarinic acid and other caffeic acid derivatives. *Phytomedicine*, 39:49–55.
- Coşkun, F. 2016. Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2:27-33.
- Çelik, Z.H. 2017. Sağlıklı beslenmede kullanılan bazı tohumların sabit yağlarının mukayeseli fitokimyasal analizi. Yüksek lisans tezi, Bezmi Alem Vakıf Üniversitesi, İstanbul, 160 s.
- Çetin, E.S., Babalık, Z. ve Baydar Göktürk, N. 2012. Bazı Sofralık Üzüm Çeşitlerinde Tanelerdeki Toplam Karbonhidrat, Fenolik Madde, Antosiyanin, β -Karoten ve C Vitamini İçeriklerinin Belirlenmesi. IV. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, ss. 151-159, Antalya.
- Çevik, E. 2013. Taze ve ticari vişne sularının antioksidan kapasitesi ve kapiler elektroforez yöntemi ile organik asit içeriklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 65 s.
- Damar, İ. 2010. Vişne suyunun antosiyanin profili ve antioksidan kapasitesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 82 s.
- Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H. ve Güngör, H. 2019. Nar kabuğundan antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu. *Gıda*, 44(2):369-382.
- Demiray, S. 2006. Şarap üretim aşamalarında organik asit dağılımı. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, 57 s.

- Demirtaş, M.N. ve Kırnak, H. 2009. Kayısıda farklı sulama yöntemleri ve aralıklarının fizyolojik parametrelere etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 19(2):79-83.
- Diken, M.E. 2009. Bazı şifalı bitkilerin antioksidan içerikleri. Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, 93 s.
- Dizlek, H. ve Gül, H. 2007. L-Askorbik asit ve ekmekçilikteki işlevleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2(1):26-34.
- Doğan, A., Uyak, C., Akçay, A., Keskin, N., Şensoy, R. İ.G., Çelik, F., Kunter, B., Çavuşoğlu, Ş. ve Özrenk, K. 2020. Hizan (Bitlis) koşullarında yetiştirilen üzüm çeşitlerinin klorofil miktarları ve stoma yoğunluklarının belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 30(4):652-665.
- Dursun, İ. 2011. *Butomus umbellatus* L. ve *Sparganium emersum* rehmann ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin tayini ve fenolik asit içeriklerinin HPLC-UV ile analizi. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 133 s.
- Duru, N. 2008. Kuşburnu nektarındaki karotenoidlerin depolama stabilitesi. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 81 s.
- Eghdami, A. and Sadeghi, F. 2010. Determination of total phenolic and flavonoids contents in methanolic and aqueous extract of *achillea millefolium*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2:81-84.
- El, N.S. 2008. Türkiye’de Sıklıkla Tüketilen Bazı Gıdaların Toplam Fenolik Madde İçerikleri ve Antioksidan Aktiviteleri. 10. Gıda Kongresi, ss. 45-48, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Erge, H.S. 2007. Domateste (*Lycopersicum esculentum*) karotenoid madde dağılımı ve antioksidan aktivite. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 100 s.
- Ertürk, E. 2014. Valgansiklovir ve lamivudinin permeabilite ve bozunma ürünlerinin tayini için metot optimizasyonu. Yüksek lisans tezi, Uşak Üniversitesi, Uşak, 94 s.
- Etöz Mavi, E. 2013. Bazı antidepresanların vücut sıvılarında yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu. Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 181 s.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M. S. 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1):52-67.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu M. S. 2013. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2):233-265.
- Galvan d'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I. and Dimitrov, K. 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Seperation and Purification Technology*, 93(1):42-47.
- Garces, R. and Manca, M. 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Analytical Biochemistry*, 211(1):139-143.

- Ghafoor, K., Juhaimi, F.A., Özcan, M.M., Uslu, N., Babiker, E.E. and Ahmed, I. A.M. 2020. Total phenolics, total carotenoids, individual phenolics and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) rhizome as affected by drying methods. *Food Science and Techonology*, DOI:org/10.1016/j.lwt.2020.109354.
- Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A.2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) full extracts. *Food Chemistry*, 92:521-525.
- Gökçe, S. 2015. Pazopanib ve ilgili stres bozunma bileşiklerinin incelenmesi ve tayini için metod optimizasyonu. Yüksek lisans tezi, Uşak Üniversitesi, Uşak, 118 s.
- Gray, J.I. 1978. Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(6):539-546.
- Grubešić, R.J., Kremer, D., Končić, M.Z., Rodríguez, J.V. and Randić, M. 2012. Quantitative analysis of polyphenols and antioxidant activity in four *Daphne* L. species. *Central European Journal of Biology*, 7(6):1092-1100.
- Gül, A., ve Çelik, A.D. 2016. Tıbbi ve aromatik bitki yetiştiriciliği ve dış ticareti: Hatay ili örneği. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2):227-235.
- Güler, H.K., Dönmez, İ.E. ve Aksoy, A.S. 2015. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antibakteriyel aktivitesi ve tekstil sektöründe kullanımı. *Suleyman Demirel University Journal of Science (E-Journal)*, 10(2):27-34.
- Gündoğdu M. ve Yılmaz H. 2013. Bazı standart nar (*Punica Granatum* L.) çeşitleri ve genotiplerine ait meyvelerin C vitamini, şeker ve besin elementleri içeriklerinin belirlenmesi. *Yüzüncüyıl Üniversitesi Tarım ve Bilim Dergisi*, 23(3):242-248.
- Hacıbekiroğlu, I. 2013. Gıda örneklerinde aflatoksin (G1, G2, B1, B2) ve okratoksin A' nın HPLC metot validasyonu ve miktar tayinleri. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 138 s.
- Heinonen, I.M. ve Meyer, A.S.2002, Antioxidants in Fruits, Berries and Vegetables, www.google.com.tr/books [Son erişim tarihi: 05.01.2021]
- Hong, E. and Kim, G.H. 2010. Comparison of extraction conditions for phenolic, flavonoid content and determination of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* var. *acuta*. *International Journal of Food Science and Technology*, 45:1353-1359.
- Huie, C.W. 2002. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373:23-30.
- İnanç, A. L. ve Yüksel, D. 2018. İhlamur bitkisinin (*Tilia cordata*) katı-sıvı ekstraksiyonunda toplam fenolik madde kinetiğinin matematiksel modellenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 22(1):12-20.
- Jan, N., Andrabi, K.I. and John, R. 2017. *Calendula officinalis* an important medicinal plant with potential. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 83(4):769-787.

- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. and Simic, M.G. 1984. Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116:4846-4851.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F. and Siebenhand, S. 2006. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology*, 41:121-133.
- Kafalı, H. 2008. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon sonrası türevlendirme ile 7 adet sulfonamid tespitinin metot validasyonu. Yüksek lisans tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 138 s.
- Kaplan, K. 2016. İnsan kanı serumunda karvedilol ilaç etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ve validasyonu. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 82 s.
- Karadağ, R. 2017. Doğal Boyamacılık. <https://docplayer.biz.tr/4638283-Doner-sermaye-isletmesi-merkez-mudurlugu-dogal-boyamacilik-recep-karadag.html> [Son erişim tarihi: 08.08.2019]
- Karadeniz, F., Burdurlu, H.S., Koca, N. ve Soyer, Y. 2005. Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29:297-303.
- Karataş, Ş. 2013. *Onobrychis armena* boiss. & huet (fabaceae)'nin antioksidan özellikleri ile uçucu ve sabit yağ bileşiminin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 54 s.
- Kasım, R. ve Kasım, M.U. 2019. Renkli Meyve ve Sebzelerin Bileşimi ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. 8th International Vocational Schools Symposium, ss 31-39, 11-13 Haziran, Sinop.
- Kaya, B. ve Aladağ, C. 2009. Maki ve garig topluluklarının Türkiye'deki yayılış alanları ve ekolojik özelliklerinin incelenmesi. *Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 22: 67-80.
- Keith, L.H., Crummet, W., Deegan, J., Libby, R.A., Taylor, J.K. and Wentler, G. 1983. Principles of environmental analysis. *Journal of Analytical Chemistry*, 55:2210-2218.
- Kenari, R.E., Mohsenzadeh, F. and Amiri, Z.R. 2013. Antioxidant activity and total phenolic compounds of dezful sesame cake extracts obtained by classical and ultrasound assisted extraction methods. *Food Science and Nutrition*, 2(4):426-435.
- Khiari, Z., Makris, P. D. and Kefalas, P. 2009. An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol based solvent systems. *Food and Bioprocess Technology*, 2(4):337-343.
- Kırbağ, S. and Bağcı, E. 2000. *Picea abies* (L.) Karst. ve *Picea orientalis* (L.) link uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine bir araştırma. *Journal of Qafqaz University*, 3(1):183-190.

- Kırk, J.T. and Allen, R.L. 1965. Dependence of pigment synthesis on protein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 21:523-530.
- Kim, S., Yun, E.Y., Bak, J.S., Lee, H., Lee, S.J., Kim, C.T., Lee, J.H. and Kim, K.H. 2010. Response surface optimised extraction and chromatographic purification of rosmarinic acid from *Melissa officinalis* leaves. *Food Chemistry*, 121:521-526.
- Koca, N. 2006. Havuçlarda (*Daucus carota* L.) karotenoidler ve antioksidan aktivite. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 91 s.
- Koçyiğit, M. ve Özhatay, N. 2006. Wild plants used as medicinal purpose in Yalova (northwest Turkey). *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2):91-103.
- Köybaşı, B. 2010. Hatay bölgesinde yetiştirilen çeşitli bitkilerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Musatafa Kemal Üniversitesi, Hatay, 66 s.
- Kubat, A., Özaslan, M., Karaduman, A., Karagöz, I.D. ve Kılıç, İ.H. 2013. C vitamini bakımından zengin sebze ve meyvelerin beyaz kan hücreleri artışı üzerine etkilerinin araştırılması. *Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 3(1):31-37.
- Küpeli, E., Tosun, A. ve Yesilada, E. 2007. Assessment of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Daphne pontica* L. (thymelaeaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 113:332-337.
- Lafka, T.I., Sinanoğlu, V. and Lazos, E.S. 2007. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104:1206-1214.
- Lee, J.H., Seo, W.T., Lim, W. J. and Cho, K. M. 2011. Phenolic contents and antioxidant activities from different tissues of baekseohyang (*Daphne kiusiana*). *Food Science and Biotechnology*, 20(3):695-702.
- Li, H.Z., Zhang, Z.J., Xue, J., Cui, L.X., Hou, T.Y., Li, X.J. and Chen, T. 2005. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and rosmarinic acid from perilla leaves using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 36(4):686-693.
- Manojlovic, N., Sovrlic, M., Maskovic, P., Vasiljevic, P. and Juskovic, M. 2014. Phenolic and flavonoid content and antioxidant activity of *Daphne blagayana* growing in Serbia. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 15(1):21-27.
- Maslarova, N.V.Y. and Heinonen, I.M. 2001, Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. *Antioxidants in Food*, 211-248.
- Meyer, A.S., Suhr, K.I., Nielsen, P. and Holm, F. 2000. Natural food preservatives. www.google.com.tr/books [Son erişim tarihi: 5.01.2021]
- Mısırlı, D. 2013. Bazı reyhan genotiplerinin taze ve kuru herbalarında rosmarinik ve sisorik asit miktarlarının belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat, 56 s.

- Mihaylova, D., Vrancheva, R., Petkova, N., Ognyanov, M., Desseva, I., Ivanov, I., Popova, M. and Popova, A. 2018. Carotenoids, tocopherols, organic acids, carbohydrate and mineral content in different medicinal plant extracts. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 73(11-12):439-448.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J. and Parajo, J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72:145-171.
- Murathan, Z.T. ve Kaya, A. 2020. Alanya ekolojik koşullarında yetiştirilen Hass ve Fuerte avokado çeşitlerinin bazı fitokimyasal içerikleri ile antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(6):1435-1440.
- Nar, M. 2011. Rozmarinik asitin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (HCA-I ve HCA-II) üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 132 s.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Bragazza, L. and Gerdol, R. 2003. Low-molecular-weight organic acids and hormone-like activity of dissolved organic matter in two forest soils in Italy. *Journal of Chemical Ecology*, 29(7):1549-1564.
- Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R.F., Reis, C.P., Roberto, A. and Rijo, P. 2016. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement*, 89:328-332.
- Nour, V., Trandafir, I. and Ionica, M. E. 2010. HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 38(1):44-48.
- Olanlokun, J.O. and Akomolafe, S.F. 2013. Antioxidant potentials of various solvent extracts from stem bark of *Enantia chlorantha*. *J. Biomedical Science and Engineering*, 6:877-884.
- Oliveira, K.B. and Oliveira, B.H. 2013. HPLC/DAD Determination of rosmarinic acid in *salvia officinalis*: sample preparation optimization by factorial design. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(1):85-91.
- Oliveira, G. A. R., Oliveira, A.E., Conceição, E.C. and Leles, M.I.G. 2016. Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food Chemistry*, 211:465-473.
- Oluk, C.A., Akyıldız, A., Ağcam, E., Keleş, D. ve Ata, A. 2012. Farklı domates çeşitlerinin bazı kalite özellikleri. *Akademik Gıda*, 10(3):26-31.
- Öktem Okullu, S., Mansur, N., Moziolu, E. ve Kolgazi, M. 2020. Hidroksisinamik asit türevlerinin canlı-dışı helicobacter pylori karşıtı etkileri ile üreaz enzimini engelleme etkinliklerinin araştırılması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 11(4):646-651.
- Öz, M., Baltacı, C. ve Deniz, İ. 2018. Gümüşhane yöresi kuşburnu (*Rosa canina* L.) ve siyah kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia* L.) meyvelerinin C vitamini ve şeker analizleri. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2):284-292.

- Özcan, C. 2009. Semizotu, ısırgan otu, menengiç ve kuşburnu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerde flavonollerin HPLC-MS ile tayini. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 149 s.
- Özden, M. ve Özden, A. 2014. Farklı renkteki meyvelerin toplam antosiyanin, toplam fenolik kapsamlarıyla toplam antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(2):1-12.
- Özen, G., Akbulut, M. 2008. Dut Suyu Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, ss. 279-282, 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Özkan, G. 2014. Fitoterapi homeopati ve Türkiye’ deki uygulamaları. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, ss.1-8, 23-25 Eylül, Yalova.
- Pintea, A., Bele, C., Andrei, S. and Socaciu. 2013. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4):37-40.
- Prasad, N. K., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, W. K., Ramanan, N. R., Azlan, A. and Ismail, A. 2011. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4):1121-1127.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. and Khalel, K. I. 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43:827-831.
- Said, Ö. 2016. Bazı bitki ekstrelerinin antioksidan aktivitesi ve rozmarinik asit içeriği üzerine çalışmalar. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 73 s.
- SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. National Food Administration, Uppsala, Sweden.
- Sanda, M.A., Zengin, G., Aktumsek, A. and Çakmak, Y.S. 2015. Evaluation of antioxidant potential of two *Daphne* species (*D. gnidioides* and *D. pontica*) from Turkey. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(6):488-494.
- Sarı, A.O., Oğuz, B., Bilgiç, A., Tort, N., Güvensen, A. ve Şenol, S.G. 2010. Ege ve Güney Marmara bölgelerinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(2):1-21.
- Schippmann, U., Leaman, D.J. and Cunnigham, A.B. 2002. Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. FAO. Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries, ss. 1-21, 12-13 October 2002, Rome.
- Semiz, A. 2018. Gıda takviyesi tabletlerinde bulunan glukozamin etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile tayini için metot optimizasyonu ve validasyonu. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 57 s.
- Shabir, G.A. 2004. A practical approach to validation of HPLC methods under current good manufacturing practices. *The Journal of Validation Technology*, 2:29-37.

- Sik, B., Hanczné, E.L., Kapcsándi, I. and Ajtony, Z. 2020. Conventional and nonconventional extraction techniques for optimal extraction processes of rosmarinic acid from six Lamiaceae plants as determined by HPLC-DAD measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 184:113173.
- Sönmez, K. ve Ellialtıoğlu, Ş.Ş. 2014. Domates, karotenoidler ve bunları etkileyen faktörler üzerine bir inceleme. *Derim*, 31(2):107-130.
- Spanos, G. and Wrolstad, R.E. 1990. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:1565-1571.
- Süntar, İ. 2011. Türkiye’de halk arasında yara iyileştirici amaçla kullanılan bazı bitkilerin aktiviteleri üzerinde araştırmalar. Doktora tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 229 s.
- Şat, İ.G., Öz, Ö. 2015. Haşlama ve kurutmanın bazı sebzelerin bileşimi üzerine etkisi. *Adıyaman Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3:54-62
- Şengün, P. 2019. Goji berry (*Lycium barbarum* L.) meyvelerinin olgunlaşma evreleri ve kurutulma sürecinde karotenoid kompozisyonundaki değişim. Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, 88 s.
- Tan, K. and Davis, P.H. 1982. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. University Press, 521-526.
- Tandoğan, M. 2012. Raloksifen’in biyolojik materyalden ve farmasötik preparattan analizi için gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yönteminin geliştirilmesi ve valide edilmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 116 s.
- Temel, S. ve Tan, M. 2009. Erdemli (Mersin) yöresi makiliklerindeki çalı türlerinin tespiti ve yoğunlukları üzerine bir araştırma. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1):81-89.
- Temel, M., Tınmaz A. B., Öztürk, M. ve Gündüz, O. 2018. Dünyada ve Türkiye’de tıbbi aromatik bitkilerin üretimi ve ticareti. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 21:198-214.
- Tepe, B. ve Sökmen, A. 2007. Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. *Natural Product Research*, 21(13):1133-1144.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos and D.H. Byrne. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:669-675.
- Thyagaraj, V.D., Koshy, R., Kachroo, M., Mayachari, A.S., Sawant, L.P., and Balasubramaniam, M. 2013. A validated RP-HPLC-UV/DAD method for simultaneous quantitative determination of rosmarinic acid and eugenol in *Ocimum sanctum* L. *Pharmaceutical Methods*, 4:1-5.
- Tomsone, L., Kruma, Z. and Galoburda, R. 2012. Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (*Armoracia rusticana*). *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 6(4):236-241.

- Tongur, T. 2014. *Daphne sericea* ve *Daphne gnidioides* bitki ekstraktlarının bileşimlerinin ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 123 s.
- Tongur, T., Erkan, N. and Ayrancı, E. 2018. Investigation of the composition and antioxidant activity of acetone and methanol extracts of *Daphne sericea* L. and *Daphne gnidioides* L. *Journal of Food Science Technology*, 55:1396-1406.
- Tosun, A. 2006. *Daphne* L. türlerinin kimyasal içeriği ve biyolojik aktiviteleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(1):43-68.
- TS 4967. Tahıl ve tahıl ürünleri toplam yağ yayını.
- Tundis, R., Cappello, A.R., Bonesi, M., Peruzzi, L. and Loizzo, M.R. 2020. Extracts of Different Polarity of *Daphne Laureola* L. as Valuable Source of Antioxidant and Neuroprotective Compounds. The 1st International Electronic Conference on Antioxidants in Health and Disease, 1-15 December 2020, Switzerland.
- Turhan, I. 2014. Relationship between sugar profile and D-pinitol content of pods of wild and cultivated types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *International Journal of Food Properties*, 17(2):363-370.
- Türker, E. 2019. *Carica papaya* L. uçucu ve sabit yağlarının kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri. Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 58 s.
- Uysal, A., Zengin, G., Aktümsek, A., Rigano, D., Senatore, F. ve Sanda, A.M. 2016. *Daphne oleoides*: An alternative source of important sesquiterpenes. *International Journal of Food Properties*, 20(3):549-559.
- Watada, A. E. 1982. A high performance liquid chromatography method for determining ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables, *American Society for Horticultural Science*, 17(3):334-335.
- Wiszniewska, A., Hanus-Fajerska, E., Smoleń, S. and Muszyńska, E. 2015. In vitro selection for lead tolerance in shoot culture of *Daphne* species. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(1):129-142.
- Veeru, P., Kishor, M.P. and Meenakshi, M. 2009. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(8):608-612.
- Yağcıoğlu, P. 2015. Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. Yüksek lisans tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 121 s.
- Zengin, G., Arkan, T., Aktümsek, A., Güler, G. and Çakmak, Y.S. 2012. A study on antioxidant capacities and fatty acid compositions of two daphne species from Turkey: new sources of antioxidants and essential fatty acid. *Journal of Food Biochemistry*, 37(6):646-653.
- Zeren, İ., Cantür, U. ve Yaşar, M. O. 2017. Bazı peyzaj bitkilerinde klorofil miktarının değişimi. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 19(2):174-182.
- Zych, M., Wojnar, W., Borymski, S., Szalabska, K., Bramora, P. and Kaczmarczyk-Sedlak, H. 2019a. Effect of rosmarinic acid and sinapic acid on oxidative stress parameters in the cardiac tissue and serum of type 2 diabetic female rats. *Antioxidants*, 8:579-602.

Zych, M., Wojnar, W., Dudek, S. and Kaczmarczyk-Sedlak, I. 2019b. Rosmarinic and sinapic acids may increase the content of reduced glutathione in the lenses of estrogen-deficient rats. *Nutrients*, 11:803-817.



ÖZGEÇMİŞ

TUBA SEÇMEN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
2005-2010	Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Eskişehir
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
2008-2010	Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Eskişehir

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Mühendis	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
2016-Devam Ediyor	Gıda Teknolojisi ve Tıbbi, Aromatik Bitkileri Bölümü, Antalya
Mühendis	Meyvecilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
2012-2016	Hasat Sonrası Fizyolojisi Bölümü, Isparta

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Yıldız Turgut D., Özdemir M., Seçmen T., Çınar O. (2019). Bazı pikan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] çeşitlerinin antioksidan özellikleri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 35, 526-533.
- 2- Yıldız Turgut D., Çınar O., Seçmen T. (2019). Farklı yöntemlerle elde edilen kamkat (*Fortunella Margarita* swing.) tozlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda*, 44(4), 605-617.
- 3- Onursal C.E., Eren İ., Güneyli A., Topcu T., Çalhan O., Bayındır D. (2014). Effect of carvacrol on microbial activity and storage of fresh-cut 'Braeburn' apple. *Acta Hort.*, 1053, 215-221.
- 4- Koyuncu M.A., Seçmen T., Onursal C.E., Erbaş D., Güneyli A., Sevinç Üzümcü S., Koyuncu F. (2018). Effect of postharvest oxalic acid treatment on cold storage of apricot cv. aprikoz. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, 2285-5653.
- 5- Koyuncu M.A., Güneyli A., Erbaş D., Onursal C.E., Seçmen T. (2018). Combined effects of MAP and postharvest salicylic acid treatment on quality attributes of dill (*Anethum graveolens* L.) bunches during storage. *Journal of Agricultural Sciences*, 24, 340-348.
- 6- Koyuncu M.A., Erbaş D., Onursal C.E., Seçmen T., Güneyli A., Üzümcü Sevinç S. (2018). Postharvest treatments of salicylic acid, oxalic acid and putrescine influences bioactive compounds and quality of pomegranate during controlled atmosphere storage. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3495-1>
- 7- Onursal C.E., Küçükyumuk C., Çalhan Ö., Eren İ., Güneyli A., Seçmen T. (2016). Yüzey sulama yönteminden damla sulama yöntemine geçişin starkrimson delicious elma çeşidinin muhafazası üzerine etkileri. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi Özel Sayı*: 199-207.
- 8- Onursal C.E., Güneyli A., Seçmen T., Eren İ., Koyuncu M.A., Erbaş D. (2016). Hasat sonrası salisilik asit uygulamasının Dr.Jules Guyot armut çeşidinde depolama ve raf ömrü kalitesi üzerine etkileri. *Bahçe Özel Sayı*, 45(1), 188-193.
- 9- Güneyli A., Onursal C.E., Seçmen T., Eren İ., Çalhan Ö. (2016). Hasat sonrası SencyFresh uygulamalarının Granny Smith elma çeşidinin soğukta muhafazası üzerine etkisi. *Bahçe Özel Sayı*, 45(1), 812-816.
- 10- Çalhan Ö., Onursal C.E., Seçmen T., Güneyli A., Eren İ. (2016). Galaxy Gala elma çeşidinde muhafaza öncesi SencyFresh™ uygulamasının depolama süresince meyve kalitesi üzerine etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 53(1), 51-60.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

- 1- Seçmen T., Onursal C.E., Güneyli A., Çınar O. (2019). Effects of different temperature and modified atmosphere storage on mulberry (*Morus alba* L.) storage. 1st International Erciyes Agriculture, Animal and Food Sciences Conference (AGANFOS-2019). (Özet Bildiri).
- 2- Seçmen T., Onursal C.E., Güneyli A., Erbaş D. (2019). Farklı sıcaklık koşullarında muhafaza edilen tere (*Lepidium sativum*) bitkisinin fiziksel ve biyokimyasal değişimleri. International Congress on Agriculture and Forestry Research. (Özet Bildiri).
- 3- Seçmen T., Yüceol F., Erdoğan A., Çınar O. (2019). Antalya ilinin Konyaaltı ilçesinden toplanan tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinin farklı gelişim dönemlerindeki biyokimyasal içeriği. International Congress on Agriculture and Forestry Research. (Özet Bildiri).
- 4- Seçmen T., Yüceol F., Erdoğan A., Çınar O. (2019). Antalya ilinin Konyaaltı ilçesinden toplanan kısamahmut (*Teucrium polium* L.) bitkisinin farklı gelişim dönemlerindeki biyokimyasal içeriği. International Congress on Agriculture and Forestry Research. (Özet Bildiri).
- 5- Seçmen T., Çınar O., Erdoğan A., Tunçtürk M. Karık Ü. (2019). Determination of total phenolic, flavanoid, carotenoid and chlorophyll contents of *Nepeta Lamiifolia* wild and *Nepeta Fissa* C.A. meyer collected from Van district of Turkey. The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. (Özet Bildiri).
- 6- Çınar O., Tunçtürk M., Seçmen T., Erdoğan A., Karık Ü. (2019). Determination of essential oil composition, phenolic and flavanoid contents of *Phlomis Longifolia* Var. *Longifolia* collected from Hatay district of Turkey. The Fifth International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. (Özet Bildiri).
- 7- Onursal C.E., Üzümcü Sevinç S., Güneyli A., Seçmen T., Erbaş D., Koyuncu M.A. (2018). The new box system Janny Mt effects fruit quality and some biochemical properties of pomegranate after harvest. 30th International Horticultural Congress. (Özet Bildiri).
- 8- Secmen T., Onursal C.E., Güneyli A., Erbaş D., Üzümcü Sevinç S., Koyuncu M.A. (2018). Salicylic acid effects main quality component of pear cv. Dr. Jules Guyot. 30th International Horticultural Congress. (Özet Bildiri).
- 9- Secmen T., Tanır A., Yüceol F., Yıldız Turgut D., Yüksel K. (2018). Biochemical content of mallow plant (*Malva Sylvestris*) growing naturally in Konyaaltı district of Antalya province. 4th International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants (Özet Bildiri).

- 10- Turgut Yıldız D., Çınar O., Yüksel K., Tanriseven M., Seçmen T., Tanır A. (2018). Kamkat (*Fotunella margarita* Swing.) kabuk ve çekirdek ekstratlarının fitokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. IV.Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu (Özet Bildiri).
- 11- Tanır A., Secmen T., Yüksel K., Yıldız Turgut D., Yüksel K. (2018). Biochemical content of *Pistacia Terebinthus* L. naturally distributed in Serik district of Antalya province.4th International Symposium of Medicinal and Aromatic Plants (Özet Bildiri).
- 12- Turgut Yıldız D., Seçmen T., Tanır A. (2018). A Comparative study the andioxidant properties of different citrus jucies. International Agricultural, Biological and Life Science Conference, (Özet Bildiri).
- 13- Onursal C.E., Küçükyumuk C., Secmen T., Güneyli A., Erbaş D., Üzümcü Sevinç S., Koyuncu M.A. (2018). Effect of different deficit irrigation strategies on postharvest quality of apple ‘Breaburn’. 11th International FRUTİC Symposium. (Özet Bildiri).
- 14- Secmen T., Onursal C.E., Güneyli A.,Üzümcü Sevinç S., Erbaş D., Koyuncu M.A. (2018). Effect of postharvest oxalic acid treatments on some biochemical properties of apricot cv. aprikoz during cold storage. Intertational Conference on Agriculture, Forest, Food, Sciences and Techonologies. (Özet Bildiri).
- 15- Onursal C.E., Secmen T., Üzümcü Sevinç S., Erbaş D., Güneyli A., Koyuncu M.A. (2018). Prolonging postharvest life of apricots by preharvest polyamine treatments. Intertational Conference on Agriculture, Forest, Food, Sciences and Techonologies. (Özet Bildiri).
- 16- Secmen T., Güneyli A., Onursal C.E., Koyuncu M.A., Erbaş D., Üzümcü Sevinç S. (2018). The effects of controlled atmosphere (CA), dynamic controlled atmosphere (DCA) and 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatments on phenolic compounds of Abbe Fetel pear cultivars during cold storage. International Agricultural Science Congress. (Özet Bildiri).
- 17- Erbaş D., Onursal C.E., Secmen T., Güneyli A., Üzümcü Sevinç S., Koyuncu M.A. (2018). The effect of oxalic acid on the quality change of Freshcut broccoli (*Brassica Oleracea* L.) during cold storage. 8th International Conference of Strategic Research on Scientific Studies and Education. (Özet Bildiri).
- 18- Koyuncu M.A., Secmen T., Onursal C.E., Erbaş D., Güneyli A., Üzümcü Sevinç S., Koyuncu, F. (2018). Effect of postharvest oxalic acid treatment on cold storage of apricot cv. ‘aprikoz’. The International Conference ‘Agriculture for Life, Life for Agriculture’ (Özet Bildiri).
- 19- Secmen T., Güneyli A., Onursal C.E., Koyuncu M.A., Erbaş D., Üzümcü Sevinç S. (2017). The use of different controlled atmosphere and 1-Methylcyclopropene combinations in pear storage. VI. Postharvest Unlimited International Conference. (Özet Bildiri).
- 18- Secmen T., Güneyli A., Onursal C.E., Erbaş D., Koyuncu M.A. (2017). The effect of controlled and dynamic controlled atmosphere storage on the L-ascorbic acid content

and sugar profile of abbe fetel pear. XII International Controlled & Modified Atmosphere Research Conference (CAMA) (Özet Bildiri).

19- Secmen T., Onursal C.E., Güneyli A. (2017). The effects of postharvest salicylic acid treatments on vitamin C and sugar content of dr.jules guyot pear cultivar. 2nd International Balkan Agriculture Congress, (Özet Bildiri).

20- Secmen T., Onursal C.E., Güneyli A., Erbaş D. (2017). Physical and biochemical changes of sorrel (*Rumex Acetosella* L.) plant preserved under different temperature conditions. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species, (Özet Bildiri).

21- Secmen T., Onursal C.E., Güneyli A., Erbaş D. (2017). Biochemical changes of mint (*Mentha Piperita* L.) during postharvest storage at different temperatures. Advances in Lamiaceae Science Symposium, (Özet Bildiri).

22- Koyuncu M.A., Güneyli A., Erbaş D., Onursal C.E., Secmen T. (2017). Combined effects of MAP and postharvest salicylic acid treatment on quality attributes of dill (*Anethum Graveolens*) bunches during storage. 10th International FRUTIC Symposium Quality and Safety of Fresh Horticultural Commodities, (Özet Bildiri).

23- Güneyli A., Onursal C.E., Secmen T., Üzümcü Sevinç S., Koyuncu M.A. (2017). The use of janny MT box in cherry storage. 10th International FRUTIC Symposium Quality and Safety of Fresh Horticultural Commodities, (Özet Bildiri).

24- Koyuncu M.A., Erbaş D., Onursal C.E., Secmen T., Güneyli A., Üzümcü Sevinç S. (2017). Postharvest treatments of salicylic acid, oxalic acid and putrescine influences bioactive compounds and quality of hicaznar pomegranate during controlled atmosphere storage. XII International Controlled & Modified Atmosphere Research Conference (CAMA) (Özet Bildiri).

25- Onursal C.E., Erbaş D., Secmen T., Güneyli A. (2017). Effects of pre-and post-harvest 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatments on storage and shelf life of starkrimson delicious apple variety. 2nd International Balkan Agriculture Congress, (Özet Bildiri).

26- Güneyli A., Onursal C.E., Secmen T. (2017). The effects of ethylene applications after cold storage on “abbe fetel” type pears exposed to 1-MCP in differing doses following the harvest. 2nd International Balkan Agriculture Congress, (Özet Bildiri).

27- Güneyli A., Onursal C.E., Secmen T., Tuğrul Ay S., Çınar A., Üzümcü Sevinç S. (2017). Influence of different packaging and temperature on quality of foxtail lily (*Eremurus Spectabilis* bieb.) during shelf life. International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species, (Özet Bildiri).

28- Eren İ., Çalhan Ö., Onursal C.E., Güneyli A., Seçmen T., Akol S. (2015). Determination of optimum O₂ or CO₂ for apple cv. starkrimson delicious under controlled atmosphere storage. 6. International Scientific Agricultural Symposium, (Özet Bildiri).

29- Çalhan Ö., Eren İ., Seçmen T., Güneyli A., Onursal CE., Koyuncu MA. (2015). Determination of storage and shelf life quality of jeromine apple variety grown in the Isparta. 6. International Scientific Agricultural Symposium, (Özet Bildiri).

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1- Eren İ., Onursal C.E., Çalhan Ö., Seçmen T., Güneyli A., Akol S. (2016). Eğirdir koşullarında yetiştirilen starkspur golden delicious elma çeşidinde kontrollü atmosfer depolama için uygun atmosfer bileşiminin belirlenmesi. Bahçe Özel Sayı, 45(1), 148-154.

2- Çalhan Ö., Seçmen T., Güneyli A., Onursal C.E., Eren İ. (2016). Granny smith elma çeşidinde farklı depolama tekniklerinin toplam fenol ve antioksidan aktivitesi üzerine etkileri. Bahçe Özel Sayı, 45(1), 1181-1186.

3- Seçmen T., Onursal C.E., Küçükyumuk C., Eren İ., Güneyli A., Çalhan Ö. (2015). Farklı kısıtlı sulama stratejilerinin muhafaza süresince braeburn elma çeşidinde fenolik bileşenlere etkisi. Meyve Bilimi, 2(2), 16-21.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

1- Seçmen T., Erdoğan A., Çınar O., Tekin F. (2019). *Salvia multicaulis* (Adaçayı) ve *Mentha spicata subsp. tomentosa* (Nane) Uçucu yağlarının karakterizasyonu. IV. Bitkisel Yağ Kongresi. (Özet Bildiri).

2- Erdoğan A., Seçmen T., Çınar O., Tekin F. (2019). *Thymbra spicata* ve *Satureja macrantha* kekik türlerinin uçucu yağlarının karakterizasyonu. IV. Bitkisel Yağ Kongresi. (Özet Bildiri).

3- Seçmen T., Tanır A., Yüksel K. (2018). Antalya Konyaaltı ilçesinde doğal yayılış Malatura (*Foeniculum vulgare*) bitkisinin fitokimyasal içeriği. XXIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT 2018). (Özet Bildiri).

4- Seçmen T., Onursal CE., Güneyli A. (2015) Türkiye’de yetiştirilen abba fetel armut çeşidinin biyokimyasal içeriğinin HPLC ile belirlenmesi. 15. Ulusal Kromatografi Kongresi, (Özet Bildiri).

5- Seçmen T., Onursal CE., Güneyli A., Eren İ., Çalhan Ö., (2015). Kontrollü atmosfer koşullarında muhafaza edilen starkrimson delicious elma çeşidinde fenolik bileşenlerin değişimi. 2. İç Anadolu Tarım ve Gıda Kongresi, (Özet Bildiri).