T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MADIMAK BİTKİSİNDEKİ FENOLİK ASİT ve FLAVONOİDLERİN HPLC-DAD YÖNTEMİYLE TAYİNİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Reyhan AKPINAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU

Ocak, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 20.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Emre YÖRÜK
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2021-37844 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca her konuda yardımını gördüğüm, bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, tüm zorlu anlarımda bana destek veren, beni her daim bir adım ileri taşıyan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU'ya,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca, beni yetiştiren, tez çalışmalarım süresince laboratuvar imkânlarından yararlandığım, başta Sayın Prof. Dr. Ercan ARICAN olmak üzere, tüm Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim elemanlarına,

Antioksidan aktivite tayini çalışmaları esnasında bilgi ve tecrübesi ile yardımını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ'e,

Antimikrobiyal aktivite tayini çalışmalarım sırasında, laboratuvar imkânlarını kullanmama izin veren, bilimsel açıdan bana yol gösteren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI'ya ve hazırlık aşamasında yardımcı olan Yüksek Lisans öğrencisi Jale Nil GÜRSOY MACUN'a,

Çalışmalarım boyunca birçok konuda desteğini benden esirgemeyen Öğr. Gör. Gizem YILDIRIM BAŞTEMUR ile deneylerimde bana katkıda bulunan Biyoanalitik Kimya Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarıma,

Bugüne kadar her koşulda arkamda duran, her zorlu anımda bir adım yanımda olan biricik aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2022 Reyhan AKPINAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **xi**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xvi**
SUMMARY ..... **xviii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. MADIMAK (*Polygonum cognatum* Meissn.) BİTKİSİ 3
2.1.1. Madımak Bitkisinin Kullanım Alanları ve İçeriği 4
2.2. FENOLİK BİLEŞİKLER 4
2.2.1. Fenolik Asitler 5
2.2.2. Flavonoidler 6
2.2.3. Kumarinler 7
2.2.4. Stilbenler 8
2.3. ANTİOKSİDAN ANALİZ YÖNTEMLERİ 8
2.3.1. 2.2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi 9
2.3.2. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi 10
2.3.3. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi 10
2.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN ÖNEMİ 11
2.5. SİTOTOKSİSİTE ANALİZ YÖNTEMLERİ 12
2.5.1. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) 12
2.5.2. MTS (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3- (4-sülfofenil)) 13
2.5.3. XTT (2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid) 14
2.5.4. WST (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)- 2H tetrazolyum) 14
2.6. KROMATOGRAFİ 14
2.6.1. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) 15

2.6.1.1. HPLC Cihazı 16
2.6.1.2. Kromatografide Kullanılan Bazı Kavramlar 18
2.6.1.3. Metot Validasyonunda Kullanılan Parametreler 20
3. MALZEME VE YÖNTEM 22
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR 22
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR 24
3.3. ÇÖZELTİ VE BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI 25
3.3.1. Ekstraksiyon Çözeltileri 25
3.3.2. Antioksidan Aktivite Tayini Çözeltileri 25
3.3.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Besiyeri ve Çözeltileri 25
3.3.4. Sitotoksik Aktivite Tayini Besiyeri ve Çözeltileri 26
3.3.5. HPLC Tayini Çözeltileri 27
3.4. BİTKİ NUMUNELERİNİN HAZIRLANMASI VE EKSTRAKSİYONU 29
3.5. DPPH YÖNTEMİYLE İN VİTRO ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ 31
3.6. MADIMAK BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN TAYİNİ 32
3.6.1. Nokta-Damlatma Ekim (Spot-on-Lawn) Yöntemi 33
3.6.2. Madımak Bitkisinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) ve Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonunun (MBK/MFK) Belirlenmesi 34
3.7. MTT YÖNTEMİYLE *İN VİTRO* SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ 36
3.7.1. Hücre Kültürü ve Bitki Numunelerinin Uygulanması 36
3.7.2. MTT Yöntemi ile Aktivitenin Belirlenmesi 38
3.8. KROMATOGRAFİK KOŞULLAR 38
4. BULGULAR 40
4.1. DPPH YÖNTEMİYLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ BULGULARI 40
4.2. MADIMAK BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN TAYİNİ 43
4.2.1. Nokta-Damlatma Ekim (Spot-on-Lawn) Yöntemi Sonuçları 43
4.2.2. Madımak Bitkisinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) ve Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonu (MBK/MFK) Değerleri 45
4.2.2.1. MİK Değerleri 45
4.2.2.2. MBK/MFK Değerleri 46
4.3. MTT YÖNTEMİYLE SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ BULGULARI 47
4.4. HPLC-DAD ANALİZİ BULGULARI 50
4.4.1. Metot Optimizasyonu 50
4.4.1.1. A Mobil Fazı Yüzde Fosforik Asit Oranı Optimizasyonu 50

4.4.1.2. Akış Hızı Optimizasyonu 51
4.4.1.3. Kolon Sıcaklığı Optimizasyonu 53
4.4.2. Optimum Koşullar 54
4.4.3. Metot Validasyonu 55
4.4.3.1. Sistem Uygunluk Testleri 55
4.4.3.2. Doğrusallık 56
4.4.3.3. LOD-LOQ 60
4.4.3.4. Kesinlik 61
4.4.4. Madımak Bitkisindeki Fenolik Asit ve Flavonoidlerin Kantitatif Tayini 64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 68
KAYNAKLAR 78
ÖZGEÇMİŞ 88

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Madımak bitkisi. 3

Şekil 2.2: Fenolik asitlerin yapısı (Atak ve Uslu, 2018). 6

Şekil 2.3: Flavonoidlerin yapısı (Atınç ve Kalkan, 2018). 7

Şekil 2.4: Kumarinlerin yapısı (Şen ve Kalaycı, 2016). 8

Şekil 2.5: Stilbenlerin yapısı (Masuoka, 2021). 8

Şekil 2.6: DPPH radikalinin antioksidan ile reaksiyonu (Güneş ve diğ. 2014). 10

Şekil 2.7: [Fe(III)-TPTZ] kompleksinin antioksidan ile [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenmesi (Büyüktuncel, 2013). 10

Şekil 2.8: Bakır (I)- Neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatı (Büyüktuncel, 2013). 11

Şekil 2.9: NADH'ye bağlı redüktazlar tarafından MTT'nin formazana dönüştürülmesi (Badr, 2012). 13

Şekil 2.10: MTS'nin formazana enzimatik indirgenmesi (Kuete ve diğ. 2017). 13

Şekil 2.11: XTT'nin formazana enzimatik indirgenmesi (Kuete ve diğ. 2017). 14

Şekil 2.12: Kromatografi ayırma sürecinin şematik gösterimi. (A) Numune enjeksiyonu; (B) iki faz arasında dağılma; (C) mobil fazın ilerlemesi ve yeni denge; (D) bir dizi dağılma işleminden sonra iki bileşiğin ayrımı (Meyer, 2013). 15

Şekil 2.13: HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) Cihazı (Lozano-Sánchez ve diğ. 2018). 17

Şekil 3.1: A bitkisi hasat yeri. 29

Şekil 3.2: B bitkisi hasat yeri. 30

Şekil 3.3: Ekstraksiyon işleminin şematik gösterimi. 31

Şekil 3.4: Mikroorganizma süspansiyonlarının hazırlama aşaması. 33

Şekil 3.5: Nokta damlatma yöntemi ile tayin aşamasında hazırlanan Petri kabının şematik gösterimi. 34

Şekil 3.6: Mikroorganizmaların MİK değerlerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon tekniğinin mikroplakta şematik gösterimi. 35

Şekil 3.7: MBK/MFK belirlenmesinde hazırlanan Petri kabının şematik gösterimi. 36

Şekil 3.8: L929 hücre hattının kültür kabındaki görüntüsü (5x). 36

Şekil 3.9: SAOS-2 hücre hattının kültür kabındaki görüntüsü (5x). 37

Şekil 3.10: Hücre hatlarının mikroplağa ekimi. 37

Şekil 4.1: DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite tayini. 40

Şekil 4.2: L-Askorbik asit ile A ve B bitki esktraklarının farklı dozlarda DPPH radikal süpürme aktiviteleri. 41

Şekil 4.3: A bitkisi IC_{50} hesaplamasına ait grafik. 42

Şekil 4.4: B bitkisi IC_{50} hesaplamasına ait grafik. 42

Şekil 4.5: L-Askorbik asit IC_{50} hesaplamasına ait grafik. 42

Şekil 4.6: İnhibisyon zon çaplarının ölçüldüğü Petri kabı görüntüleri. 44

Şekil 4.7: Ölçülen inhibisyon zon çaplarının karşılaştırılması. 45

Şekil 4.8: Mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin belirlenmesi. 46

Şekil 4.9: MBK/MFK değerlerinin belirlendiği Petri kaplarının görüntüleri. 47

Şekil 4.10: MTT yöntemiyle sitotoksik aktivite tayini. 48

Şekil 4.11: L929 hücre hattında % hücre canlılık verileri. 49

Şekil 4.12: SAOS-2 hücre hattında % hücre canlılık verileri. 49

Şekil 4.13: 1. Protokateşik asit, 2. Kateşin, 3. Gentisik asit, 4. Kafeik asit, 5. p-Kumarik asit, 6. Polidatin, 7. Kumarin, 8. Resveratrol, 9. Ellajik asit 10. Kuersetin, 11. Diklofenak (I.S.) bileşiklerinin optimum koşullardaki standart karışım kromatogramı. 55

Şekil 4.14: Protokateşik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 57

Şekil 4.15: Kateşin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 57

Şekil 4.16: Gentisik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 58

Şekil 4.17: Kafeik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 58

Şekil 4.18: p-Kumarik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 58

Şekil 4.19: Polidatin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 59

Şekil 4.20: Kumarin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 59

Şekil 4.21: Resveratrol bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 59

Şekil 4.22: Ellajik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 60

Şekil 4.23: Kuersetin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği. 60

Şekil 4.24: A bitki ekstraktına ait kromatogram (1. Protokateşik asit, 2. Kateşin, 4. Kafeik asit, 5. p-Kumarik asit, 6. Polidatin, 7. Kumarin, 8. Resveratrol, 9. Ellajik asit 10. Kuersetin).....65

Şekil 4.25: A bitki ekstraktında bulunan bileşik miktarları (µg/mg). 66

Şekil 4.26: B bitki ekstraktına ait kromatogram (1. Protokateşik asit, 2. Kateşin, 4. Kafeik asit, 5. p-Kumarik asit, 6. Polidatin, 7. Kumarin, 8. Resveratrol, 9. Ellajik asit 10. Kuersetin).....66

Şekil 4.27: B bitki ekstraktında bulunan bileşik miktarları (µg/mg). 67

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.....22

Tablo 3.1 (devam): Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.....23

Tablo 3.1 (devam): Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.....24

Tablo 3.2: Çalışma sürecinde kullanılan cihazlar ve ait oldukları firmalar.....24

Tablo 3.3: Çalışılan madımak bitkileri ve özellikleri. 30

Tablo 3.4: Kromatografik Koşullar. 39

Tablo 4.1: L-Askorbik asit ile A ve B bitki esktraklarının DPPH radikal süpürme aktiviteleri sonuçları. 41

Tablo 4.2: Bitki ekstrakları ve L-Askorbik asit'e ait IC_{50} değerleri. 43

Tablo 4.3: Madımak bitkisi metanol ekstraktının mikroorganizmalarda oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....43

Tablo 4.4: Bitki ekstraktının mikroorganizmalara karşı MİK değerleri.....46

Tablo 4.5: Bitki ekstraktının mikroorganizmalara karşı MBK/MFK değerleri.....47

Tablo 4.6: A ve B bitki esktrakları ile kontrollere ait % hücre canlılık verileri. 48

Tablo 4.7: A mobil fazı yüzde fosforik asit oranı optimizasyonu verileri.....50

Tablo 4.7 (devam): A mobil fazı yüzde fosforik asit oranı optimizasyonu verileri.....51

Tablo 4.8: Akış hızı optimizasyonu verileri. 52

Tablo 4.9: Kolon sıcaklığı optimizasyonu verileri. 53

Tablo 4.9 (devam): Kolon sıcaklığı optimizasyonu verileri. 54

Tablo 4.10: Sistem uygunluk testi sonuçları.....56

Tablo 4.11: Bileşiklere ait doğrusal kalibrasyon verileri.....57

Tablo 4.12: Bileşiklere ait LOD-LOQ verileri. 61

Tablo 4.13: Gün içi kesinlik verileri.....62

Tablo 4.14: Günler arası kesinlik verileri. 62

Tablo 4.14 (devam): Günler arası kesinlik verileri. 63

Tablo 4.15: Gün içi RT verileri. 63

Tablo 4.16: Günler arası RT verileri.....64

Tablo 4.17: Madımak bitki ekstraktlarında bulunan bileşik miktarları (µg/mg). 65

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Santigrad derece
atm	: Atmosfer
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
k	: Kapasite faktörü
kg	: Kilogram
kob	: Koloni oluşturan birim
m	: Metre
M_A	: Molekül ağırlığı
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
N	: Etkin tabaka sayısı
nm	: Nanometre
R^2	: Korelasyon katsayısı
R_s	: Ayırma gücü
t_0	: Ölü zaman
t_r	: Alıkonma zamanı
v/v	: hacim/hacim
α	: Seçicilik
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen

DAD : Diyot dizi dedektörü
DMEM : Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyumu
DMSO : Dimetil sülfoksit
DPPH : 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
ELSD : Evaporatif ışık saçılım dedektörü
FBS : Fetal Bovine. Serum
FLD : Floresans dedektörü
HAT : Hidrojen temeline dayanan reaksiyonlar
HPLC : Yüksek Performanlı Sıvı Kromatografisi
I.S. : İç standart
IC_{50} : %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon
ICH : Uluslararası Uyum Konseyi
ISTE : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu
Kumarin : 7-Hidroksi-4-metilkumarin
LOD : Tayin Limiti
LOQ : Kantitatif Tayin Limiti
MBK : Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MS : Kütle spektrometresi
MTS : 5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3- 4-sülfofenil
MTT : 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NA : Nutrient Agar
NB : Nutrient Broth
NP-HPLC : Normal-fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
PBS : Fosfat Tamponlu Salin
ppm : µg/mL
RID : Kırılma indisi dedektörü
RP-HPLC : Ters-fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RSD : Relatif standart sapma
RT : Alıkonma zamanı
SD : Standart sapma
SDA : Sabouraud %4 Dekstroz Agar
SDB : Sabouraud %2 Dekstroz Broth
SET : Tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar

UV : Ultraviyole

WST : 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)- 2H tetrazolyum

XTT : 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MADIMAK BİTKİSİNDEKİ FENOLİK ASİT VE FLAVONOİDLERİN HPLC-DAD YÖNTEMİYLE TAYİNİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Reyhan AKPINAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU

Polygonaceae ailesine ait Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) ülkemizde kendiliğinden yetişen çok yıllık bir bitkidir. Bu bitki fenolik içerik bakımından zengindir. Fenolik bileşikler, bitkilerin en önemli sekonder metabolit grubunu oluştururlar ve bu bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal ve antikanserojen aktivitelerinin olduğu bilinmektedir. Hassasiyeti, doğruluğu ve kısa analiz süresinden dolayı yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılan en popüler analitik yöntemlerdendir.

Bu tez çalışmasında farklı zamanda ve farklı bölgelerden hasat edilen madımak bitkisinin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir. Bitkideki 10 fenolik bileşiğin (protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polidatin, kumarin, resveratrol, ellajik asit, kuersetin) eş zamanlı kalitatif ve kantitatif tayini için yeni bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Sivas (A bitkisi) ve Ordu (B bitkisi) illerinden toplanan ve soxhlet yöntemiyle ekstrakte edilen madımak bitkilerinin antioksidan aktivitesi DPPH yöntemiyle belirlenmiştir. Bitki ekstraktların IC_{50} değerleri A ve B bitkisi için sırasıyla, 0,781 mg/mL ve 0,657 mg/mL olarak saptanmıştır. Antimikrobiyal aktivite difüzyon ve dilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Nokta-damlatma ekim yönteminde ham ekstrakt mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır. Metanol ekstraktı en güçlü antibakteriyal aktiviteyi Gram negatif bakterilerden 23 mm inhibisyon zonu ile *Escherichia coli* bakterisine; 20 mm inhibisyon zonu ile Gram pozitif bakterilerden

Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) bakterisine; en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi 25 mm inhibisyon zonu ile *Candida albicans* mantarına karşı göstermiştir. Ham ekstraktın tüm derişimlerinde üreme görülmüş, metanol ekstraktında MİK değerleri tüm mikroorganizmalar için 4,75 mg/mL olarak saptanmıştır. MBK değeri Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) bakterisi için 5,00 mg/mL, diğer tüm mikroorganizmalar için için 4,75 mg/mL olarak belirlenmiştir. Sitotoksik aktivitenin tayinini L929 ve SAOS-2 hücre hatları üzerinde MTT yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. L929 hücre hattında A ve B bitkisinin % hücre canlılığı sırasıyla, %160,182-%121,992 ve %156,997-135,546 aralığında tespit edilmiştir. A ve B bitki ekstraktlarının negatif kontrole göre proliferatif etkisi gözlemlenmiştir. SAOS-2 hücre hattında A ve B bitkisinin % hücre canlılığı sırasıyla, %111,341-63,492 ve %137,141-%99,483 aralığında saptanmıştır. A bitki ekstraktının negatif kontrole göre antiproliferatif etkisi gözlemlenirken; B bitki ekstraktının ise sadece 10 mg/mL derişimde antiproliferatif etkisi gözlemlenmiştir.

Fenolik bileşiklerin eş zamanlı tayini için yeni bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiştir. Kromatografik tayinler SUPELCOSIL LC-18 (25cm x 4,6mm, 5µm) kolonunda gradient program ile gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, akış hızı ve kolon sıcaklığı optimize edilmiştir. Geliştirilen yöntemin validasyonunda sistem uygunluğu araştırılmış ve geliştirilen yöntemin önerilen değerlere uygun olduğu saptanmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 0,051- 0,188 µg/mL ve 0,169- 0,628 µg/mL aralığında hesaplanmıştır. Gün içi analizlerde % geri kazanım 99,273-101,032 ve %RSD 0,090-0,652; günler arası analizlerde % geri kazanım 99,017-101,983 ve %RSD 0,059-0,697 aralığında tespit edilmiştir. A ve B bitkilerinde en yüksek miktarda resveratrol; en düşük miktarda kafeik asit tayin edilmiştir. Her iki bitki ekstraktında gentisik asit bileşiğine rastlanmamıştır.

Ocak 2022, 87 sayfa.

Anahtar kelimeler: madımak, HPLC, antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DETERMINATION OF PHENOLIC ACID AND FLAVONOIDS IN MADIMAK PLANT BY HPLC-DAD, DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY

Reyhan AKPINAR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Sabriye PERÇİN ÖZKORUCUKLU

Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.), belonging to the Polygonaceae family, is a perennial plant that grows spontaneously in our country. This plant is rich in phenolic content. Phenolic compounds constitute the most important secondary metabolite group of plants and are known to have antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities. Due to its sensitivity, accuracy and short analysis time, high performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most popular analytical methods used for the qualitative and quantitative determination of phenolic compounds.

In this thesis study, the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of the madimak plant, which was harvested from different regions at different times, were investigated. A new HPLC-DAD method has been developed and validated for the simultaneous qualitative and quantitative determination of 10 phenolic compounds (protocatechuic acid, catechin, gentisic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, polydatin, coumarin, resveratrol, ellagic acid, quercetin) in the plant.

Antioxidant activity of madimak plants which are collected from Sivas (plant A) and Ordu (plant B) and extracted by soxhlet method was determined by DPPH method. The IC_{50} values of the plant extracts were determined as 0.781 mg/mL and 0.657 mg/mL for plant A and plant B, respectively. Antimicrobial activity was investigated by diffusion and dilution method. In

the Spot-on-Lawn method, the crude extract did not form an inhibition zone against microorganisms. Methanol extract has the strongest antibacterial activity from Gram negative bacteria to *Escherichia coli* bacteria with a 23 mm inhibition zone; From Gram positive bacteria to Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VRE) bacteria with a 20 mm inhibition zone; on the other hand, it has showed the strongest antimicrobial activity against *Candida albicans* with a 25 mm inhibition zone. An increase was observed in all concentrations of the crude extract, and MIC values in the methanol extract determined as 4.75 mg/mL for all microorganisms. MBC and MFC values were determined as 5.00 mg/mL for Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VRE) bacteria and 4.75 mg/mL for all other microorganisms. The determination of cytotoxic activity was performed on L929 and SAOS-2 cell lines by MTT method. Cell viability % of plant A and plant B in L929 cell line was determined as 160.182-121.992% and 156.997-135.546%, respectively. A and B plant extracts showed a proliferative effect compared to the negative control. In SAOS-2 cell line, cell viability % of plant A and B was determined in the range of 111.341-63.492% and 137.141- 99.483%, respectively. While the antiproliferative effect of plant A extract was observed compared to the negative control; the antiproliferative effect of plant B extract was observed only at 10 mg/mL concentration.

A new HPLC-DAD method has been developed for the simultaneous determination of phenolic compounds. Chromatographic determination was performed with the gradient program on the SUPELCOSIL LC-18 (25cm x 4.6mm, 5µm) column. The mobile phase, flow rate and column temperature are optimized. In the validation of the developed method, the system suitability was investigated, and it was determined that the developed method was in accordance with the recommended values. LOD and LOQ values were calculated in the range of 0.051- 0.188 µg/mL and 0.169- 0.628 µg/mL, respectively. In intra-day analyzes, recovery % was determined in the range of 99.273-101.032 and RSD% 0.090-0.652; in inter-day analyzes, recovery % was determined in the range of 99.017-101.983 and RSD% 0.059-0.697. The highest amount of resveratrol; the lowest amount of caffeic acid was determined in plants A and B. Gentisic acid compound was not found in both plant extracts.

January 2022, 87 pages.

Keywords: madımak, HPLC, antioxidant, antimicrobial, cytotoxic.

1. GİRİŞ

Ülkemizde görülen bitki çeşitliliği, ülkemizin sahip olduğu coğrafik koşullardan ileri gelmektedir. Bitkilerde gözlemlenen bu çeşitliliğin temel sebeplerinden birisi, yetişme ortamlarındaki çeşitliliktir (Avcı, 2012). Her bölgenin kendine özgü iklim, flora ve faunasının yapısı yetişen bitkilerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemektedir (Okcu ve Kaplan, 2018). Türkiye'de 12.000 civarında bitki taksonun varlığı bildirilmiştir. Bu sayı, Avrupa kıtasının tümünde birdirilen tür sayısına yakındır (Günal, 2013). Ülkemizde tespit edilen bitki türlerinden %30'u endemiktir (Cakilcioglu ve Turkoglu, 2010). Bitki türleri halk tarafından gıda, baharat, ilaç, çay; endüstriyel alanda boya, insektisit ya da kozmetik ürünler olarak kullanılmaktadır (Okcu ve Kaplan, 2018).

Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) bitkisi, ülkemizde geniş bir bölgede yayılım göstermektedir (Murathan, 2018). Madımak *Polygonaceae* ailesine mensup çok yıllık bir bitkidir (Eruygur ve diğ. 2020). Yol ve tarla kenarlarında kendiliğinden yetişen bitkinin, birçok hastalığın tedavisinde etkin bir rol oynadığı da bilinmektedir (Demir, 2006). Madımak bitkisinin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri daha önce rapor edilmiştir (Önen ve diğ. 2014). Alternatif tıpta ağrı kesici, yara iyileştirici ve diüretik olarak kullanılmaktadır (Ulusoy ve diğ. 2018). Bitkinin gıda olarak kullanımı yaygındır ve çiğ ya da pişmiş şekilde tüketimi mevcuttur (Okcu ve Kaplan, 2018). Bitki fenolik içerik bakımından oldukça zengindir (Murathan, 2018). Madımak bitkisinde flavonoid, kumarin, aromatik asit, antrakinon ve seskiterpenoid varlığı bildirilmiştir (Ulubelen ve diğ. 1992).

Fenolik bileşikler, bitkiler aleminin en önemli sekonder metabolit grubunu oluşturmaktadır. Bileşik grubunun antioksidan aktivite başta olmak üzere antimutajenik, antienflamatuvar, antikanseorejen aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Roleira ve diğ. 2018). Bitkilerde kumarinler, stilbenler, tanenler, lignanlar ve ligninler ile basit yapılı fenolik asitlerden, kompleks formda bulunan flavonoidlere kadar birçok fenolik bileşiğin varlığı saptanmıştır (Chandrasekara, 2019).

Antioksidan bileşikler, reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği hasarları önlemek amacıyla bu türlerin varlığını engelleyen bileşiklerdir (Karabulut ve Gülay, 2016). Antioksidanların tayini için hidrojen transferine dayanan reaksiyon (HAT) ve tek elektron transferine dayanan

reaksiyon (SET) yöntemleri bulunmaktadır. SET temelli DPPH (Difenil-1-pikrihidrazil) radikal süpürme kapasite yöntemi, bitkilerin antioksidan aktivite tayininde sıkça başvurulan yöntemlerden birisidir. Bu metot, redoks tepkimesine bağlı olarak DPPH radikalinin antioksidanlarca süpürülmesi temeline dayanır (Büyüktuncel, 2013; Scalzo, 2008). DPPH, antioksidan madde varlığında menekşe rengini kaybederek indirgenir (DPPH-H) (Albayrak ve diğ. 2010).

Mikroorganizmalar, çeşitli enfeksiyonel hastalık ve bu enfeksiyonlardan kaynaklı ölüm vakalarında en büyük etken olarak gösterilmektedir (Altanlar, 1999; Körkoca ve diğ. 2013; Şahin ve diğ. 2019; Yetkin ve diğ. 2017). Antibiyotik kullanımı bu enfeksiyonların tedavisinde en sık başvurulan yöntemlerdendir (Yıldırım Baştemur, 2019). Ancak uzun süreli kullanıma bağlı direnç oluşumu ve vücutta oluşan olumsuz etkiler bitkilerin mikroorganizmalara karşı etken madde kaynağı olabileceği düşüncesini doğurmuştur (Avşar ve diğ. 2016).

Hücre canlılığının saptanmasında, tetrazolyum tuzlarının kullanımı araştırmacılar tarafından kullanılan yöntemlerdendir (Freeberg ve diğ. 2019). MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksisitenin saptanmasında kullanılır (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). Yöntemin çalışma prensibi, MTT tuzunun mitokondriyal bağımlı bir reaksiyonla formazan kristaline indirgenmesi, formazan kristallerin hücrede birikmesi ve sonra kimyasal yollar kullanılarak serbest bırakılması temeline dayanır (Barile, 1997).

Kromatografi, bir karışım içerisinde birbirleriyle karışmayan bileşenlerin, durağan olan sabit faz ile mobil faz arasında dağılarak ayrılması temeline dayanır (Konak ve diğ. 2014). HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) yöntemi sıvı kromatografisi temellidir (Eser ve Sepici Dinçel, 2018) ve bir karışım içerisindeki bileşiklerin saflaştırılması, kalitatif ve kantitatif tayinlerinin yapılmasını sağlamaktadır (Crowley, 2020). Farklı çalışma alanları ile çok sayıda ve farklı yapıdaki bileşiklerin analizinde kullanılması, HPLC'yi diğer tekniklerden üstün kılmaktadır (Bengü, 2021; Özdural, 2017).

Bu çalışmada farklı zaman ve bölgelerden hasat edilen madımak bitkisinin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi, bu aktiviteden sorumlu oldukları düşünülen fenolik bileşiklerin eş zamanlı kalitatif ve kantitatif tayini için yeni bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MADIMAK (*Polygonum cognatum* Meissn.) BİTKİSİ

Polygonaceae ailesi, genellikle madımakgiller olarak bilinen çiçeksi bir bitki ailesidir (Tonny ve diğ. 2017). *Polygonaceae* ailesi, yaklaşık 50 cins içerisinde yaklaşık 1200 tür içerirken; ülkemizde bu aileye mensup 10 cins içerisinde yaklaşık 87 tür bulunmaktadır (Özer ve diğ. 1999; Uddin ve diğ. 2014). Bu bitkiler astım, bronşit, ishal, dizanteri, egzama, böbrek hastalığı, diş ağrısı, cüzzam, bağırsak parazitlerinin giderilmesi gibi çeşitli tıbbi amaçlar kullanılmaktadır (Tonny ve diğ. 2017).

Polygonum, Polygonaceae ailesinde yer alan bir cinstir (Shen ve diğ.2018). Dünyada yaklaşık 300; Türkiye'de ise 37 *Polygonum* türü mevcuttur (Çoban ve diğ. 2021). Bunlardan birisi de *Polygonum cognatum* Meissn. bitkisidir (Şekil 2.1). Türkiye'de yaygın olarak madımak ismiyle bilinen *Polygonum cognatum* Meissn. bitkisi, *Polygonaceae* ailesine mensup çok yıllık bir bitkidir (Eruygur ve diğ. 2020).



Şekil 2.1: Madımak bitkisi.

Bitkinin gövdesi toprağa yatık formda, yaprak kını gövde kısmını çevreleyen zarımsı yapıdadır. Yaprak elips şeklinde, ekseri sivri uçlu ve kısa saplıdır. Çiçekler kümeler halinde yaprakların koltuğunda, pembemsi renkte ve 4-5 mm boyutundadır (Demir, 2006). Madımak, ülkemizde özellikle Orta Anadolu'da ilkbahar aylarının başında yaprakları toplanabilen, 720-3000 m rakımlarda yol kenarları, yamaç ve kayalıklarda yetişmeye meyilli yabani bir bitkidir (Macar ve Kalefetoğlu Macar, 2018; Saraç ve diğ. 2018; Ulusoy ve diğ. 2018).

2.1.1. Madımak Bitkisinin Kullanım Alanları ve İçeriği

Madımak bitkisi, yerel halk tarafından çeşitli şekillerde gıda olarak kullanılmaktadır. Hasadının ilk zamanında konservesi yapılarak ya da yaprakları kurutularak saklandığı gibi çiğ yaprakları salata olarak da tüketilmektedir. Bitkinin ayrıca cacığı, mıhlaması, bükmesi, çorbası ve böreği yapılarak pişmiş sebze olarak tüketildiği de bilinmektedir (Çoban ve diğ. 2021; Murathan, 2018; Okcu ve Kaplan, 2018). Madımağın Türk mutfağında farklı kullanım alanlarının olması, bitkinin tanınmasına ve marketlere satılmak üzere İç Anadolu Bölgesi'nde ticari olarak madımak bitkisi ekimine başlanmasına olanak sağlamıştır (Önen ve diğ. 2014).

Madımak bitkisinin gıda olarak kullanımının yanı sıra tıbbi amaçlı kullanımı da mevcuttur. Bitkinin ağrı dindirme ve yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin yanında kıl kurdu ve solucanları tedavisinde, ayrıca diyabet hastalığının tedavisinde idrar söktürücü ve kan glikoz oranını düşürücü olarak kullanıldığı bilinmektedir (Cakilcioglu ve Turkoglu, 2010; Gürağaç Dereli ve diğ. 2019; Murathan, 2018; Ulusoy ve diğ. 2018). Bitkinin kurutulmuş kısımları, mide ve bağırsak hastalıklarına karşı demlenerek; kökleri ise böbrek taşları için kaynatılarak içilmektedir. İsiliklerin tedavisinde bitkinin yapraklarından elde edilen infüzyon kullanılmaktadır (Okcu ve Kaplan, 2018; Üçer, 2010). Madımak bitkisinin antimikrobiyal, antifungal böcek öldürücü, antioksidan etkileri içeriğindeki tanenler, flavonoid, glikozitler steroller, triterpenler, poliüronidler ve saponinlerden ileri gelmektedir (Gürağaç Dereli ve diğ. 2019).

Literatürde madımak içerisinde C vitamini ile flavonoid, kumarin, aromatik asit, antrakinon, seskiterpenoid ve karotenoid yapıları bulunduğu bildirilmiştir (Üçer, 2010; Yıldırım ve diğ. 2003). Ulubelen ve diğ. (1992) yaptıkları bir çalışmada madımak bitkisinden kuersetin-3-metil ether, kuersetin-3-glukozid, kuersetin-3-rutinozid, kamferol-3-metil eter, kamferol-3- glukozid, krizin, beta-sitosterol, p-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, gallik asit ve protokateşik asit bileşiklerini izole etmişlerdir. Saraç ve diğ. (2018) ise madımak bitkisini besin elementleri bakımından incelediklerinde, bitkinin %3,5 N, %0,259 P, %3,9 K, %0,51 Ca, %0,44 Mg, 144,7 mg/kg Fe, 40,3 mg/kg Zn, 30,1 mg/kg Mn ve 7,5 mg/kg Cu içerdiğini tespit etmişlerdir.

2.2. FENOLİK BİLEŞİKLER

Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın bir şekilde bulunan ve bitkilerin en önemli sekonder metabolitleri olarak kabul edilen, çeşitli kimyasal yapı ve aktivitelere sahip geniş bir kimyasal

bileşik grubunu oluştururlar (Barba ve diğ. 2014; Roleira ve diğ. 2018). Bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahiptirler. Kimyasal açıdan basit fenoller ve polifenoller olarak moleküldeki fenol birimlerinin sayısına göre sınıflandırılırlar (Roleira ve diğ. 2018). Büyük kimyasal değişkenlikleri, basit yapıdaki fenolik asitlerden karmaşık yapıdaki flavonoidlere kadar çok sayıda bileşiği içerir (Herrero ve diğ. 2013). Doğada bulunan tüm bitkiler, kendilerine gelecek zararlardan korunmak amacıyla farklı nitelik ve konsantrasyonda birçok fenolik bileşik üretirler ve bu bileşiklerin miktarları bitkiye göre değişkenlik göstermektedir. Bu bileşikler, dokularında bulundukları sebze ve meyvelere, renk ve tat verirler (Atak ve Uslu, 2018).

Fenolik bileşikler, bitki kimyasallarının üç ana grubundan birisini oluştururlar. Hem beslenme hem de tedavi amaçlı kullanım potansiyeline sahiptirler. Biyolojik açıdan başta antioksidan aktivite olmak üzere birçok aktiviteye sahiptirler. Bileşiklerin, hidroksil sübstitüentleri ile birlikte aromatik yapıya sahip olmaları insan dokularını hasardan korumalarını sağlar. Antimikrobiyal, antienflamatuvar, antiviral aktiviteye sahip olmalarının yanı sıra kanser, kardiyovasküler hastalık, katarakt, diyabet ve Alzheimer'a karşı etkili oldukları bilinmektedir (Karabulut ve Yemiş, 2019; Luna-Guevara ve diğ. 2018; Machmudah ve diğ. 2017; Roleira ve diğ. 2018). Fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler, stilbenler, tanenler, lignanlar ve ligninler bitkilerde en yaygın bulunan fenolik bileşiklerdendir (Chandrasekara, 2019).

2.2.1. Fenolik Asitler

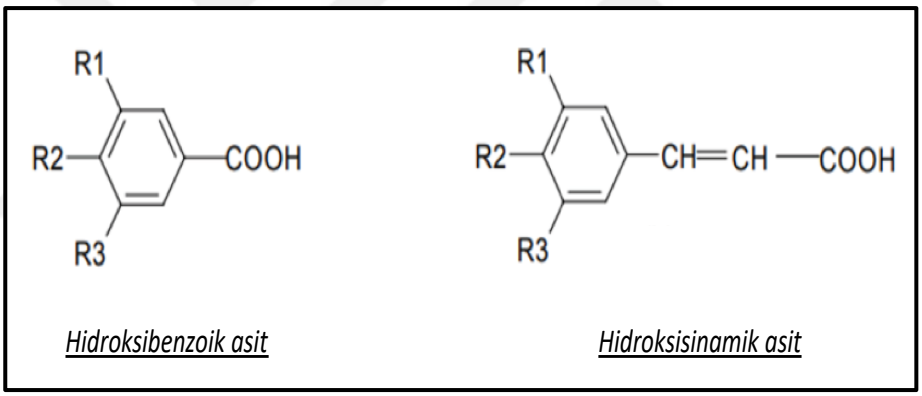
'Fenolik asit' kavramı karboksilik asit grubuna sahip fenolik bileşik olarak tanımlanır. Fenolik veya fenolkarboksilik asitler, bitkiler tarafından sentezlenen fenolik bileşiklerin ana sınıflarından birisidir (Kumar ve Goel, 2019). Bu asitler, en yaygın flavonoid olmayan bitki fenolik bileşikleri olmakla birlikte, fenolik bileşiklerin türevi olarak iki alt sınıfa ayrılırlar (Chandrasekara, 2019; Çağlar ve Demirci, 2017; Onat ve diğ. 2021). Hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinamik asitler bitki materyalinin her yerinde çeşitli seviyelerde bulunur (Chandrasekara, 2019).

Hidroksibenzoik asit: Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, 7 karbonlu fenilmetan yapısında olan hidroksibenzoik asit, benzoik asitten türetilmiştir. Bitkilerde genel olarak iz miktarda bulunmaktadır. Gallik asit, m-hidroksibenzoik asit, protokateşik asit ve gentisik asit

hidroksibenzoik asit sınıfına ait fenolik asitlerdir. Hidroksisinamik asitlere kıyasla, kırmızı meyvelerde, soğan ve kara turpta az bulunmaktadır.

Hidroksisinamik asitler: Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, 9 karbonlu fenilpropan yapısında olan hidroksisinamik asit, sinamik asitten türetilmiştir. Bu asitler, fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik göstermektedir. Ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve sinapik asit hidroksisinamik asit sınıfına ait fenolik asitlerdir (Çağlar ve Demirci, 2017; Kumar ve Goel, 2019; Onat ve diğ. 2021). Hidroksisinamik asitlerin antimikrobiyal, antikanserojen ve antidiyabetik etkileri olduğu bilinmektedir (Atak ve Uslu, 2018).

Fenolik asitler, bitkinin fizyolojisinde, ekolojisinde ve gelişiminde etkili olan biyoaktif moleküllerdir (Al Jitan ve diğ. 2018).

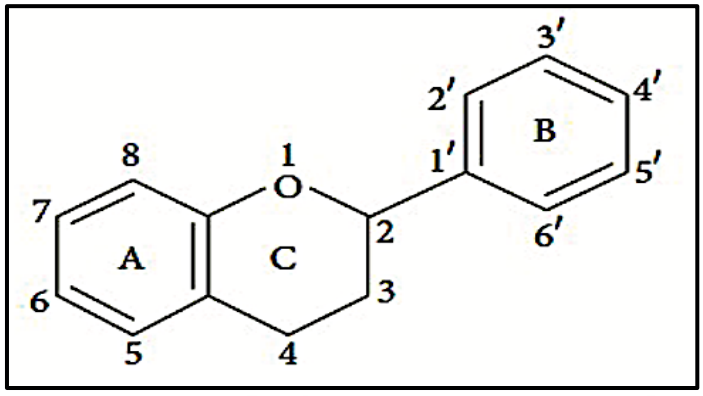


Şekil 2.2: Fenolik asitlerin yapısı (Atak ve Uslu, 2018).

2.2.2. Flavonoidler

Flavonoidler bitkilerde yaygın olarak bulunan, polifenol bileşikler grubuna dahil bitki sekonder metabolitlerdir. Renklerinden dolayı, latince 'sarı ' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilmişlerdir. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi, 15 karbon atomlu 2- fenil benzopiron (difenil propan) yapısında bulunurlar. (Kahraman ve diğ. 2002; Modena, 2014). Flavonoidler flavanol, flavon, flavonol, flavanon, izoflavon ve antosiyanidin olarak sınıflandırılırlar (Atınç ve Kalkan, 2018). Flavonoidler, bitki pigmentleri olarak iş görerek birçok bitkinin renklerinden sorumludurlar (Anonim, 2013). İnsan beslenmesinde büyük bir öneme sahip olan bu doğal polifenol grubu meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, ağaç kabuğunda, köklerde, gövdelerde, çiçeklerde, çay ve kırmızı şarapta bulunmaktadır. İnsanların yaklaşık olarak günlük 1 g

flavonoid aldığı tahmin edilmektedir (Kahraman ve diğ. 2002; Panche ve diğ. 2016). Sebzelerde en çok kuersetin ve kaemferol; meyvelerde ise kuersetin bulunmaktadır (Karakaya ve El, 1997).

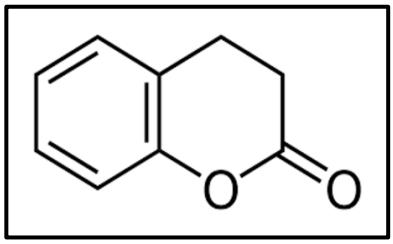


Şekil 2.3: Flavonoidlerin yapısı (Atınç ve Kalkan, 2018).

Flavonoidlerin insan sağlığı üzerinde yararlı etkileri bulunmaktadır ve bu bileşiklerin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir (Agić ve diğ. 2018). Flavonoidler antioksidatif, antienflamatuar, antimutajenik, antikanserojen, antiviral ve antiproliferatif etkilere sahiptirler. Yapılan çalışmalar sonucunda bu etkilerin bulunmasıyla flavonoidlerin gıda olarak kullanımının yanı sıra çeşitli farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda kullanımına başlanmıştır (Atınç ve Kalkan, 2018; Panche ve diğ. 2016).

2.2.3. Kumarinler

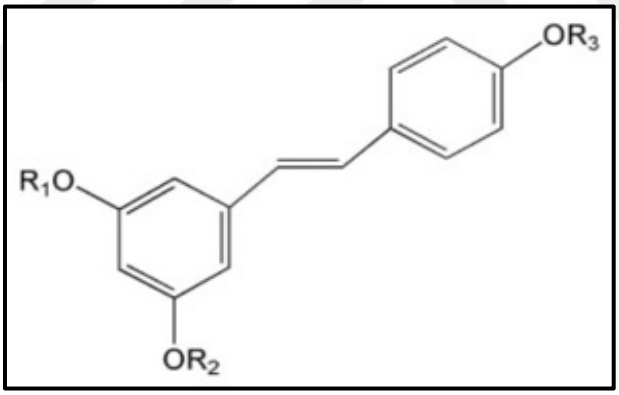
Kumarinler, 2H-1-benzopiran-2-on yapısında bitkilerde yaygın olarak bulunan doğal bileşiklerdir (Şekil 2.4). Lavanta, kayısı, çilek, kiraz ve tarçın gibi pek çok bitkinin meyve, kabuk, gövde ve yapraklarında bulunurlar. Kumarinlerin antibakteriyal, antifungal, antikanser ve antikoagulan aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Kumarine bağlanan fonksiyonel gruplar, bileşiğin farklı özelliklerini ortaya çıkarmakta ve bu özellikler kumarinin optik beyazlatıcı reaktif, fluoresans ve lazer boyarmadde olarak kullanımına yol açmaktadır. Ayrıca bu bileşik kozmetik ve temizlik endüstrisinde hoş koku kaynağı; gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Antony Muthu Prabhu ve diğ. 2018; Çelik Onar ve diğ. 2010; Karabacak ve diğ. 2010).



Şekil 2.4: Kumarinlerin yapısı
(Şen ve Kalaycı, 2016).

2.2.4. Stilbenler

Stilbenler flavonoid olmayan fenolik bileşikler grubundadır, stres altında sentezlenirler ve 1,2-difeniletilen yapısına sahiptirler. Temel yapılarını iki aromatik halkayı birleştiren bir metilen köprüsü oluşturmaktadır (Şekil 2.5). Stilbenlerin çoğu insan kullanımına uygun değildir. İnsanların kullanımına uygun olan ve en iyi bilinen stilben resveratroldür. Resveratrolün insan sağlığı üzerinde antioksidan, antiviral, kardiyoproteklif, antiobezite ve yaşlanma geciktirici etkileri olduğu bilinmektedir (Atak ve Uslu, 2018; Cai ve diğ. 2022; Gökçen ve diğ. 2017).



Şekil 2.5: Stilbenlerin yapısı (Masuoka, 2021).

2.3. ANTİOKSİDAN ANALİZ YÖNTEMLERİ

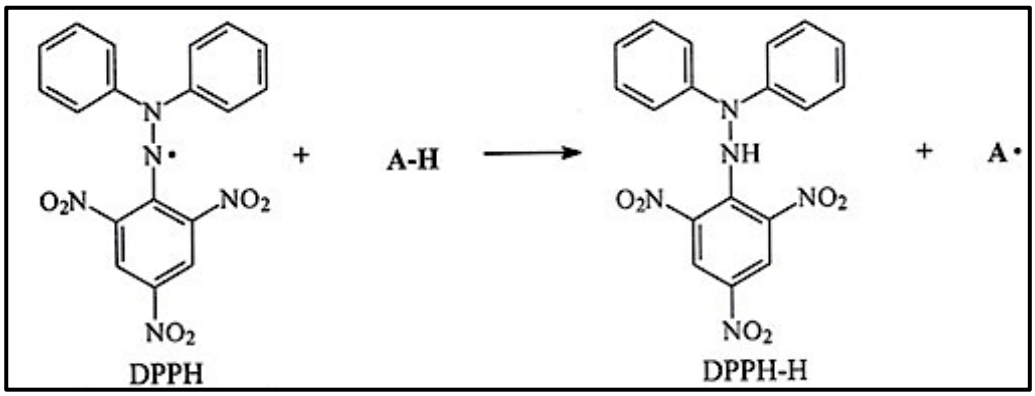
Antioksidanlar okside olabilen bileşiklerin oksidasyonunu önleyerek insanları serbest radikallerin oksidatif zararlarına karşı korurlar. Antioksidanların bakteriyel, kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı önleyici rol aldıkları bilinmektedir. Bitkiler, doğada en fazla antioksidan içeriğe sahip yapılardır. Gıdalardan bulunan antioksidan bileşiklerin içerik ve etkileri gıdaların cinsine, hasat yeri, hasat zamanı, hasat yöntemi, saklanma ve tüketme koşulları gibi parametrelere karşı değişkenlik göstermektedir (Güleşci ve Aygül, 2016; Meral ve diğ. 2012).

Antioksidan kapasitinin belirlenmesi için farklı sayı ve teknikte yöntem geliştirilmiştir (Albayrak ve diğ. 2010). Başlıca iki grupta değerlendirilen bu yöntemler, reaksiyon mekanizlarına göre hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT) ve tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (SET) olarak ayrılmaktadır (Büyüktuncel, 2013). HAT temeline dayanan yöntemler, antioksidan ve substratın azobileşiklerin bozulmasıyla oluşan peroksil radikallerinin rekabetini temel alır. Kısa sürede gerçekleşen bu reaksiyonlarda, çözücü ve pH etkisi kısmi olarak bağımsızdır. SET temeline dayanan yöntemler, antioksidanın oksidanı indirgeme yeteneğinin renk değişimi ile ölçümünü temel alır. HAT'a kıyasla daha uzun sürede gerçekleşen bu reaksiyonlarda, çözücü ve pH etkisi yüksektir (Okan ve diğ. 2013). Oksijen radikal absorbsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC), toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP) ve karotenoid (krosin) ağartma yöntemi HAT mekanizması; demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ve Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi SET mekanizması temelli yöntemlerdir (Büyüktuncel, 2013).

2.3.1. 2.2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi 1995 yılında Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, 1998 yılında Sanchez ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir (Okan ve diğ. 2013). DPPH• radikali, kararlı organik azot radikalleri olmasıyla birlikte ticari olarak kolayca temin edilebilir. Koyu menekşe rengine ve 515 nm'de maksimum absorbansa sahiptir (Büyüktuncel, 2013; Huang ve diğ. 2005). Bu metot redoks tepkimesine bağlı olarak DPPH radikalinin antioksidanlarca süpürülmesine dayanır (Büyüktuncel, 2013).

Menekşe rengi, molekülde serbest bir elektronun yer değiştirmesi sonucu oluşur. DPPH çözeltisi, antioksidan (A-H) ile karşılaştığında, antioksidan maddeden hidrojen atomu alarak menekşe rengini kaybeder ve indirgenmiş formu (DPPH-H) oluşur (Şekil 2.6). A• ise, bu reaksiyon sonucu oluşan yeni serbest radikaldir (Albayrak ve diğ. 2010).

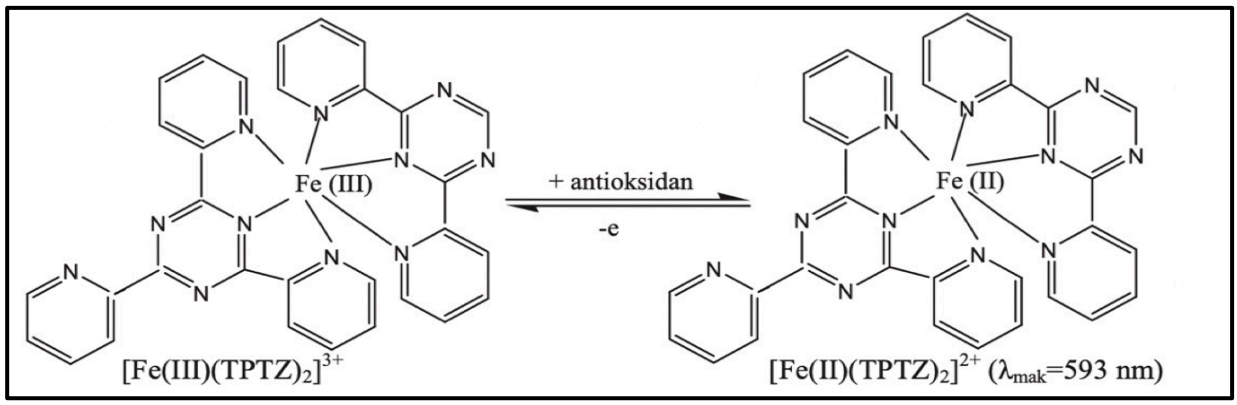


Şekil 2.6: DPPH radikalinin antioksidan ile reaksiyonu (Güneş ve diğ. 2014).

Bu yöntem, bitki ve gıda kaynaklı özüt ve bileşiklerin aktivitesini belirlemesindeki kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Scalzo, 2008).

2.3.2. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi

Benzei ve Strain tarafından geliştirilen yöntemde Fe(III), tripiridiltriazin (TPTZ) ile reaksiyona girerek [Fe(III)-TPTZ] kompleksini oluşturur. Oluşan kompleks, antioksidanlarca Fe(II)-tripiridiltriazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenir (Şekil 2.7) (Okan ve diğ. 2013). Koyu mavi renkteki bu kompleks 593 nm'de maksimum absorbans gösterir (Büyüktuncel, 2013).

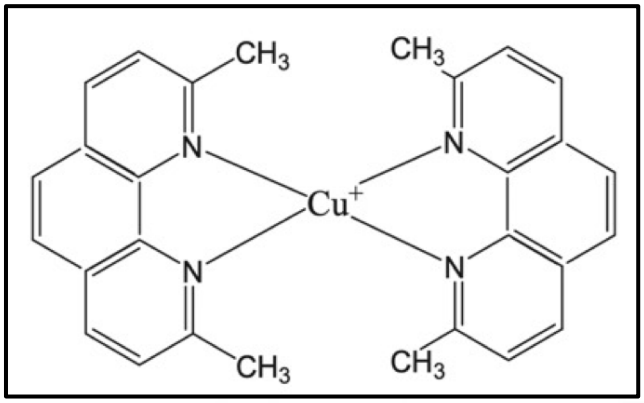


Şekil 2.7: [Fe(III)-TPTZ] kompleksinin antioksidan ile [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenmesi (Büyüktuncel, 2013).

2.3.3. Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Apak ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntem, Cu(II)'nin antioksidanlarca Cu(I)'e indirgenmesi ile temellendirilir. 2,9- dimetil-1, 10-fenantrolin (Neokuproin Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) kompleksi antioksidanlarca bakır (I)-

neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatına indirgenir (Şekil 2.8). Bu kompleks 450 nm'de maksimum absorbans gösterir (Apak ve diğ. 2004; Büyüktuncel, 2013; Okan ve diğ. 2013).



Şekil 2.8: Bakır (I)- Neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatı (Büyüktuncel, 2013).

2.4. ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTENİN ÖNEMİ

Dünyada yayılım gösteren bitkilerin çoğu çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Bitkilerin aktiviteleri arasında çeşitli sebeplerle oluşan yaralar üzerinde iyileştirici etkilerinin olduğu, yaralanmaya sonucunda oluşan enfeksiyonların tedavisinde etkin bir rol oynadıkları bilinmektedir (Benek ve diğ. 2021). Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik kullanımı sıklıkla tercih edilen bir seçenektir. Antibiyotiklerin sık ve kontrolsüz kullanımı bakteriyal direncin oluşmasına neden olur (Avşar ve diğ. 2016). Penisilin grubu antibiyotikler, bekterisid olma özellikleriyle nedeniyle çok sık kullanılır. Yan etkisinin az olması gibi olumlu etkilerine olmasına karşın yiyecek veya sulu ortamlarda varlığı, sağlık üzerinde olumsuz sonuçlar doğurmaktadır (Yıldırım Baştemur, 2019). Bitkiler antimikrobiyal aktivitelerinin saptanmasıyla, antibiyotik kullanımına karşı doğal bir seçenek olmaktadır (Avşar ve diğ. 2016).

Yapılan bir çalışmada, ventilatör ilişkili pnomoni vakalarında *Acinetobacter baumannii* bakterisinin, hastalığın oluşmasında en bütük etken olduğu bildirilmiştir (Şahin ve diğ. 2019). Tropikal ülkelerdeki ölümlerin yarısına yakınının enfeksiyon kaynaklı olduğu rapor edilmiştir. Afrika kıtasında *E. coli* ve *Salmonella* sp. suşları çocuklarda ölümle sonuçlanan enfeksiyonlara neden olmaktadır ve her yıl yaklaşık 300.000 çocuk bu enjeksiyonlardan hayatlarını kaybetmektedir (Yetkin ve diğ. 2017). Türkiye'de yapılan bir diğer çalışmada, yoğun bakımın ünitelerinde *S. aureus* kaynaklı enfeksiyon sayısı, toplam enfeksiyon vakalarının %18,2'sini oluşturmaktadır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) patojeni, gelişmiş

ülkelerdeki hastanelerde endemik olarak, sıklıkla ortaya çıkan bir patojendir. Deride bulunarak, direkt etkileşimlerde enfekte etme oranı yüksektir (Körkoca ve diğ. 2013). *Candida* türleri insanda en çok hastalığa neden olan mantar türleridir. Vanijit enfeksiyonlarının büyük bir kısmını *Candida* türlerinin, %80'inden fazlasında *C. albicans*'ın etken olduğu bildirilmiştir (Altanlar, 1999). Bu nedenle bu mikroorganizmaların tedavisinde, bitkiler gibi doğal kaynaklı alternatif tedavi yöntemlerinin tespiti önemli rol oynamaktır.

2.5. SİTOTOKSİSİTE ANALİZ YÖNTEMLERİ

Hücre kültürleri, biyolojik mekanizma veya süreçlerin farklı koşullar altındaki durumlarını incelemek amacıyla laboratuvar ortamında hücrelerinin büyümesine olanak veren modellerdir. *İn vitro* kültürler, *in vivo* hücrelerin mekanizmalarının araştırılmasında kullanılmaktadır (Polat, 2020). Hücre kültürleri *in vitro* sitotoksisite çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Tokur ve Aksoy, 2017).

Tetrazolyum tuzu bileşikleri, hücre canlılığının saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Tetrazolyum tuzları, katyonik tetrazolyum tuzları ve anyonik tetrazolyum tuzları olmak üzere iki ana başlıkta kategorize edilmektedir.

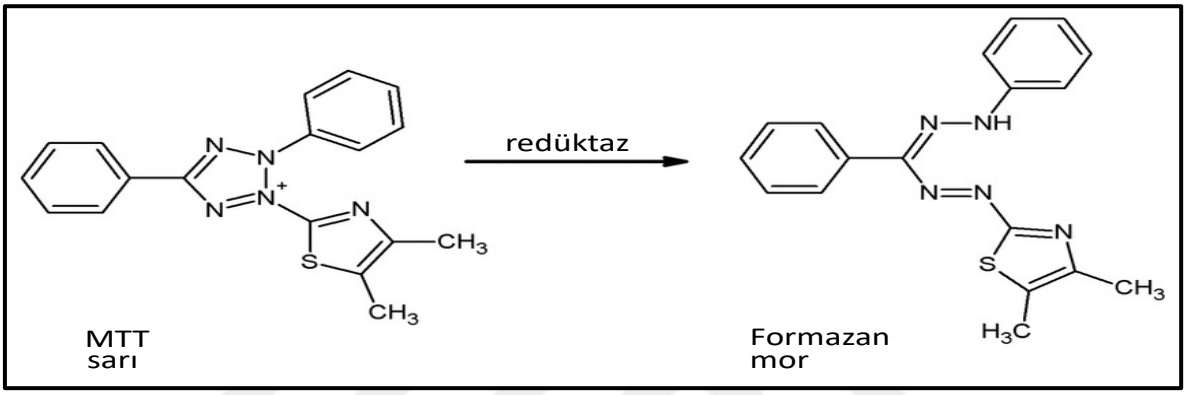
Katyonik tetrazolyum tuzları: Anyonik plazma membran ile canlı ökaryotik hücrelere elektrostatik etkileşim yollarıyla nüfuz eden tuzlardır. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) katyonik tetrazolyum tuzları sınıfına dahildir.

Anyonik tetrazolyum tuzları: Canlı hücrelere nüfuz edebilmesi bir elektron eşleme reaktifi aracılığıyla olmaktadır. MTS (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3- (4-sülfofenil)), XTT (2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid) ve WST-1 (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2, 4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum) anyonik tetrazolyum tuzları sınıfına dahildir (Freeberg ve diğ. 2019).

2.5.1. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)

MTT testleri, hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksisite belirlemesinde kullanılan kullanılmaktadır (Erkekoğlu ve Baydar, 2021). İlk defa 1983 yılında bilim insan Mossman tarafından ortaya çıkarılmıştır. Tetrazolyum halkasının aktif mitokondri tarafından parçalanarak MTT formazana indirgenmesiyle (haline gelmesine) ortaya çıkan renk değişimi

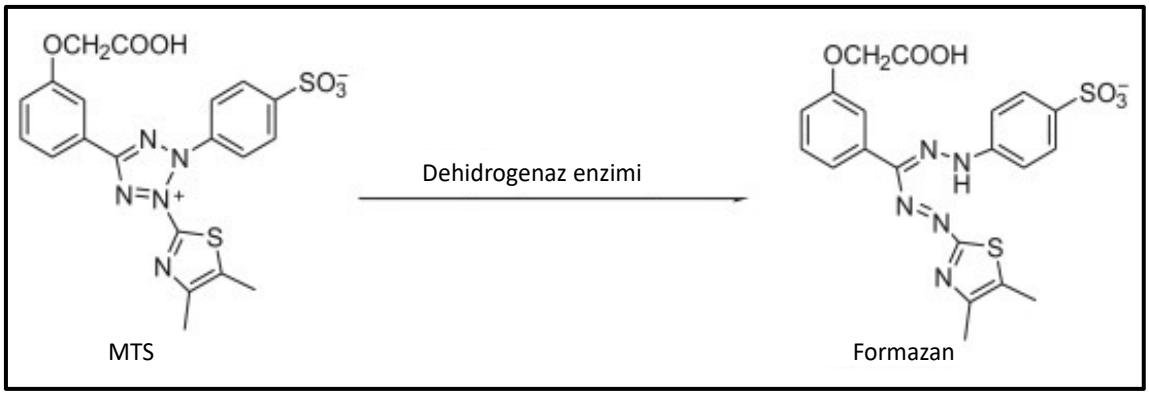
canlı hücrelerin saptanmasını sağlamaktadır (Boyraz ve diğ. 2021). MTT, aktif olarak hücreler tarafından absorbe edilir ve mitokondriyal bağımlı bir reaksiyonda mor renkli formazan kristallerine indirgenir (Şekil 2.9). Formazan hücre zarından geçemediği için hücre içerisinde birikmekte ve DMSO, izopropanol gibi çözücüler yardımıyla çözülüp serbest bırakılarak kolorimetrik olarak ölçülmektedir (Barile, 1997). Canlı hücre sayısındaki değişimler, 570 ve 720 nm'de optik yoğunluk cinsinden ölçülen formazan konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilir (Kumari ve Gupta, 2021).



Şekil 2.9: NADH'ye bağlı redüktazlar tarafından MTT'nin formazana dönüştürülmesi (Badr, 2012).

2.5.2. MTS (5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3- (4-sülfofenil))

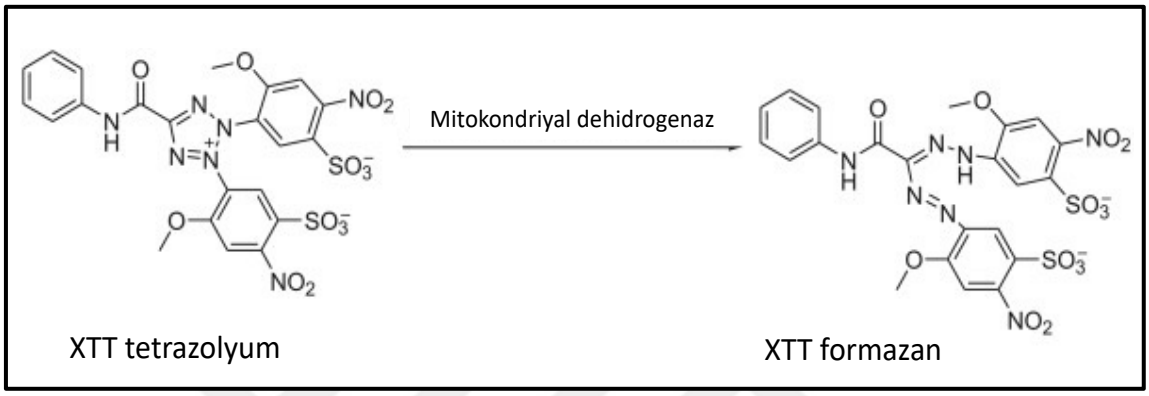
MTS tetrazolyum tuzlarından birisidir. MTT yöntemi ile aynı temele dayanan test, iç tuz metodu olarak da isimlendirilmektedir. Hücreler mitokondriyal dehidrojenaz enzimi aracılığıyla MTS'yi koyu pembe-kırmızı renkli formazan kristallerine indirger (Şekil 2.10). Formazan konsantrasyonu, optik okuyucuda 492 nm'de ölçülür (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).



Şekil 2.10: MTS'nin formazana enzimatik indirgenmesi (Kuete ve diğ. 2017).

2.5.3. XTT (2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid)

XTT, MTT gibi tetrazolyum tuzlarından birisidir ancak MTT'den farklı olarak indirgeme üzerine suda çözünür formazan oluşturur (Kumari ve Gupta, 2021). Sarı renkli XTT tuzu, metabolik olarak canlı hücrelerde, mitokondriyal dehidrojenazlar aracılığıyla turuncu suda çözünür bir XTT formazana indirgenir (Şekil 2.11) (Jiang ve diğ. 2016).



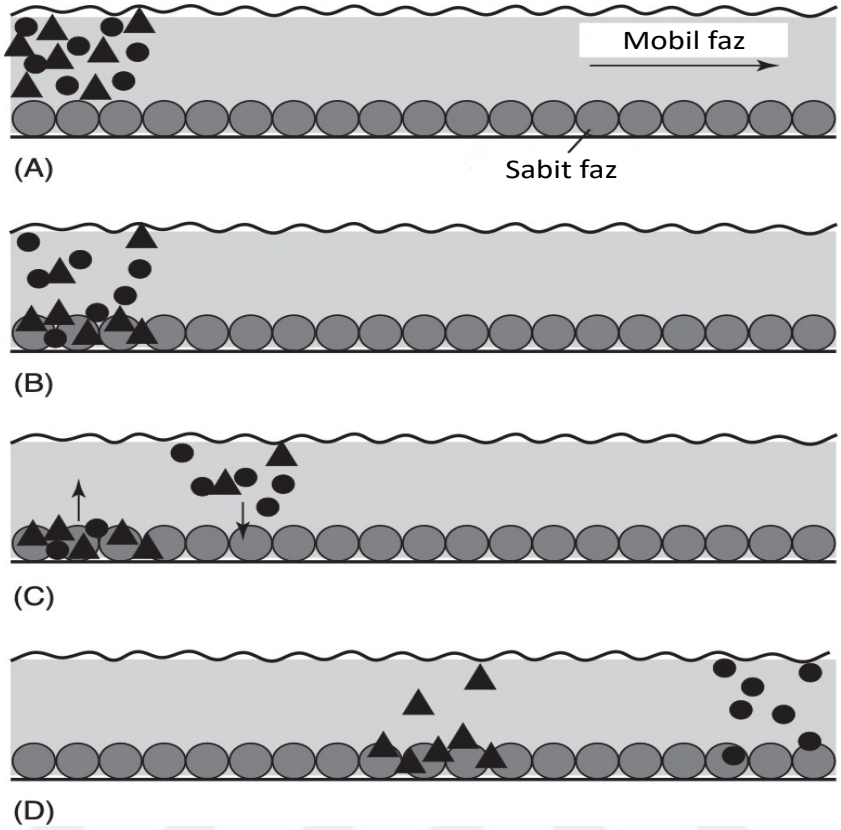
Şekil 2.11: XTT'nin formazana enzimatik indirgenmesi (Kuete ve diğ. 2017).

2.5.4. WST (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)- 2H tetrazolyum)

WST, suda çözünen tetrazolyum tuzlarınsan birisidir. En sık kullanılanı WST bileşiği, (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)- 2H tetrazolyum yapısındaki WST-1, diğeri ise 2-(2-metoksi-4- nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H tetrazolyum, monosodyum tuzu yapısındaki WST-8'dir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

2.6. KROMATOGRAFİ

Kromatografi tekniği, ilk kez Rus botanikçi Tswett tarafından 1906 senesinde renk verici bileşenleri ayrıştırmak için kullanılmıştır (Orhun, 1968). Kromatografi bir karışım içerisindeki bileşenlerin ayrılması, saflaştırılması ve tanımlanmasına olanak veren bir yöntemdir (Bozorg-Haddad ve diğ. 2021). Şekil 2.12'de gösterildiği gibi kromatografi, bir karışım içerisinde birbirleriyle karışmayan farklı bileşenlerin, hareketsiz olan sabit faz ile sabit faz boyunca hareket eden mobil faz arasında dağılarak ayrılmalarını sağlayan bir ayırma yöntemidir (Konak ve diğ. 2014).



Şekil 2.12: Kromatografi ayırma sürecinin şematik gösterimi. (A) Numune enjeksiyonu; (B) iki faz arasında dağılma; (C) mobil fazın ilerlemesi ve yeni denge; (D) bir dizi dağılma işleminden sonra iki bileşiğin ayrımı (Meyer, 2013).

Kromatografi şekerler, proteinler, farmasötikler, aminoasitler, tatlandırıcılar, gıdalar, enantiyomerler, izomerler ve izotoplar gibi kompleks karışımların ayrımında sıkça başvurulan bir yöntemdir (Özdural, 2017). Laboratuvar araştırmalarında hem mikro hem de makro düzeyde hassas ve seçici kantitatif analiz imkânı sağlaması nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Ankaralıgil ve Aydeniz-Güneşer, 2021).

2.6.1. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi)

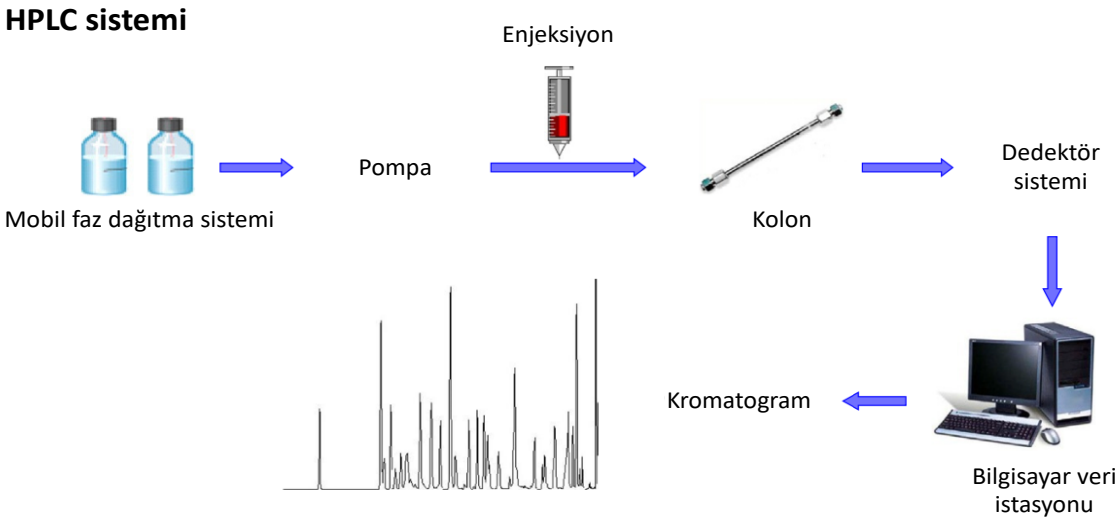
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) kısa süre içerisinde birçok molekülün yapısal ve fonksiyonel analizi ile birlikte saflaştırılmasına olanak veren bir sıvı kromatografi tekniğidir (Coskun, 2016). Genel olarak fen ve sağlık alanlarında bileşiklerin ayrılması, kalitatif ve kantitatif analizinde, gıda endüstrisinde gıdaların normal bileşenlerinin (şekerler, yağlar, proteinler, amino asitler ve organik asitler), gıda katkı maddelerinin (koruyucular, renkler, tatlar ve tatlandırıcılar), toksinlerin (mikotoksinler, balık biyotoksini) ve kimyasal kalıntıların

(gübreler, böcek ilaçları, antibiyotikler) analizinde kullanılmaktadır. (Alan Xu, 2013; Bengü, 2021; Nie ve Nie, 2019).

HPLC tekniği preparatif ve analitik bir tekniktir. Preparatif varyasyon, kompleks bir karışımdan bir bileşiğin saflaştırılmasını; analitik varyasyon ise kimyasal bileşiklerin yapısal ve fiziksel özelliklerinin karakterizasyonunu amaçlamaktadır (Crowley, 2020). HPLC normal-faz (NP-HPLC) ve ters-faz (RP-HPLC) olarak sınıflandırılmaktadır. Normal-faz HPLC'de kolonda bulunan dolgu maddesine (sabit faz) bağlı kimyasal yapılar çözücüden daha polar; ters-faz HPLC'de ise çözücü, dolgu maddesine (sabit faz) bağlı kimyasal yapılardan daha polardır. Polariteye dayalı sıvı kromatografisi yöntemleri, birçok bileşikte olduğu gibi süt ve süt ürünlerindeki vitamin analizlerinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Kromatografik ayrım boyunca sabit bir mobil faz bileşimi kullanılması izokratik ayrım; birden fazla mobil faz bileşimi kullanılması gradient ayrım olarak nitelendirilir (Salas-Tovar ve Sepulveda, 2022). Ters-faz HPLC yönteminde izokratik ve gradient programda asetonitril, su, metanol ve tamponların kullanımı mevcuttur (Crowley, 2020; Salas-Tovar ve Sepulveda, 2022).

2.6.1.1. HPLC Cihazı

Modern bir HPLC cihazı genellikle bir mobil faz dağıtım sistemi, numune enjeksiyon ünitesi, kolon, dedektör sistemi ve bilgisayar veri istasyonundan oluşur. Şekil 2.13'te modern bir HPLC cihazının şematik diyagramı gösterilmiştir (Lozano-Sánchez ve diğ. 2018).



Şekil 2.13: HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi) Cihazı (Lozano-Sánchez ve diğ. 2018).

Mobil faz şişeleri ve degasser: HPLC'de mobil faz, polar ve polar olmayan sıvı bileşenlerin karışımıdır ve numuneye bağlı olarak polaritesi değişmektedir (Goel ve Sahil Sharma, 2019). Genel olarak cam veya paslanmaz çelik şişeler içerisinde bulunurlar. Mobil faz çözeltilerinin saf olmaması, kolon ve numunede olumsuz etki oluşturarak analizde hatalara sebebiyet vermektedir. HPLC sisteminde mobil faz kaynaklı hava kabarcıklarının bulunması, pompa ve kolonda hasara yol açmaktadır. Pik genişlemesi veya alıkonma zamanında kaymayı önlemek amacıyla mobil fazda bulunan kabarcıklar, degasser sistemiyle giderilmektedir (Eser ve Sepici Dinçel, 2018).

Pompa: HPLC'de pompalar enjeksiyon ünitesi, kolon ve dedektör arasında sabit bir mobil faz akışını sağlamak için kullanılmaktadır (Nie ve Nie, 2019). Çalışma basıncı, kolon boyutu, partikül boyutu, akış hızı ve mobil faz bileşimine bağlıdır (Goel ve Sahil Sharma, 2019). Pompaların yüksek basınç kaynaklı dalgalanmalara neden olmaması, sabit bir akış sağlaması gerekmektedir. Sistemden dakikada geçen mobil fazın hacmi mL cinsinden ifade edilmektedir (Eser ve Sepici Dinçel, 2018).

Enjeksiyon ünitesi: Numune enjeksiyon sistemi, sıvı numuneden belirlenen miktarda çekilerek mobil fazla birlikte sistem içerisinde dolaşımına imkân sağlamaktadır (Lozano-Sánchez ve diğ. 2018). Eskiden kullanılan manuel enjeksiyon sistemlerinin aksine günümüzde gelişen teknolojiyle birlikte otomatik sistemler kullanılmaya başlanmıştır. Otomatik sistemlerin kullanılması, analizci ya da enjeksiyon kaynaklı hataları daha aza indirgemiştir (Bengü, 2021).

Kolon: Kolonlar kromatografik ayrımların gerçekleştiği yerlerdir (Bengü, 2021). Kromatografik yöntemlerde kolon düz, delikli ve paslanmak çelikten üretilmektedir. Bir kolonun çapı genel olarak 2-5 mm; uzunluğu 10-30 cm arasında değişmektedir. Kolon sıcaklığı bir fırın tarafından kontrol edilir (Lozano-Sánchez ve diğ. 2018). Organik metabolitlerin ayrımında sabit faz olarak her biri 18 karbon içeren dallanmamış alkanlardan oluşan C18 kolonları kullanılmaktadır (Crowley, 2020).

Dedektör: HPLC dedektörleri kolonun ardına yerleştirilerek kolonda ayrıştırılan analitleri sinyale çevirirler (Bengü, 2021; Goel ve Sahil Sharma, 2019). HPLC'de numunenin karakterine bağlı olarak farklı dedektör türleri kullanılmaktadır. Sıvı kromatografide sıklıkla kullanılan dedektörler ultraviyole dedektörü (UV), diyot dizi dedektörü (DAD), kırılma indisi dedektörü (RID), evaporatif ışık saçılım dedektörü (ELSD), floresans dedektörü (FLD) ve kütle spektrometresi dedektörü (MS)'dür (Nie ve Nie, 2019).

2.6.1.2. Kromatografide Kullanılan Bazı Kavramlar

Alıkonma zamanı (t_r)

Alıkonma zamanı, bir analitin kolonda sabit faz ile etkileşime girerek geçirdiği süre olarak tanımlanır. Analitin alıkonma süresi sabit faz ile girdiği etkileşime bağlıdır ve etkileşim ne kadar güçlüyse alıkonma süresi o kadar geç olur (Bushra, 2018). Alıkonma zamanı t_r ile ifade edilmektedir ve nicel analizler için karakteristiktir (Moldoveanu ve David, 2013; Robards ve diğ. 2004).

Kapasite faktörü(k)

Alıkonma faktörü olarak da isimlendirilen kapasite faktörü kromatografik analizler için önemli bir parametredir. Kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan "ölü zaman" (t_o), kolonda hiç tutunmayan analitlerin alıkonma zamanı olarak tanımlanmaktadır (Akyüz ve Ağırbaş, 2020). Kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan eşitlik, denklem 2.1'de gösterilmiştir (Fanali ve diğ. 2012).

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o} \qquad (2.1)$$

Teorik tabaka sayısı (N)

Kolon ekinliği (N), kolon uzunluğunun teorik tabaka yüksekliğine oranıdır ve kolonun teorik tabaka sayısı olarak nitelendirilir (Akyüz ve Ağırbaş, 2020). Teorik tabaka sayısı Denklem 2.2'ye göre hesaplanmaktadır (Lenehan, 2013).

$$N = 16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2 \quad \text{ve} \quad N = 5{,}545\left(\frac{t_r}{W_{1/2}}\right)^2 \tag{2.2}$$

Denklemler 2.2'de, w_b taban genişliğini; $w_{1/2}$= pikin yarı yüksekliğindeki genişliğini ifade etmektedir.

Seçicilik (α)

Seçicilik (α) iki komşu pikin bağıl alıkonmasının ifadesidir. Denklem 2.3'te gösterilen k_1, ilk pikin kapasite faktörü; k_2, ikinci pikin kapasite faktörünü temsil etmektedir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \tag{2.3}$$

Seçicilik aynı zamanda, ayırma faktörü ya da bağıl alıkonma olarak da ifade edilmektedir (Lozano-Sánchez ve diğ. 2018).

Ayırma gücü (R_s)

Ayırma gücü (R_s), komşu iki pikin birbirinden ayrılmasının ifadesi olarak, denklem 2.4'te verilen eşitliğe göre hesaplanmaktadır (Sadiq ve Beauchemin, 2020). Ayırma gücü etkin tabaka sayısı (N), seçicilik (α) ve kapasite faktörüne göre değişmektedir.

$$R_s = \frac{1}{4}\sqrt{N}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{k}{k+1}\right) \tag{2.4}$$

Denklemde N ikinci pikin etkin tabaka sayısını; k ikinci pikin kapasite faktörünü temsil etmektedir. R_s >1,5 ise iki pik arasında ayrımın gerçekleştiği kabul edilmektedir (Lenehan, 2013).

2.6.1.3. Metot Validasyonunda Kullanılan Parametreler

Analitik bir yöntemin validasyonu, yöntemin geçerliliğini kanıtlamak amacıyla yapılmaktadır. Belirli analitik bir prosedürden alınan sonuçların güvenilir ve doğru olduğunu ispatlamak için yapılan bir dizi doğrulama işlemlerinden oluşur. Analitik yöntemlerin validasyonuna ilişkin evrensel uygulamalar Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) tarafından belirlenmiş ve bu uygulamalar Q2 (R1), "Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Metin ve Metodoloji" kılavuzunda açıkça belirtilmiştir. Yöntemin valide edilmesinde geçerli olan terim ve metodolojilerin evrensel kullanımı bu belgeler ile sağlanmaktadır (Eldin, 2011).

Yöntem kalitatif, yarı kantitatif ya da kantitatif olarak kullanılmak üzere valide edilebilir. Bu validasyon işlemleri tek bir ekipman, tek bir analizci ile yapılabileceği gibi farklı analizci, farklı ekipman hatta farklı iklim ve çevresel koşullar altında kullanım amacıyla da yapılabilir. Her validasyon düzeyi için kriterler farklılaşmaktadır. Metot validasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan bazı parametreler sistem uygunluğu, doğrusallık, tayin limiti (LOD), kantitatif tayin limiti (LOQ), kesinlik ve doğruluktur (Eldin, 2011; Singh, 2013).

Sistem Uygunluğu

Sistem uygunluk testleri analiz edilecek ekipman, elektronik, analitik işlemler ve numunelerin değerlendirilebilecek bütünsel bir sistem oluşturduğu kavramına dayanmaktadır. Valide edilen prosedürün tipine göre, değerlendirilecek sistem uygunluk testi parametrelerini değişmektedir (ICH, 1995).

Doğrusallık

Bir yöntemin doğrusallığı belirli bir derişim aralığında analit derişimi ile elde edilen sonuçların doğru orantılı ilişkisiyle ifade edilmektedir. Bu derişim aralığı, yöntemde analiz edilecek analitlerin derişimlerini kapsayacak genişlikte olmalıdır. En az beş farklı derişim kullanılarak derişim aralığı oluşturulmalı ve analit derişimine karşı dedektör yanıtı (pik alanı veya yükseklik) grafiği geçirilmelidir. Çizilen eğrinin doğrusallığı korelasyon katsayısı (R^2) ile değerlendirilir. Analit derişimi arttıkça, alınan sonucunda aynı orantıda artması ya da azalması beklenir (Lister, 2005; Singh, 2013).

Tayin Limiti (LOD)

Tayin limiti (LOD), belirli kromatografik koşullar altında bir numunede bulunan analitin saptanabilen ancak kantitatif tayini yapılamayan en düşük derişim olarak belirlenmektedir (Shrivastava, 2011).

Kantitatif Tayin Limiti (LOQ)

Kantitatif tayin limiti (LOQ), belirli kromatografik koşullar altında bir numunede bulunan analitin kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukta belirlenebilen en düşük derişim olarak belirlenmektedir (Shrivastava, 2011).

Kesinlik

Kesinlik, numunenin tekrarlı analiz sonuçların birbiriyle uyumunun ölçüsüdür. Metot kesinliği, rastgele hataların dağılımını ifade eder ve dizi tekrarın relatif standart sapması (% RSD) olarak nitelendirilir (Bayraç ve Camızcı, 2020). Ölçülen standart sapma, tekrarlanabilirlik, orta-kesinlik ve tekrar üretilebilirlik olarak kategorize edilmektedir.

Tekrarlanabilirlik: Analiz içi kesinliktir ve belirli kromatografik koşullar altında (aynı cihaz, analizci, gün) kısa süre içerisindeki değişkenliği temsil etmektedir.

Orta-Kesinlik: Bir yöntemin tek bir laboratuvardaki değişkenliğini temsil etmektedir. Cihaz, analizci, ortam ve reaktif değişikliği gibi laboratuvar içi faktörlerin etkisi değerlendirilmektedir.

Tekrar Üretilebilirlik: Çevresel değişkenlerin mevcut olduğu laboratuvarlar arasındaki değişkenliği temsil etmektedir. Analizci, ortam, cihaz, reaktifler ve oda sıcaklığı gibi faktörler değerlendirilmektedir (Dally ve Monck, 2020).

Doğruluk

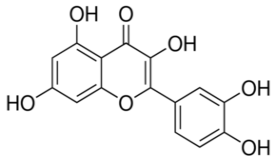
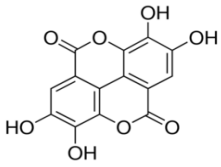
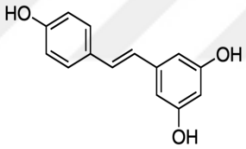
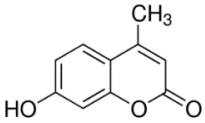
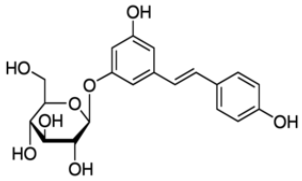
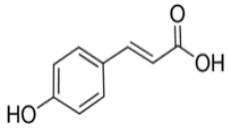
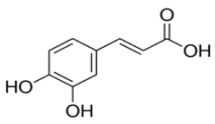
Bir yöntemin doğruluğu, yöntemden elde edilen sonucun teorik sonuca yakınlığı ile ifade edilmektedir. Yöntemden hesaplanan derişim, analitin teorik derişimine ne kadar yakınsa yöntem o kadar doğru kabul edilir. Doğruluğun hesaplanmasında kullanılan farklı metodolojiler bulunmasıyla birlikte en yaygın yaklaşım geri kazanım yüzdesinin değerlendirilmesidir. Yüzde geri kazanım [gözlemlenen değer/teorik değer x %100] eşitliğinden hesaplanmaktadır (Dally ve Monck, 2020).

3. MALZEME VE YÖNTEM

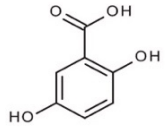
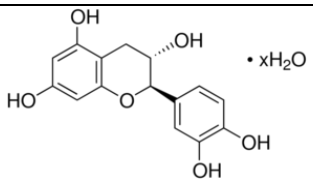
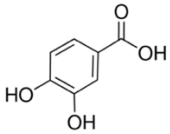
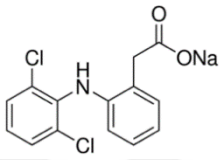
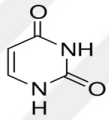
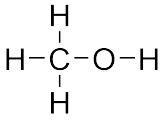
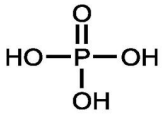
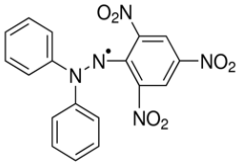
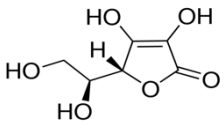
3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler yüksek saflıktadır ve ticari olarak temin edilmiştir. Kimyasallara ait formüller, molekül ağırlıkları, temin edildikleri firmalar ve kullanım amaçları Tablo 3.1'de verilmiştir.

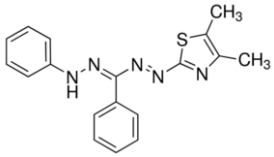
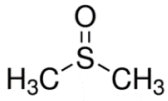
Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.

Kimyasalın Adı	Kimyasal yapısı	Amacı	Formül ve Özellikleri
Kuersetin		Standart olarak kullanılmıştır.	$C_{15}H_{10}O_7$ M_A= 302,27 g/mol USP Reference standard
Ellajik asit		Standart olarak kullanılmıştır.	$C_{14}H_6O_8$ M_A= 302,19 g/mol SIGMA
Resveratrol		Standart olarak kullanılmıştır.	$C_{14}H_{12}O_3$ M_A=228,24 g/mol SIGMA
Kumarin (7-Hidroksi-4-metilkumarin)		Standart olarak kullanılmıştır.	$C_{10}H_8O_3 \cdot H_2O$ M_A= 194,18 g/mol SIGMA
Polydatin		Standart olarak kullanılmıştır.	$C_{20}H_{22}O_8$ M_A=390,38 g/mol SIGMA
p-Kumarik Asit		Standart olarak kullanılmıştır.	$HOC_6H_4CH{=}CHCO_2H$ M_A=164,16 g/mol SIGMA
Kafeik Asit		Standart olarak kullanılmıştır.	$(HO)_2C_6H_3CH{=}CHCO_2H$ M_A=180,16 g/mol SIGMA

Tablo 3.1 (devam): Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.

Gentisik Asit		Standart olarak kullanılmıştır.	$(HO)_2C_6H_3CO_2H$ M_A=154,12 g/mol SIGMA
Kateşin hidrat		Standart olarak kullanılmıştır.	$C_{15}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$ M_A=290,27 g/mol SIGMA
Protokateşik Asit		Standart olarak kullanılmıştır.	$(HO)_2C_6H_3CO_2H$ M_A=154,12 g/mol SIGMA
Diklofenak sodyum tuzu		İç standart olarak kullanılmıştır.	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ M_A= 318,13 g/mol SIGMA
Urasil		T_0 olarak kullanılmıştır.	$C_4H_4N_2O_2$ M_A= 112,09 g/mol SIGMA
Metanol		*İn vitro* biyolojik aktivitenin belirlenmesinde, mobil faz olarak ve ekstraksiyon için kullanılmıştır.	CH_3OH M_A=32,04 g/mol SIGMA
Orto-fosforik asit		Mobil faz olarak kullanılmıştır.	H_3O_4P M_A=97,99 g/mol MERCK
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)		Antioksidan aktivite tayininde belirteç olarak kullanılmıştır.	$C_{18}H_{12}N_5O_6$ M_A= 394,32 g/mol SIGMA
L-Askorbik Asit		Antioksidan aktivite tayininde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.	$C_6H_8O_6$ M_A= 176,12 g/mol SIGMA

Tablo 3.1 (devam): Kullanılan Kimyasallar ve Özellikleri.

3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)		Sitotoksik aktivite tayininde belirteç olarak kullanılmıştır.	$C_{18}H_{17}N_5S$ M_A= 414,33 g/mol BioFroxx
Dimetil sülfoksit (DMSO)		Sitotoksik aktivite tayininde çözücü olarak kullanılmıştır.	$(CH_3)_2SO$ M_A= 78,13 g/mol SIGMA

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

Madımak bitkisinin ekstraksiyonu, *in vitro* sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin tayini, çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının belirlenmesi, metot optimizasyonu, metot validasyonu ve madımak bitkisindeki fenolik asit ve flavonoidlerin kantitatif tayininde kullanılan cihazlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Çalışma sürecinde kullanılan cihazlar ve ait oldukları firmalar.

Cihazlar	**Firma**
Etüv	Heraeus
Hassas Terazi (AX224)	Ohaus
HPLC Diode Array Dedektör (SPD-	Shimadzu
HPLC Gaz Giderme Ünitesi (DGU-	Shimadzu
HPLC Kolon Fırını (CTO-10AS)	Shimadzu
HPLC Pompa (LC-10AD VP)	Shimadzu
Isıtıcı (EM0500/CE)	Electrothermal
Kabin	Esco
Mikroskop	Zeiss
Otoklav (CLG-40M)	Alp
Rotary Evaporatör Cihazı	Heidolph
Soğutuculu Termostat (Alpha RA 8)	Lauda
Spektrofotometre Cihazı (Eon)	BioTek
SUPERCOSIL LC-18 kolonu	Supelco
Ultra Saf Su Cihazı	Direct Q-3 UV
Ultrasonik Karıştırıcı (Elmasonic)	Elma
Vortex Cihazi (SA8)	Stuart

3.3. ÇÖZELTİ VE BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Ekstraksiyon Çözeltileri

Madımak bitkisi soxhlet yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak %75 metanol-su (v/v) çalışılmıştır.

3.3.2. Antioksidan Aktivite Tayini Çözeltileri

DPPH çözeltisi

0,0016 g DPPH, 20 mL metanolde çözülerek 0,2 mM DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. DPPH çözeltisi alüminyum folyoya sarılarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

L- Askorbik Asit çözeltisi

1 mg L-Askorbik asit 1 mL deiyonize suda çözülmüştür. Dış etkenler sebebiyle bozunmaması amacıyla alüminyum folyo ile kaplanarak, karanlıkta muhafaza edilmiştir.

3.3.3. Antimikrobiyal Aktivite Tayini Besiyeri ve Çözeltileri

SDA (Sabouraud %4 Dekstroz Agar) hazırlanışı

Ticari olarak temin edilen Sabouraud %4 Dekstroz Agar (SDA) besiyerinden 65 g tartılmış, üzerine 1000 mL deiyonize su ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 1 atm basınç altında, 121 °C, 15 dakika süresince otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Steril edilen besiyerleri yaklaşık 45-55 °C'ye soğutulup Petri kabına dökülmüş, katılaştıktan sonra deney öncesi 24-48 saat sterilite kontrolünün ardından deneylerde kullanılmıştır.

SDB (Sabouraud %2 Dekstroz Broth) hazırlanışı

Ticari olarak temin edilen Sabouraud %2 Dekstroz Broth (SDB) besiyerinden 30 g tartılmış, üzerine 1000 mL deiyonize su ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 1 atm basınç altında 121 °C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

NA (Nutrient Agar) hazırlanışı

Ticari olarak temin edilen Nutrient Agar besiyerinden 20 g tartılmış, üzerine 1000 mL deiyonize su mezür ile ölçülerek eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri 1 atm basınç altında, 121 °C, 15 dakika süresince otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Steril edilen besiyerleri yaklaşık 45-55 ^{o}C'ye soğutulup Petri kabına dökülmüş, katılaştıktan sonra deney öncesi 24-48 saat sterilite kontrolünün ardından deneylerde kullanılmıştır.

NB (Nutrient Broth) hazırlanışı

Ticari olarak temin edilen Nutrient Broth besiyerinden 8 g tartılmış, üzerine 1000 mL deiyonize su mezür ile ölçülerek eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri uygun hacimlerde vida kapaklı tüplere dağıtıldıktan sonra, 1 atm basınç altında, 121 °C, 15 dakika süresince otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

3.3.4. Sitotoksik Aktivite Tayini Besiyeri ve Çözeltileri

DMEM-F12 besiyeri hazırlanışı

BioFroxx'tan ticari olarak temin edilen Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyumu, besleyici karışım F12 Ham medyumu (DMEM-F12) DMEM ve F12 ortamlarının karıştırılmasıyla elde edilmektedir.

DMSO ve FBS çözeltileri

DMSO (Dimetil sülfoksit) ve FBS (Fetal Bovine. Serum) çözeltileri Sigma'dan ticari olarak temin edilmiştir.

MTT çözeltisi

MTT çözeltisi, BioFroxx'tan ticari olarak temin edilen MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) boyasının 5 mg tartılarak 1 mL PBS (Fosfat Tamponlu Salin) içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti alüminyum folyo ile kaplanarak, karanlıkta -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.5. HPLC Tayini Çözeltileri

Mobil Faz Çözeltilerinin Hazırlanışı

Madımak bitkisindeki fenolik asit ve flavonoidlerin eş zamanlı kalitatif ve kantitatif tayininde gradient yöntem kullanılmıştır. Mobil faz optimizasyonunda mobil faz A olarak %0,0- 0,01- 0,1 -0,5 ve 1,0 (v/v) fosforik asit içeren fosforik asit-su ikili karışımları; mobil faz B olarak metanol kullanılmıştır. Deney süresince kullanılan tüm mobil faz çözeltileri günlük olarak hazırlanmıştır.

Hacimce yüzdeleri farklı olan A mobil fazının hazırlanması:

%0,0 (v/v) fosforik asit-su ikili karışımı; 500 mL deiyonize su kullanılmıştır.

%0,01 (v/v) fosforik asit-su ikili karışımı; Deiyonize su içerisine 0,05 mL orto-fosforik asit ilave edilerek hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır.

%0,1 (v/v) fosforik asit-su ikili karışımı; Deiyonize su içerisine 0,5 mL orto-fosforik asit ilave edilerek hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır.

%0,5 (v/v) fosforik asit-su ikili karışımı; Deiyonize su içerisine 2,5 mL orto-fosforik asit ilave edilerek hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır.

%1,0 (v/v) fosforik asit-su ikili karışımı; Deiyonize su içerisine 5,0 mL orto-fosforik asit ilave edilerek hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır.

Mobil faz çözeltilerinde oluşan hava kabarcıklarının HPLC sisteminde gaz oluşturmasını önlemek amacıyla, hazırlanan mobil faz çözeltileri ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

Stok Standart Çözeltilerinin Hazırlanışı

Kromatografik ayrımları yapılacak standart bileşiklerin (protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polidatin, kumarin, resveratrol, ellajik asit, kuersetin) stok çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. 0,0025 g standart bileşikler 5 mL metanolde çözülerek hazırlanan 500 ppm'lik stok çözeltilerden seyreltmeler metanol ile yapılmış ve +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

İç Standart Çözeltisinin Hazırlanışı

Kromatografik analizlerde iç standart (I.S.) tekniği tayin verimliliğini arttırmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İç standart, numune ve kalibrasyon standartlarına belirli miktarda ilave edilmektedir. Analiz sürecinde numunedeki kayıp, iç standardın kaybıyla eşit oranda olacağından hem sistematik hem de rastgele hatalar kayda değer şekilde düzeltilmektedir (Hışıl, 1985). Bileşiklerin analizinde ayırma gücü, seçicilik ve alıkonma zamanı gibi parametreler göz önünde bulundurularak iç standart olarak diklofenak seçilmiştir. İç standartın 500 ppm'lik stok çözeltisi metanol içerisinde hazırlanmıştır ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

T_0 Çözeltisinin Hazırlanışı

Ölü zaman (T_0), sabit faz ile etkileşime girmeyen ve kolonda tutunmayan bir bileşiğin kolondan çıkış süresi olarak adlandırılır. Çalışılan bileşiklerin kapasite faktörlerinin belirlenmesinde urasil bileşiği T_0 olarak seçilmiştir. Urasilin 20 ppm'lik çözeltisi metanol içerisinde hazırlanmıştır ve +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Sistem Uygunluk Çalışma Çözeltileri Hazırlanışı

Sistem uygunluk testleri geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için yapılmaktadır. Alıkonma zamanı (t_R), kapasite faktörü (k), seçicilik (α), kuyruklanma faktörü (T_f), teorik tabaka sayısı (N) ve ayırma gücü (R_s) gibi parametreler araştırılmıştır. Sistem uygunluğunu değerlendirmek için 35 ppm protokateşik asit, 65 ppm kateşin, 30 ppm gentisik asit, 20 ppm kafeik asit, 45 ppm p-kumarik asit, 35 ppm polidatin, 75 ppm kumarin, 30 ppm resveratrol, 15 ppm ellajik asit, 25 ppm kuersetin ve 40 ppm diklofenak stok çözeltilerinden %50 metanol-su ile seyreltilmiştir. Sistem uygunluk parametrelerinin değerlendirilmesi optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Kalibrasyon Çözeltileri Hazırlanışı

Geliştirilen yöntem ile nicel analizin gerçekleştirilmesinde standartların kalibrasyon çözeltileri ana stoklarından hazırlanmıştır. İç standart kalibrasyon yöntemi kullanılmıştır. Kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve çalışmanın doğrusal olduğu aralıklar tespit edilmiştir. Çalışılan tüm bileşikler için derişim aralığı, 0,25-10 ppm aralığında beş derişimden oluşturulmuştur.

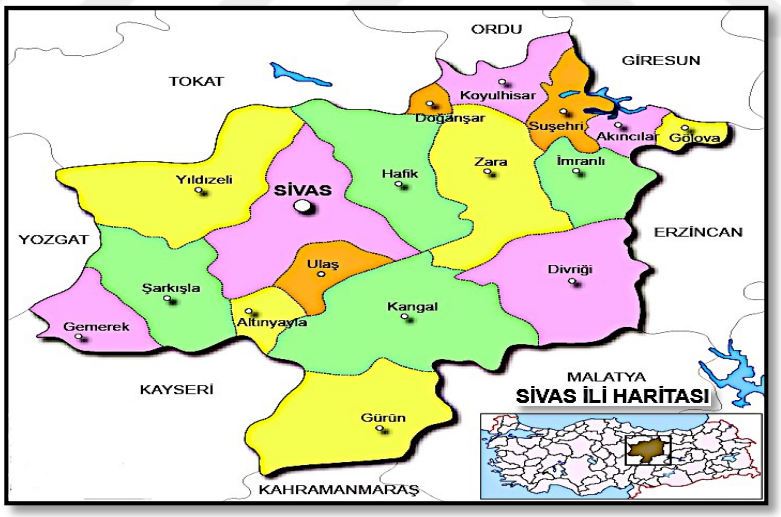
Kalibrasyon çözeltileri 50 ve 500 ppm stok çözeltilerinden metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. İç standart olarak 1 ppm diklofenak kullanılmıştır.

Gün İçi ve Günler Arası Çalışma Çözeltileri Hazırlanışı

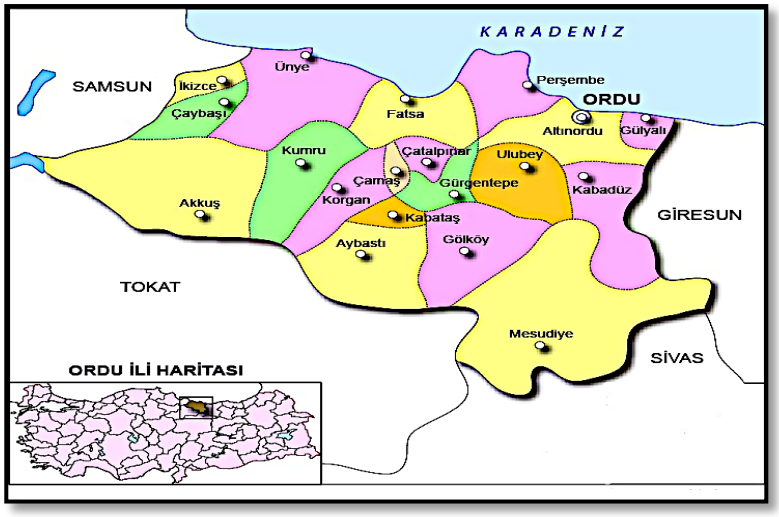
Geliştirilen yöntemin kesinliğinin saptanması amacıyla gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Çalışılan tüm bileşikler için 0,5 ve 5 ppm derişimlerinde çalışılmıştır. Gün içi çalışmalar gün içerisinde 3 farklı zamanda; günler arası çalışmalar 3 farklı günde en az 3 tekrarlı enjeksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. BİTKİ NUMUNELERİNİN HAZIRLANMASI VE EKSTRAKSİYONU

Madımak bitkisi Sivas ili İmranlı ilçesi ve Ordu ili Mesudiye ilçesi olmak üzere iki farklı şehir, iki farklı bölge ve iki farklı zamanda toplanmıştır (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). Toplanan bitkilerin tür tayinleri İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Şükran Kültür tarafından yapılmıştır ve ISTE numaraları verilmiştir (Tablo 3.3).



Şekil 3.1: A bitkisi hasat yeri.

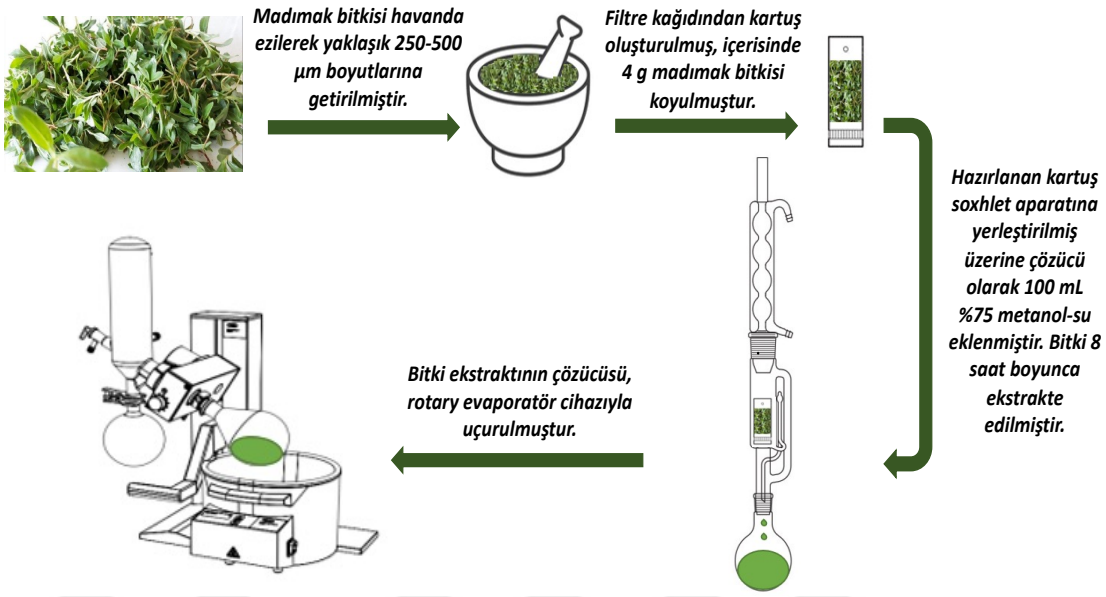


Şekil 3.2: B bitkisi hasat yeri.

Tablo 3.3: Çalışılan madımak bitkileri ve özellikleri.

Bitki	Sistematik Adlandırılması	Örnek Numarası (ISTE)	Hasat Zamanı	Hasat Yeri	Kısaltma
Madımak	*Polygonum cognatum* Meissn	117087	Mayıs, 2020	Sivas-İmranlı	A
Madımak	*Polygonum cognatum* Meissn	117223	Temmuz, 2020	Ordu-Mesudiye	B

Tür tayinleri yapılan bitkiler gün ışığına maruz bırakılmadan laboratuvar ortamında kurutulmuştur. Kurutulan bitkiler ekstraksiyon işlemine kadar +4 ^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Madımak bitkisinin ekstraksiyonu, soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bitkiler havan içerisinde ezilerek yaklaşık olarak 250-500 µm boyutuna getirilmiştir. Bitki örneklerinden 4,0 g tartılarak, filtre kağıdından oluşturulmuş bir kartuş içerisine koyulmuştur. Kartuş soxhlet aparatına yerleştirilmiş, üzerine çözücü olarak 100 mL %75 metanol-su (v/v) eklenmiştir. Ekstraksiyon 8 saat süresince gerçekleştirilmiş ve çözücü 70 °C'de rotary evaporatör cihazı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Ekstraksiyon işleminin şematik gösterimi Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3: Ekstraksiyon işleminin şematik gösterimi.

Çözücüsü uçurulan bitki ekstraktları *in vitro* biyolojik aktivite tayinlerinin belirlenmesi ile fenolik asit ve flavonoidlerin kantitatif analizleri yapılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraktların stok çözeltileri 10 mg tartılıp 1 mL metanol ile ultrasonik karıştırıcı içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Deney öncesinde gerekli seyreltmeler metanol ile yapılmıştır. Bitki ekstraktlarını steril hale getirmek ve enjeksiyon sırasında HPLC cihazına verilebilecek zararlardan kaçınmak amacıyla çözeltiler 0,45 µm filtreden süzülmüştür. Hazırlanan tüm ekstraktlar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5. DPPH YÖNTEMİYLE İN VİTRO ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ

DPPH radikal süpürme yöntemi, ekstraktların antioksidan aktivite kapasitesini tayin etmek için kullanılır. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ticari olarak temin edilebilen, koyu menekşe rengine sahip kararlı bir organik azot molekülüdür. Metanolik çözeltilerde DPPH radikalleri, 520 nm'de maksiumum absorbansa sahiptirler. DPPH radikalleri bitki ekstraktlarıyla reaksiyona girdiğinde, ekstraktın antioksidan aktivitesine göre çözeltide renk değişimi gözlemlenmektedir. Çözelti renginin koyu menekşeden sarı rengine dönüşümü yüksek antioksidan aktivitenin gözlemlenebilen bir ifadesidir (Büyüktuncel, 2013; Gidemen, 2021).

A ve B Madımak bitkisi ekstreleri toksik olan ve olmayan dozları ile IC_{50} değerleri bakımından antioksidan aktivite potansiyelleri, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme yöntemi ile araştırılmıştır.

Antioksidan aktivite tayininde 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL bitki ekstre derişimleri, 10 mg/mL bitki stok çözeltilerinden metanol ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan 1 mg/mL L-Askorbik asit stok çözeltisinden 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL derişimlerine seyreltmeler deiyonize su ile yapılmıştır. 1. Negatif kontrol olarak metanol; 2.negatif kontrol olarak deiyonize su ile çalışılmış ve her doz 6 tekrarlı olacak şekilde deneye uygulanmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan A ve B bitkisi, L-askorbik asit, metanol ve deiyonize sudan her kuyucuğa 40 µL aktarılmış ve üzerine 160 µL 0,2 mM DPPH (metanolde) çözeltisi eklenmiştir. Madımak bitki ekstrelerinin renkten ileri gelen absorbanslarının, örnek absorbansına etkisi göz önünde bulundurularak hazırlanan her dozdan, kuyucuklara 40 µL aktarılmış, üzerine 160 µL metanol eklenmiş ve mikroplaklar çalkalayıcıda 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında spektrofotometre cihazında 520 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek, DPPH radikali süpürme aktivitesi aşağıdaki denklem 3.1' göre % cinsinden hesaplanarak bulunmuştur. Örnek absorbansı hesaplanırken renkten ileri gelen absorbans, çalışılan dozun absorbansından çıkarılmıştır.

$$DPPH\ radikal\ süpürme\ aktivitesi\ (\%) = \left(\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}}\right) \times 100 \qquad (3.1)$$

$A_{örnek}$: Örnek absorbansı

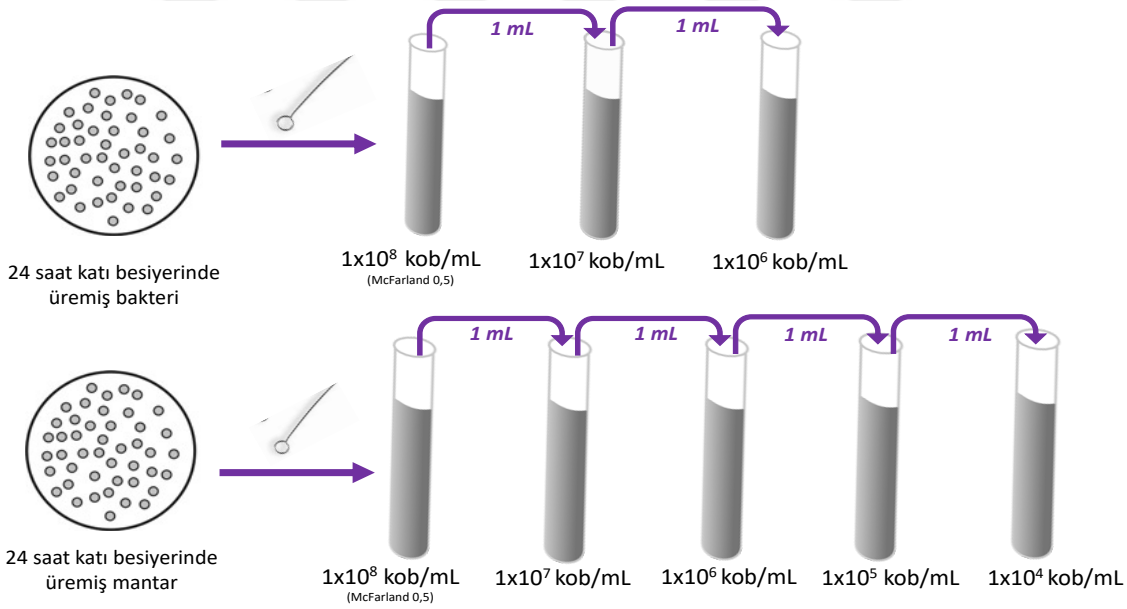
$A_{kontrol}$: Kontrol absorbansı

3.6. MADIMAK BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN TAYİNİ

Madımak bitkisinin ham ekstraktı ile metanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi A bitkisi üzerinden kontrol kullanılarak yaygın insan mikrobiyal patojenlerinin standart suşlarına karşı paralel olarak yürütülmüştür. Çalışmada antibakteriyel aktivite tayini için *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1228) ile metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591) ve vankomisin dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE) (ATCC 51299) gibi Gram pozitif; *Acinetobacter baumanii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922*), Klebsiella pneumoniae* (ATCC

4352), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) gibi Gram negatif bakteri suşları ve antifungal aktivite tayini için *Candida albicans* (ATCC 10231) mantar suşu kullanılmıştır. Çalışmalar İstanbul Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür.

Antimikrobiyal etkinlik testleri spot-on-lawn (nokta-damlatma ekim) ve mikrodilüsyon teknikleri ile değerlendirilmiştir. Antimikrobiyal etkinlik testlerinde kullanılacak standart bakteri suşları deneyden 24 saat önce Nutrient Agar besiyerine ekilerek 37 °C'de, mantar suşu SDA besiyerine ekilerek 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından mikroorganizmalar öze yardımıyla steril çeşme suyu içerisine alınarak süspanse edilmiştir. Hazırlanan mikroorganizma süspansiyonları McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer ($1x10^8$ kob /mL) olarak densitometre cihazında ölçüm yapılarak elde edilmiştir. Mikroorganizma süspansiyonları, seçilen antimikrobiyal etkinlik testine uygun konsantrasyonu elde etmek üzere steril çeşme suyu ile seyreltilerek kullanılmıştır. Mikroorganizma süspansiyonlarının hazırlanma aşaması Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

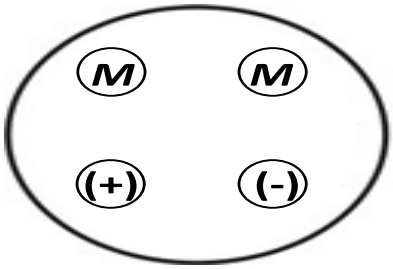


Şekil 3.4: Mikroorganizma süspansiyonlarının hazırlama aşaması.

3.6.1. Nokta-Damlatma Ekim (Spot-on-Lawn) Yöntemi

Madımak bitkisinin ham ekstraktı ile metanol ekstraktının antimikrobiyal etkisi öncelikle nokta damlatma yöntemiyle test edilmiştir. Steril çeşme suyu içerisinde hazırlanan McFarland 0,5 ($1x10^8$ kob/mL) mikroorganizma süspansiyonlarından 100 µL alınarak bakteriler için NA

besiyerlerine; mantar için SDA besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak ticari olarak satın alınan antimikrobiyal etkisi tanımlanmış Antimic® biyositi, negatif kontrol olarak steril çeşme suyu kullanılmıştır. Besiyeri yüzeyine madımak bitki ekstraktları, pozitif ve negatif kontrollerden 20'şer µL haciminde damlatmalar yapılmış ve difüzyonları sağlanana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir (Şekil 3.5). Bakteri ekimi yapılmış Petri kapları 37 °C'de; mantar ekimi yapılmış Petri kapları 30 °C'de 24-48 saat süresince inkübasyonu sonucunda oluşan zon çapları kumpas yardımıyla milimetrik olarak ölçülerek tespit edilmiştir.



M: Madımak ekstresi
(-): Distile çeşme suyu
(+): Antimic® biyositi

Şekil 3.5: Nokta damlatma yöntemi ile tayin aşamasında hazırlanan Petri kabının şematik gösterimi.

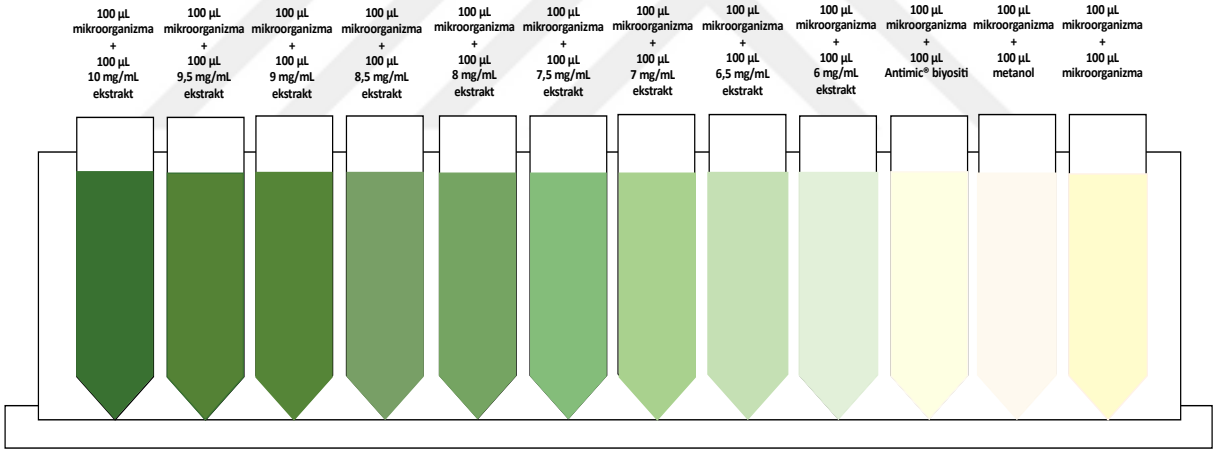
İnhibisyon zon çapları 20 mm veya üstünde ise (≥20 mm) güçlü/yüksek inhibisyon; ≥10≤20 mm arasında ise orta inhibisyon; 10 mm' den az ise (<10 mm) düşük inhibisyon olarak değerlendirilmiştir.

3.6.2. Madımak Bitkisinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) ve Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonunun (MBK/MFK) Belirlenmesi

Madımak ekstraktlarının yaygın standart insan mikrobiyal patojenlerine (bakteriler ve maya) karşı en düşük etkin dozunun belirlenmesi için minimum inhibitör (üremeyi durdurucu) [MİK] ve minimum bakterisidal-fungisidal (öldürücü) konsantrasyonları [MBK/MFK] mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak belirlenmiştir.

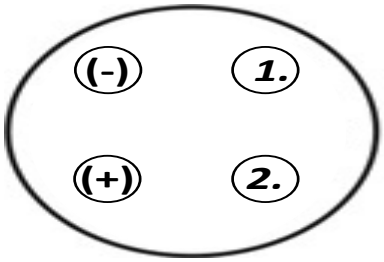
Turbidimetrik olarak densitometre cihazında $1x10^8$ kob/ml olarak hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarından bakteri suşları Nutrient Broth içerisinde $1x10^6$ kob/mL, mantar suşu $1x10^4$ kob/mL olacak şekilde Sabouraud Broth içerisinde seyreltilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (10 mg/mL, 9,5 mg/mL, 9 mg/mL, 8,5 mg/mL, 8 mg/mL, 7,5 mg/mL, 7 mg/mL, 6,5 mg/mL, 6 mg/mL) hazırlanan madımak bitkisi ekstraktlarından 96 kuyucuklu mikroplaklara 100 µL olarak dağıtılmıştır. Her kuyucuğa son konsantrasyonu $5x10^5$ kob/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu ve $5x10^3$ kob/ml olacak şekilde mantar süspansiyonundan eşit hacimde eklenmiştir (1:1). Ayrıca pozitif kontrol (%100 biyosit) ve negatif kontrol (bakteri süspansiyonu) ve metanol kontrol örnekleri içeren kuyucuklar da hazırlanmıştır (Şekil 3.6). Bakteri mikroplakları 37 °C'de; mantar mikroplağı ise 30 °C'de 24 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda bulanıklık olup olmadığı gözlenerek, bulanıklık olmayan en düşük konsanstrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir (Duran ve diğ. 2010).



Şekil 3.6: Mikroorganizmaların MİK değerlerinin belirlenmesinde mikrodilüsyon tekniğinin mikroplakta şematik gösterimi.

Madımak bitki ekstraktlarının MBK/MFK değerlerini tespit etmek amacıyla, bulanıklık görülmeyen kuyucuklardan bakteriler için NA besiyerine, mantar için SDA besiyerine 10 µL hacminde damlatma ve yayma ekimler yapılmıştır. (Şekil 3.7). Bakteri ekilmiş Petri kapları 37 °C'de; mantar ekimi yapılmış Petri kapları 30 °C'de 24-48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda üreme görülmeyen en düşük konsanstrasyon MBK/MFK değeri olarak belirlenmiştir (Duran ve diğ. 2010).



1.-2. : 1. ve 2. kuyucuk
(-): mikroorganizma
(+): Antimic® biyositi

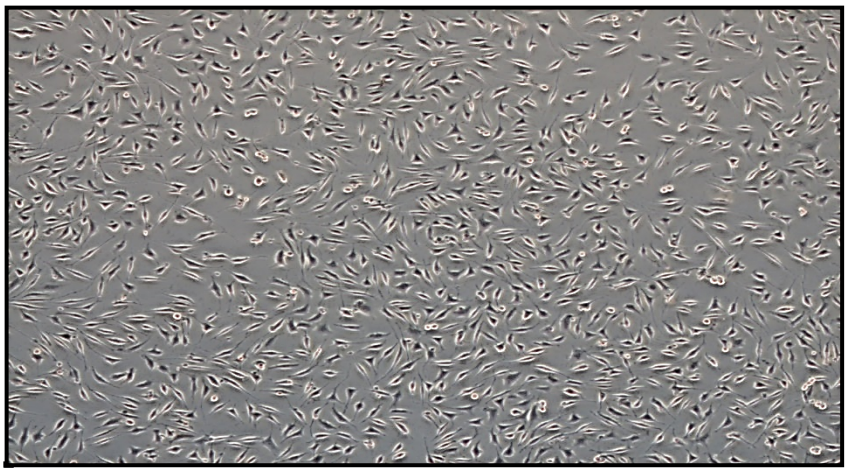
Şekil 3.7: MBK/MFK belirlenmesinde hazırlanan Petri kabının şematik gösterimi.

3.7. MTT YÖNTEMİYLE *İN VİTRO* SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ

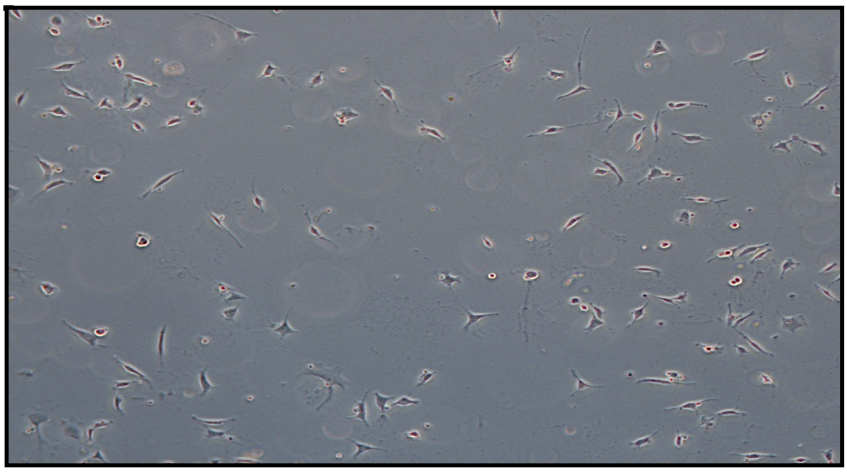
Madımak bitkisinin *in vitro* sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalar Yıldız Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.7.1. Hücre Kültürü ve Bitki Numunelerinin Uygulanması

Tez çalışması kapsamında çocuk ve erken yaş yaygın kanseri osteosarkoma dokularından kültür edilen SAOS-2 hücre hattı ve L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları DMEM-F12 besi ortamında kültüre edilmiş ve çoğaltılmıştır. L929 ve SAOS-2 hücre hatlarının kültür kabındaki görüntüleri sırasıyla, Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da verilmiştir.

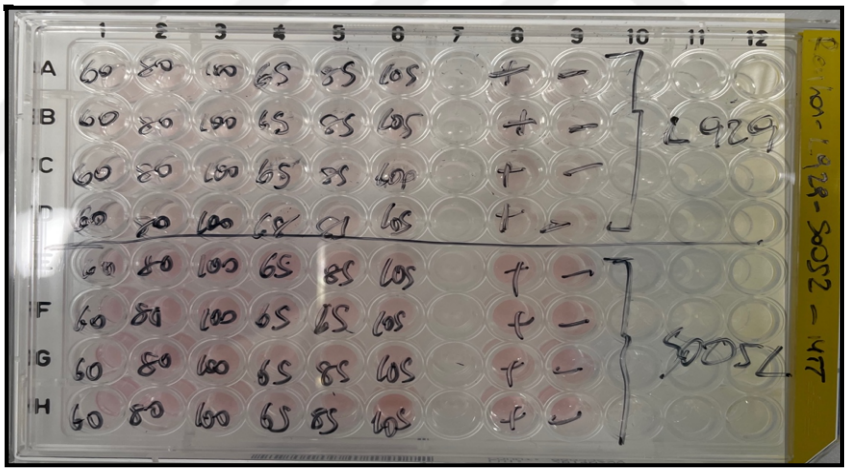


Şekil 3.8: L929 hücre hattının kültür kabındaki görüntüsü (5x).



Şekil 3.9: SAOS-2 hücre hattının kültür kabındaki görüntüsü (5x).

Yeterli sayıya ulaşan L929 ve SAOS-2 hücre kültürlerinden 96 kuyucuklu mikroplak içerisine her kuyucukta 10^5 hücre/mL olacak şekilde ekim yapılmıştır (Şekil 3.10). Hücreler, 24 saat boyunca 37 °C CO_2'li inkübatörde tutunmaya bırakılmıştır.



Şekil 3.10: Hücre hatlarının mikroplağa ekimi.

In vitro sitotoksik aktivitenin belirlenmesi amacıyla, A ve B bitki ekstraktlarının %0,5 DMSO içeren DMEM'de 6 mg/mL, 8 mg/mL ve 10 mg/mL derişimlerinde çözeltileri hazırlanmış ve numuneler 0,22 µm membran filtre ile sterilize edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda mikroplaklardan besiyeri uzaklaştırılarak, üç tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara numune ekimleri yapılmıştır. Mikroplaklar inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

3.7.2. MTT Yöntemi ile Aktivitenin Belirlenmesi

3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) canlılık yöntemi hücre sitotoksisitesi ve hücre canlılığını ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem, MTT'nin içinde barındırdığı suda çözülebilen tetrazolyum tuzunun, metabolik olarak canlı hücrelerde mitokondriyal dehidrogenaz aracılığıyla sarı renkten, mor renkteki formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Canlı hücre sayısı, kristallerin çözünmesiyle oluşan absorbans değerleri ile direkt olarak ilişkilidir (Arı ve diğ. 2012; Fotakis ve Timbrell, 2006).

Madımak bitki ekstraklarının MTT ile tayini için, 24 saat inkübasyon sonrasında mikroplak üzerinde MTT canlılık testi yapılmak üzere kuyucuklara 100 µL MTT çözeltisi ilave edilmiştir. Pozitif kontrol olarak %1 fenol çözeltisi, negatif kontrol olarak sadece DMEM medium kullanılmıştır. Mikroplaklar alüminyum folyo ile sarılarak 4 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 100 µL DMSO eklenerek formazanların çözünmesi amacıyla çalkalayıcıda yarım saat çalkalanmıştır. Spektrofotometre cihazında 570 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek, hücre canlılığı değerleri negatif kontrol %100 canlı kabul edilerek hesaplanmıştır.

3.8. KROMATOGRAFİK KOŞULLAR

Protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, kumarin, ellajik asit, polidatin, resveratrol ve kuersetin bileşiklerinin eş zamanlı kalitatif ve kantitatif tayini için yeni bir HPLC-DAD yönteminin geliştirilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Kromatografik ayırma koşulları Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4: Kromatografik Koşullar.

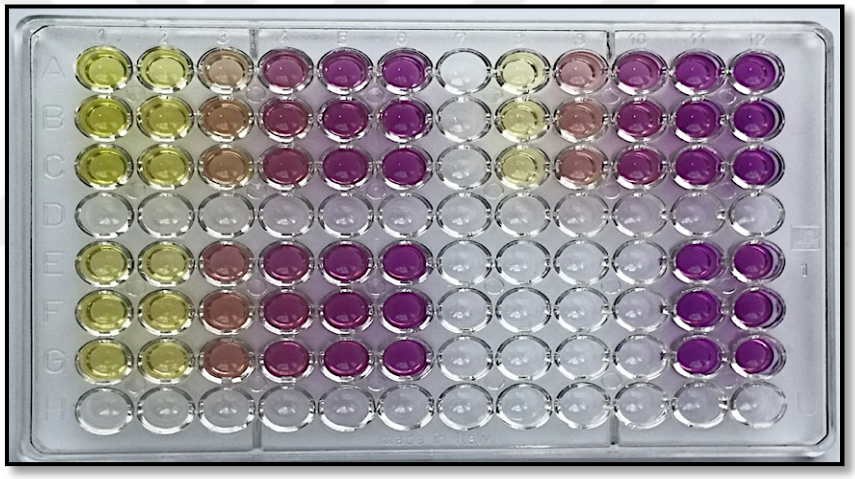
Kullanılan Cihaz	**HPLC**
Kolon	SUPELCOSIL LC-18 (25cm x 4,6mm, 5µm)
Akış Hızı	1,2 mL/dk
Dalga Boyu	240 nm
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Enjeksiyon Süresi	35 dk
Mobil Faz A	dH_2O + % 0,5 fosforik asit
Mobil Faz B	Metanol
Mobil Faz (Zaman Tablosu)	

Zaman (dk)	Hacim (%B)
2	20
5	25
7	30
8	32
9	33
10	34
11	35
12	37
13	40
14	42
15	45
17	50
19	55
21	60
23	65
25	75
27	60
29	50
31	40
33	30
35	20
35	Stop

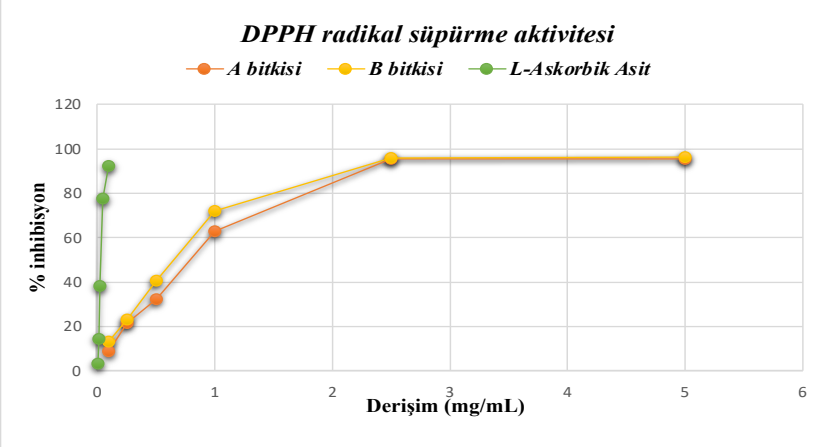
4. BULGULAR

4.1. DPPH YÖNTEMİYLE ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ BULGULARI

A ve B bitkisinin çalışılan dozlarının antioksidan aktiviteleri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürme yöntemi ile tayin edilmiştir (Şekil 4.1). Tayinler altı derişimde, altı tekrar çalışılmış ve Şekil 4.2 ve Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Madımak bitki ekstraktlarının derişim yükseldikçe çözelti renginde açılma meydana geldiği, daha yüksek DPPH radikal süpürme aktivitesi sergilediği saptanmıştır. Bitki ekstraktlarının 5 mg/mL ve 2,5 mg/mL derişimlerinde DPPH radikal süpürme aktivitesi sırasıyla A bitkisi için %95,542 ve %95,280, B bitkisi için %96,241 ve %95,979; pozitif kontrol olan L-Askorbik asit için100 µg/mL derişimde %92,390 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1: DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite tayini.



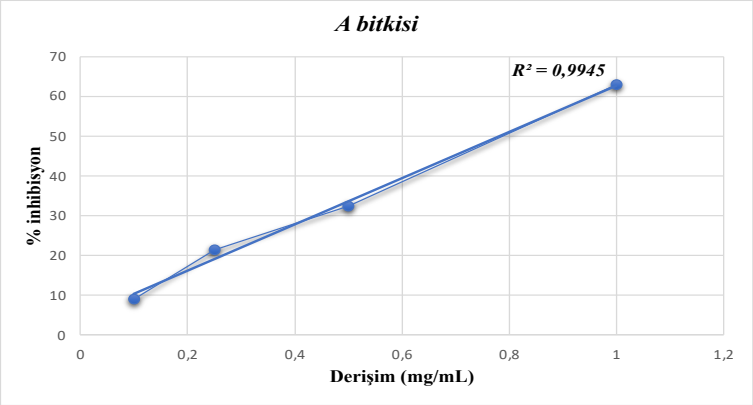
Şekil 4.2: L-Askorbik asit ile A ve B bitki esktraklarının farklı dozlarda DPPH radikal süpürme aktiviteleri.

Tablo 4.1: L-Askorbik asit ile A ve B bitki esktraklarının DPPH radikal süpürme aktiviteleri sonuçları.

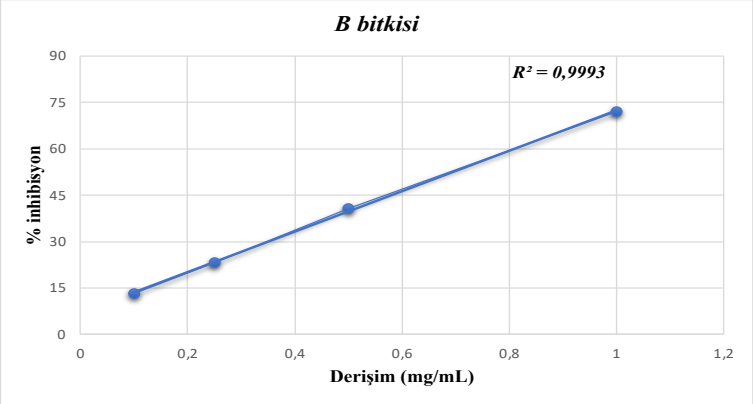
Bitki	Derişim	Örnek Absorbansı ± SD (520	Renkten İleri Gelen Absorbans ± SD (520 nm)	Kontrol Absorbansı ± SD (520	DPPH radikal süpürme aktivitesi (%)
A bitkisi	5,0 mg/mL	0,128 ± 0,003	0,078 ± 0,002	1,144 ± 0,031	95,542
	2,5 mg/mL	0,114 ± 0,001	0,060 ± 0,004	1,144 ± 0,031	95,280
	1,0 mg/mL	0,474 ± 0,044	0,050 ± 0,006	1,144 ± 0,031	62,937
	0,5 mg/mL	0,817 ± 0,056	0,044 ± 0,002	1,144 ± 0,031	32,490
	0,25 mg/mL	0,939 ± 0,021	0,041 ± 0,002	1,144 ± 0,031	21,416
	0,1 mg/mL	1,081 ± 0,037	0,040 ± 0,001	1,144 ± 0,031	9,003
B bitkisi	5,0 mg/mL	0,174 ± 0,004	0,131 ± 0,002	1,144 ± 0,031	96,241
	2,5 mg/mL	0,134 ± 0,005	0,088 ± 0,005	1,144 ± 0,031	95,979
	1,0 mg/mL	0,380 ± 0,028	0,060 ± 0,005	1,144 ± 0,031	72,028
	0,5 mg/mL	0,726 ± 0,022	0,048 ± 0,003	1,144 ± 0,031	40,734
	0,25 mg/mL	0,925 ± 0,026	0,048 ± 0,009	1,144 ± 0,031	23,252
	0,1 mg/mL	1,036 ± 0,038	0,042 ± 0,004	1,144 ± 0,031	13,112
L-Askorbik asit	100 µg/mL	0,085 ± 0,002	-	1,117 ± 0,030	92,390
	50 µg/mL	0,250 ± 0,106	-	1,117 ± 0,030	77,619
	25 µg/mL	0,688 ± 0,095	-	1,117 ± 0,030	38,406
	10 µg/mL	0,956 ± 0,073	-	1,117 ± 0,030	14,414
	5 µg/mL	1,079 ± 0,057	-	1,117 ± 0,030	3,402

Bitki ekstreleri ve L- Askorbik asitin IC_{50} değerlerini hesaplamasında çalışmanın doğrusal olduğu aralıklarda derişime karşılık yüzde inhibisyon grafikleri çizilmiş ve elde edilen üstel denklem kullanılarak hesaplama yapılmıştır. IC_{50} değeri, ilk DPPH• derişimini %50 oranınında azaltan derişim değeridir (Ayaz Seyhan, 2019). IC_{50} değerlerini hesaplamak için çizilen A ve B bitkisi ile L-Askorbik aside ait grafikler sırasıyla, Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'te; veriler Tablo 4.2'de

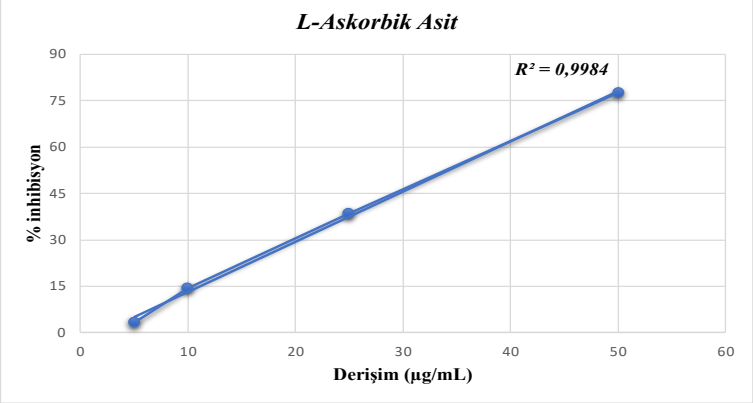
verilmiştir. A bitkisi, B bitkisi ve L-Askorbik asitin IC_{50} değerleri sırasıyla 0,781 mg/mL, 0,657 mg/mL ve 0,033 mg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3: A bitkisi IC_{50} hesaplamasına ait grafik.



Şekil 4.4: B bitkisi IC_{50} hesaplamasına ait grafik.



Şekil 4.5: L-Askorbik asit IC_{50} hesaplamasına ait grafik.

Tablo 4.2: Bitki ekstrakları ve L-Askorbik asit'e ait IC_{50} değerleri.

	R^2	Denklem	IC_{50} (mg/mL)
A bitkisi	0,9945	y = 58,325x + 4,4714	0,781
B bitkisi	0,9993	y = 65,432x + 7,0193	0,657
L- Askorbik asit	0,9984	y = 1,6252x - 3,106	0,033

4.2. MADIMAK BİTKİSİNİN ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN TAYİNİ

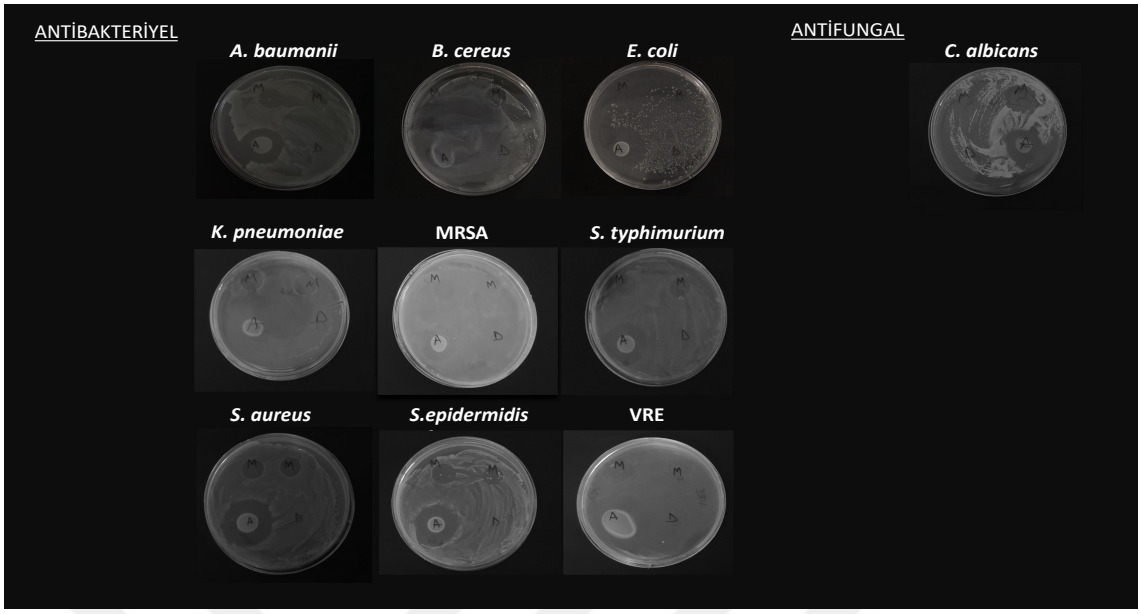
Madımak bitkisinin yaygın insan mikrobiyal patojenlerinin standart suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi nokta damlatma ekim (spot-on-lawn) ve mikrodilüsyon yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

4.2.1. Nokta-Damlatma Ekim (Spot-on-Lawn) Yöntemi Sonuçları

Çalışmamızda madımak bitkisi ham ekstaktının denenen standart suşlara karşı üreme inhibisyon zonu oluşturmadığı belirlenmiştir. Bununla beraber, bitkinin metanol ekstraktı neredeyse test edilen indikatör patojenlerin tümüne karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Tablo 4.3, Şekil 4.6).

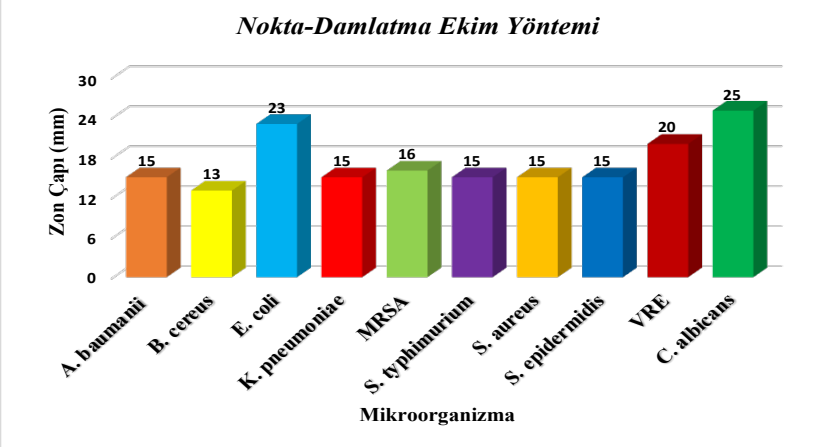
Tablo 4.3: Madımak bitkisi metanol ekstraktının mikroorganizmalarda oluşturduğu inhibisyon zon çapları.

Mikroorganizma	**Zon çapı (mm) ± SD**
Gram pozitif bakteriler	
Bacillus cereus	13 ± 0,577
Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)	16 ± 1,095
Staphylococcus aureus	15 ± 0,500
Staphylococcus epidermidis	15 ± 0,885
Vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE)	20 ± 1,517
Gram negatif bakteriler	
Acinetobacter baumanii	15 ± 0,447
Escherichia coli	23 ± 1,871
Klebsiella pneumoniae	15 ± 0,441
Salmonella typhimurium	15 ± 1,333
Mantar	
Candida albicans	25 ± 0,548



Şekil 4.6: İnhibisyon zon çaplarının ölçüldüğü Petri kabı görüntüleri.

Metanol ekstraktının çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı üreme inhibisyon zonu oluşturduğu gözlemlenmiştir. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ile *Candida albicans*'a karşı ölçülen zon çaplarının karşılaştırılması Şekil 4.7'de verilmiştir. Nokta damlatma yöntemi ile yapılan aktivite araştırmasında madımak bitki ekstraktının en güçlü antimikrobiyal etkiyi 25 mm zon çapı ile *C. albicans*'a karşı gösterdiği, antifungal aktivitesinin antibakteriyel aktivitesinden daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3, Şekil 4.6). Bitkinin metanol ekstraktı en güçlü antibakteriyel etkisini 23 mm üreme inhibisyon zonu ile *E. coli* ve 20 mm üreme inhibisyon zonu ile Vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE) bakterilerine karşı göstermiştir.

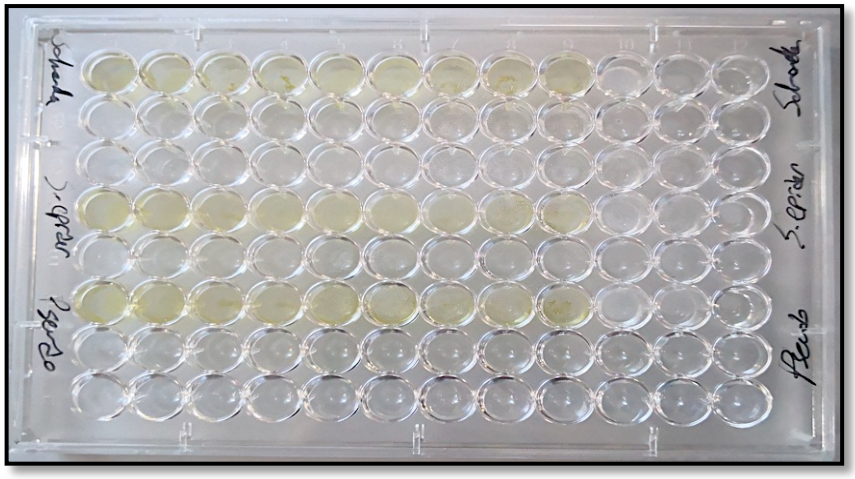


Şekil 4.7: Ölçülen inhibisyon zon çaplarının karşılaştırılması.

4.2.2. Madımak Bitkisinin Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) ve Minimum Bakterisidal/Fungisidal Konsantrasyonu (MBK/MFK) Değerleri

4.2.2.1. MİK Değerleri

Bitki ekstraktlarının mikroorganizmalara karşı MİK değerleri, broth mikrodilüsyon tekniği ile belirlenmiştir (Şekil 4.8). Madımak bitkisi ham ekstraktının denenen tüm dozları test organizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. Madımak bitkisi metanol ekstraktının Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ile mantar için MİK değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Madımak ekstraktının tüm mikroorganizmalara karşı MİK değerleri 4,75 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8: Mikrodilüsyon yöntemiyle MİK değerlerinin belirlenmesi.

Tablo 4.4: Bitki ekstraktının mikroorganizmalara karşı MİK değerleri.

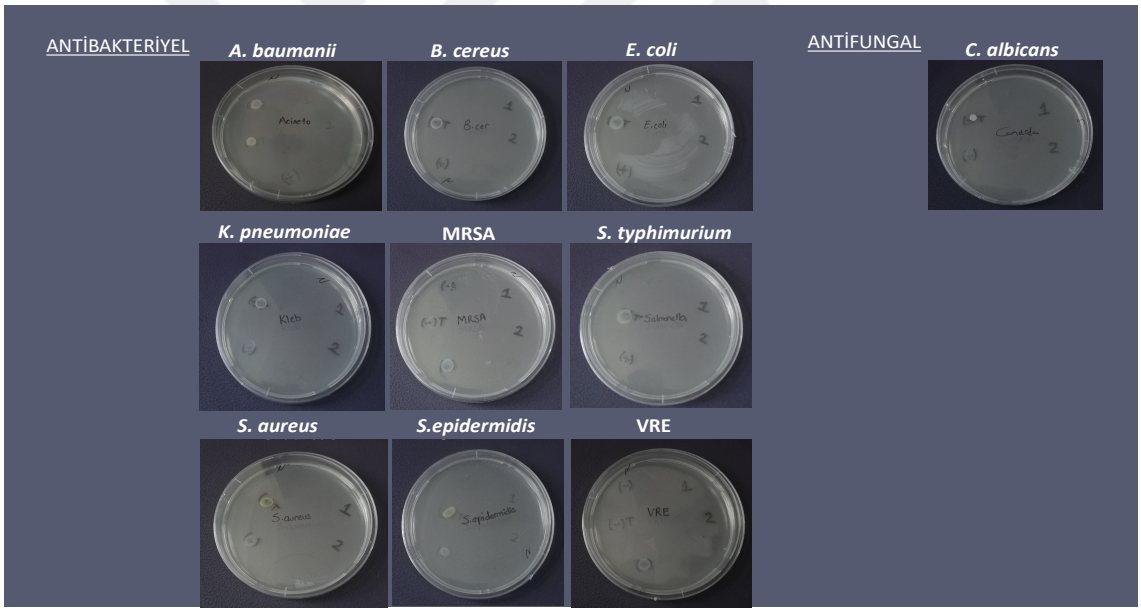
Mikroorganizma	**MİK (mg/mL)**
Gram pozitif bakteriler	
Bacillus cereus	4,75
Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)	4,75
Staphylococcus aureus	4,75
Staphylococcus epidermidis	4,75
Vankomisine dirençli *Enterococcus faecalis* (VRE)	4,75
Gram negatif bakteriler	
Acinetobacter baumanii	4,75
Escherichia coli	4,75
Klebsiella pneumoniae	4,75
Salmonella typhimurium	4,75
Mantar	
Candida albicans	4,75

4.2.2.2. MBK/MFK Değerleri

Üreme olmayan kuyucuklardan besi ortamına damlatma ve yayma ekim sonucunda belirlenen, mikroorganizmanın ölümüne sebebiyet veren MBK/MFK değerleri Tablo 4.5'te, MBK/MFK testlerinin yapıldığı Petri kabı görüntüleri Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Hastane enfeksiyonuna yol açan Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) bakterisi hariç tüm bakteriler için MBK, *Candida albicans* için MFK dozu 4,75 mg/mL; Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) bakterisi için MBK dozu 5,00 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.5: Bitki ekstraktının mikroorganizmalara karşı MBK/MFK değerleri.

Mikroorganizma	**MBK (mg/mL)**
Gram pozitif bakteriler	
Bacillus cereus	4,75
Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)	4,75
Staphylococcus aureus	4,75
Staphylucoccus epidermidis	4,75
Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VRE)	5,00
Gram negatif bakteriler	
Acinetobacter baumanii	4,75
Escherichia coli	4,75
Klebsiella pneumoniae	4,75
Salmonella typhimurium	4,75
Mantar	**MFK (mg/mL)**
Candida albicans	4,75

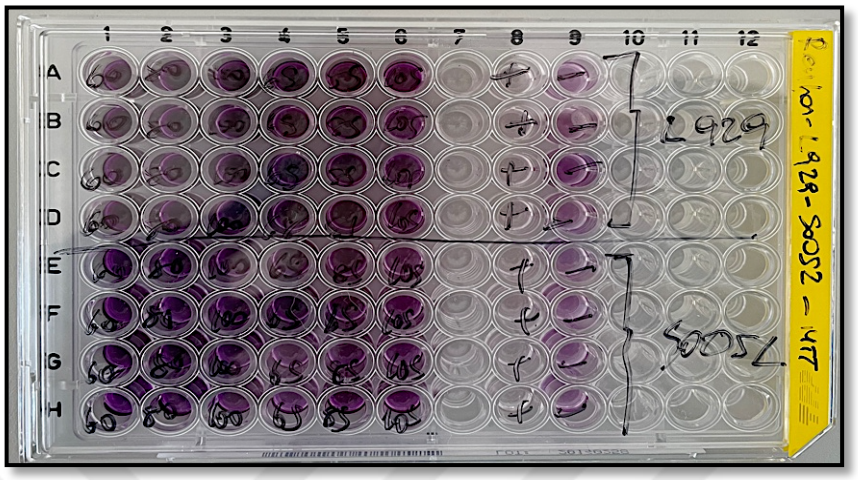


Şekil 4.9: MBK/MFK değerlerinin belirlendiği Petri kaplarının görüntüleri.

4.3. MTT YÖNTEMİYLE SİTOTOKSİK AKTİVİTE TAYİNİ BULGULARI

Madımak bitkisinin *in vitro* sitotoksik aktivitesi L929 ve SAOS-2 hücre hatları üzerinde MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.10). İnkübasyonun 24. saatinde MTT ile yapılan analiz sonucunda hücrelerin % hücre canlılık değerleri Tablo 4.6'da verilmiştir. Pozitif kontrol olarak %1 fenol çözeltisi, negatif kontrol

olarak sadece DMEM medium kullanılmıştır. Hesaplamalar negatif kontrol %100 canlı kabul edilerek yapılmıştır.



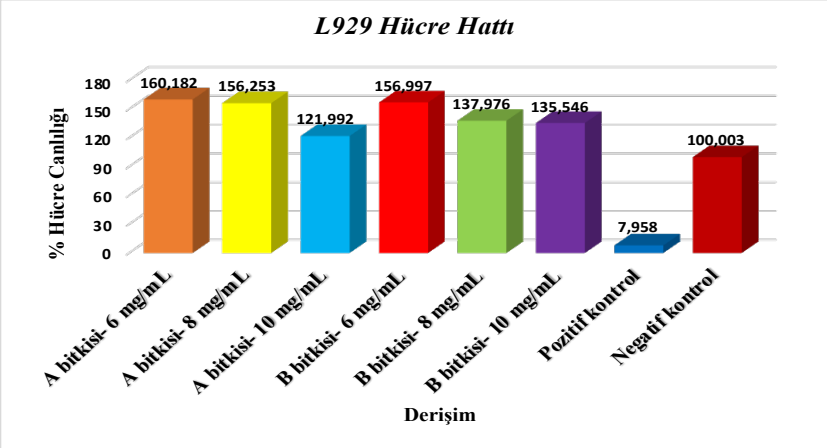
Şekil 4.10: MTT yöntemiyle sitotoksik aktivite tayini.

Tablo 4.6: A ve B bitki esktrakları ile kontrollere ait % hücre canlılık verileri.

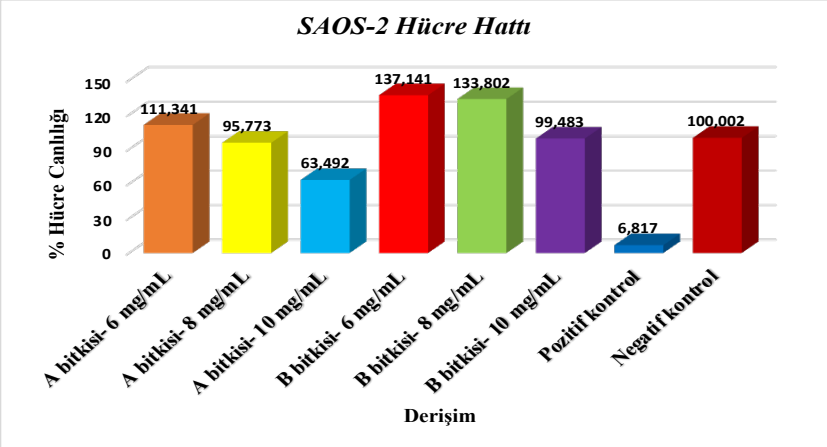
		Derişim	Absorbans ± SD (570 nm)	% Hücre Canlılığı ± SD
L929	**A bitkisi**	6 mg/mL	1,967 ± 0,024	160,182 ± 1,11
		8 mg/mL	1,918 ± 0,055	156,253 ± 2,58
		10 mg/mL	1,498 ± 0,225	121,992 ± 10,56
	B bitkisi	6 mg/mL	1,928 ± 0,028	156,997 ± 1,32
		8 mg/mL	1,694 ± 0,222	137,976 ± 10,44
		10 mg/mL	1,664 ± 0,070	135,546 ± 3,28
	%1 fenol çözeltisi	-	0,098 ± 0,001	7,958 ± 0,05
	DMEM	-	1,228 ± 0,041	100,003 ± 1,93
SAOS-2	**A bitkisi**	6 mg/mL	1,532 ± 0,397	111,341 ± 16,66
		8 mg/mL	1,318 ± 0,063	95,773 ± 2,63
		10 mg/mL	0,874 ± 0,168	63,492 ± 7,07
	B bitkisi	6 mg/mL	1,887 ± 0,048	137,141 ± 2,02
		8 mg/mL	1,841 ± 0,117	133,802 ± 4,89
		10 mg/mL	1,369 ± 0,136	99,483 ± 5,72
	%1 fenol çözeltisi	-	0,094 ± 0,001	6,817 ± 0,05
	DMEM	-	1,376 ± 0,154	100,002 ± 6,45

A bitkisinin % hücre canlılığı 6 mg/mL, 8 mg/mL ve 10 mg/mL derişimlerinde sırasıyla, L929 hücre hattında %160,182, %156,253 ve %121,992; SAOS-2 hücre hattında %111,341, %95,773 ve %63,492 olarak bulunmuştur. B bitkisinin % hücre canlılığı 6 mg/mL, 8 mg/mL ve 10

mg/mL derişimlerinde sırasıyla L929 hücre hattında %156,997, %137,976 ve %135,546; SAOS-2 hücre hattında %137,141, %133,802 ve %99,483 olarak saptanmıştır. Şekil 4.11'de L929 hücre hattına uygulanan pozitif ve negatif kontrol ile A ve B bitki ekstraktlarının 6 mg/mL, 8 mg/mL ve 10 mg/mL derişimlerindeki % hücre canlılık oranları; Şekil 4.12'de SAOS-2 hücre hattına uygulanan pozitif ve negatif kontrol ile A ve B bitki ekstraktlarının 6 mg/mL, 8 mg/mL ve 10 mg/mL derişimlerindeki % hücre canlılık oranları karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.11: L929 hücre hattında % hücre canlılık verileri.



Şekil 4.12: SAOS-2 hücre hattında % hücre canlılık verileri.

4.4. HPLC-DAD ANALİZİ BULGULARI

4.4.1. Metot Optimizasyonu

Analizi yapılacak bileşiklerin ayrımını gerçekleştirecek kromatografik yöntemin belirlenmesi, analiz sürecinin en temel adımlarından birisidir. Yöntemin geliştirilmesinde çalışılan bileşiklerin ayrımın sağlanması, pik simetrilerinin düzgün olması, bileşiklerin alıkonma zamanlarının ve dolayısıyla ve analiz süresinin kısa olması gibi kriterler önemlidir. Bu kriterler doğrultusunda fenolik asit ve flavonoidlerin eş zamanlı tayinini için yeni bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiş ve geliştirilen yöntemde mobil faz yüzde fosforik asit oranı, akış hızı ve kolon sıcaklığı optimize edilmiştir.

4.4.1.1. A Mobil Fazı Yüzde Fosforik Asit Oranı Optimizasyonu

HPLC'de kullanılan mobil faz bileşimi alıkonma zamanını etkileyen önemli bir parametredir. Gradient çalışmada B mobil fazı olarak metanol; A Mobil fazı olarak deiyonize su-fosforik asit karışımı çalışılmıştır. A mobil fazı bileşiminde deiyonize su içerisinde bulunan beş farklı yüzde fosforik asit oranı (%0,0-%0,01-%0,1-%0,5-%1,0) karşılaştırılmıştır. %0,0 fosforik asit-deiyonize su ikili karışımında piklerin ayrımı sağlanamadığı için hesaplama yapılamamıştır. Diğer fosforik asit yüzdelerinde elde edilen sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. Alıkonma zamanları, pik simetrileri, ayırma gücü gibi parametreler göz önüne alındığında, A mobil fazı olarak %0,5 fosforik asit-deiyonize su karışımı belirlenmiştir.

Tablo 4.7: A mobil fazı yüzde fosforik asit oranı optimizasyonu verileri.

Mobil Faz A Bileşimi	Bileşik Çiftleri	k_2	α	k_2/k_2+1	α-1/α	R_s
%0,01	Kateşin/protokateşik asit	1,342	1,259	0,573	0,206	2,340
	Gentisik asit/kateşin	1,587	1,183	0,613	0,155	2,017
	Kafeik asit/gentisik asit	2,356	1,485	0,702	0,327	7,125
	p-kumarik asit/kafeik asit	3,264	1,385	0,765	0,278	7,686
	Polidatin/p-kumarik asit	3,609	1.106	0,783	0,096	2,615
	Kumarin/polidatin	4,214	1,168	0,808	0,144	5,569
	Resveratrol/kumarin	4,856	1,152	0,829	0,132	6,328
	Ellajik asit/resveratrol	5,252	1,082	0,840	0,076	3,284
	Kuersetin/ellajik asit	6,054	1,153	0,858	0,133	7,277
	Diklofenak/kuersetin	7,955	1,314	0,888	0,239	21,942

Tablo 4.7 (devam): A mobil fazı yüzde fosforik asit oranı optimizasyonu verileri.

%0,1	Kateşin/protokateşik asit	1,576	1,467	0,612	0,318	4,072
	Gentisik asit/kateşin	1,887	1,197	0,654	0,165	2,698
	Kafeik asit/gentisik asit	2,363	1,252	0,703	0,201	4,423
	p-kumarik asit/kafeik asit	3,260	1,380	0,765	0,275	7,718
	Polidatin/p-kumarik asit	3,588	1,101	0,782	0,092	2,600
	Kumarin/polidatin	4,207	1,173	0,808	0,147	5,618
	Resveratrol/kumarin	4,852	1,153	0,829	0,133	6,378
	Ellajik asit/resveratrol	5,242	1,080	0,840	0,074	3,333
	Kuersetin/ellajik asit	6,057	1,155	0,858	0,134	7,469
	Diklofenak/kuersetin	8,020	1,324	0,889	0,245	22,643
%0,5	Kateşin/protokateşik asit	1,357	1,518	0,576	0,341	4,177
	Gentisik asit/kateşin	1,733	1,277	0,634	0,217	3,699
	Kafeik asit/gentisik asit	2,069	1,194	0,674	0,162	3,495
	p-kumarik asit/kafeik asit	2,896	1,400	0,743	0,286	7,827
	Polidatin/p-kumarik asit	3,197	1,104	0,762	0,094	2,613
	Kumarin/polidatin	3,740	1,170	0,789	0,145	5,501
	Resveratrol/kumarin	4,334	1,159	0,813	0,137	6,578
	Ellajik asit/resveratrol	4,697	1,084	0,824	0,077	3,479
	Kuersetin/ellajik asit	5,424	1,155	0,844	0,134	7,471
	Diklofenak/kuersetin	7,216	1,330	0,878	0,248	22,468
%1,0	Kateşin/protokateşik asit	1,573	1,469	0,611	0,319	4,145
	Gentisik asit/kateşin	2,009	1,277	0,668	0,217	3,968
	Kafeik asit/gentisik asit	2,350	1,170	0,701	0,145	3,263
	p-kumarik asit/kafeik asit	3,252	1,384	0,765	0,277	7,838
	Polidatin/p-kumarik asit	3,580	1,101	0,782	0,092	2,627
	Kumarin/polidatin	4,170	1,165	0,807	0,142	5,445
	Resveratrol/kumarin	4,892	1,159	0,829	0,137	6,709
	Ellajik asit/resveratrol	5,228	1,082	0,839	0,076	3,509
	Kuersetin/ellajik asit	6,030	1,153	0,858	0,133	7,567
	Diklofenak/kuersetin	7,998	1,326	0,889	0,246	22,652

4.4.1.2. Akış Hızı Optimizasyonu

Fenolik asit ve flavonoidlerin ayrımında analiz süresini en çok etkileyen parametre akış hızıdır. Akış hızı arttıkça alıkonma zamanlarının azalır ancak kapasite faktörü, seçicilik ve ayırma gücü üzerinde akış hızının etkisi doğru orantılı değildir. Akış hızı optimizasyonunda dört farklı akış hızında (0,8 mL/dk, 1,0 mL/dk, 1,2 mL/dk, 1,5 mL/dk) standart karışım enjekte edilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmalı olarak alıkonma zamanları ve pik simetrileri kapsamında değerlendirilmiştir. Farklı akış hızlarındaki kapasite faktörü (k), seçicilik (α) ve ayırma gücü (R_S) sonuçları Tablo 4.8'de verilmiş ve bu sonuçlara dayanarak, optimum akış hızı olarak 1,2 mL/dk olarak seçilmiştir.

Tablo 4.8: Akış hızı optimizasyonu verileri.

Akış Hızı	Bileşik Çiftleri	k_2	α	k_2/k_2+1	α-1/α	R_s
0,8 mL/dk	Kateşin/protokateşik asit	1,470	1,422	0,595	0,297	3,940
	Gentisik asit/kateşin	1,878	1,278	0,653	0,218	4,239
	Kafeik asit/gentisik asit	2,162	1,151	0,684	0,131	3,073
	p-kumarik asit/kafeik asit	2,990	1,383	0,749	0,277	8,236
	Polidatin/p-kumarik asit	3,200	1,070	0,762	0,065	2,013
	Kumarin/polidatin	3,711	1,160	0,788	0,138	5,561
	Resveratrol/kumarin	4,166	1,123	0,806	0,110	5,397
	Ellajik asit/resveratrol	4,505	1,081	0,818	0,075	3,441
	Kuersetin/ellajik asit	5,139	1,141	0,837	0,124	6,926
	Diklofenak/kuersetin	6,765	1,316	0,871	0,240	12,830
1,0 mL/dk	Kateşin/protokateşik asit	1,593	1,471	0,614	0,320	4,313
	Gentisik asit/kateşin	2,005	1,259	0,667	0,206	3,752
	Kafeik asit/gentisik asit	2,376	1,185	0,704	0,156	3,598
	p-kumarik asit/kafeik asit	3,286	1,383	0,767	0,277	7,867
	Polidatin/p-kumarik asit	3,620	1,102	0,784	0,093	2,726
	Kumarin/polidatin	4,212	1,164	0,808	0,141	5,464
	Resveratrol/kumarin	4,876	1,158	0,830	0,136	6,760
	Ellajik asit/resveratrol	5,286	1,084	0,841	0,077	3,633
	Kuersetin/ellajik asit	6,082	1,151	0,859	0,131	7,549
	Diklofenak/kuersetin	8,051	1,324	0,890	0,245	22,762
1,2 mL/dk	Kateşin/protokateşik asit	1,668	1,511	0,625	0,338	4,537
	Gentisik asit/kateşin	2,062	1,236	0,673	0,191	3,222
	Kafeik asit/gentisik asit	2,513	1,219	0,715	0,180	3,887
	p-kumarik asit/kafeik asit	3,499	1,392	0,778	0,282	7,691
	Polidatin/p-kumarik asit	3,934	1,124	0,797	0,110	3,226
	Kumarin/polidatin	4,566	1,161	0,820	0,139	4,672
	Resveratrol/kumarin	5,471	1,198	0,845	0,165	7,717
	Ellajik asit/resveratrol	5,965	1,090	0,856	0,083	3,830
	Kuersetin/ellajik asit	6,904	1,157	0,873	0,136	7,788
	Diklofenak/kuersetin	9,272	1,343	0,903	0,255	24,466
1,5 mL/dk	Kateşin/protokateşik asit	1,777	1,566	0,640	0,361	4,779
	Gentisik asit/kateşin	2,132	1,200	0,681	0,167	2,612
	Kafeik asit/gentisik asit	2,685	1,259	0,729	0,206	3,955
	p-kumarik asit/kafeik asit	3,805	1,417	0,792	0,294	7,512
	Polidatin/p-kumarik asit	4,393	1,155	0,815	0,134	3,564
	Kumarin/polidatin	5,015	1,142	0,834	0,124	3,690
	Resveratrol/kumarin	6,280	1,252	0,863	0,201	8,589
	Ellajik asit/resveratrol	6,914	1,101	0,874	0,092	4,007
	Kuersetin/ellajik asit	8,081	1,169	0,890	0,145	7,952
	Diklofenak/kuersetin	11,061	1,369	0,917	0,270	24,979

4.4.1.3. Kolon Sıcaklığı Optimizasyonu

Kolon sıcaklığı optimizasyonunda dört farklı kolon sıcaklığında (20°C, 25°C, 30°C, 35°C) çalışılmıştır. Kolon sıcaklığının analiz süresi, ayrıma gücü, pik simetresi gibi parametreler üzerindeki etkisini araştırılmıştır. Kolon sıcaklığı arttıkça analiz süresinin kısaldığı ancak biyolojik numunelerde bozunma meydana gelme olasılığının arttığı bilinmektedir ve sıcaklığın artışı ile pik simetrisinin bozulduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.9'da verilmiştir. Sistem uygunluk parametreleri açısından değerlendirildiğinde ve en uygun kolon sıcaklığı değeri 25°C olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.9: Kolon sıcaklığı optimizasyonu verileri.

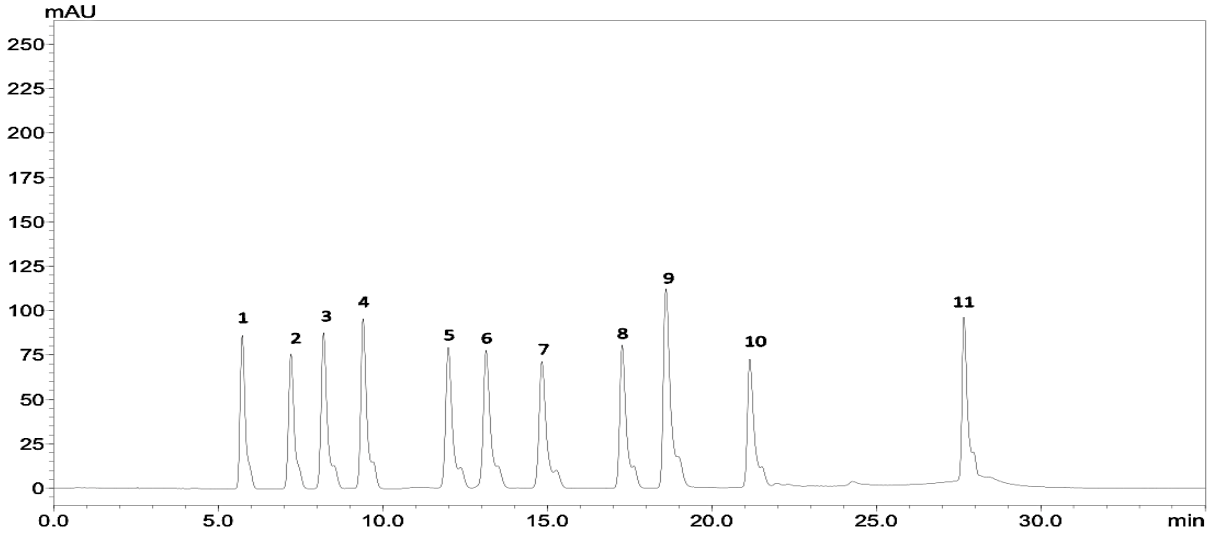
Kolon Sıcaklığı	Bileşik Çiftleri	k_2	α	k_2/k_2+1	α-1/α	R_s
20°C	Kateşin/protokateşik	1,783	1,530	0,641	0,346	4,931
	Gentisik asit/kateşin	2,180	1,223	0,686	0,182	3,098
	Kafeik asit/gentisik	2,640	1,211	0,725	0,174	3,771
	p-kumarik asit/kafeik	3,659	1,386	0,785	0,278	7,228
	Polidatin/p-kumarik	4,119	1,126	0,805	0,112	2,951
	Kumarin/polidatin	4,692	1,139	0,824	0,122	4,085
	Resveratrol/kumarin	5,595	1,192	0,848	0,161	7,487
	Ellajik asit/resveratrol	6,130	1,096	0,860	0,088	3,919
	Kuersetin/ellajik asit	6,996	1,141	0,875	0,124	6,661
	Diklofenak/kuersetin	9,178	1,312	0,902	0,238	21,326
25°C	Kateşin/protokateşik	1,666	1,515	0,625	0,340	4,656
	Gentisik asit/kateşin	2,058	1,235	0,673	0,190	3,134
	Kafeik asit/gentisik	2,508	1,219	0,715	0,180	3,776
	p-kumarik asit/kafeik	3,494	1,393	0,777	0,282	7,432
	Polidatin/p-kumarik	3,930	1,125	0,797	0,111	3,203
	Kumarin/polidatin	4,561	1,161	0,820	0,139	4,462
	Resveratrol/kumarin	5,469	1,199	0,845	0,166	7,437
	Ellajik asit/resveratrol	5,960	1,090	0,856	0,083	3,715
	Kuersetin/ellajik asit	6,906	1,159	0,874	0,137	7,513
	Diklofenak/kuersetin	9,286	1,345	0,903	0,257	23,809
30°C	Kateşin/protokateşik	1,550	1,493	0,608	0,330	4,508
	Gentisik asit/kateşin	1,929	1,245	0,659	0,197	3,270
	Kafeik asit/gentisik	2,364	1,226	0,703	0,184	3,818
	p-kumarik asit/kafeik	3,318	1,404	0,768	0,288	8,095
	Polidatin/p-kumarik	3,732	1,125	0,789	0,111	3,307
	Kumarin/polidatin	4,388	1,176	0,814	0,150	4,891
	Resveratrol/kumarin	5,282	1,204	0,841	0,169	7,582
	Ellajik asit/resveratrol	5,743	1,087	0,852	0,080	3,625
	Kuersetin/ellajik asit	6,756	1,176	0,871	0,150	8,388
	Diklofenak/kuersetin	9,295	1,376	0,903	0,273	26,072

Tablo 4.9 (devam): Kolon sıcaklığı optimizasyonu verileri.

35°C	Kateşin/protokateşik	1,418	1,468	0,586	0,319	4,102
	Gentisik asit/kateşin	1,782	1,257	0,641	0,204	3,287
	Kafeik asit/gentisik	2,190	1,229	0,687	0,186	3,634
	p-kumarik asit/kafeik	3,125	1,427	0,758	0,299	8,660
	Polidatin/p-kumarik	3,518	1,126	0,779	0,112	3,444
	Kumarin/polidatin	4,184	1,189	0,807	0,159	5,144
	Resveratrol/kumarin	5,059	1,209	0,835	0,173	7,538
	Ellajik asit/resveratrol	5,474	1,082	0,846	0,076	3,231
	Kuersetin/ellajik asit	6,593	1,204	0,868	0,169	9,550
	Diklofenak/kuersetin	9,336	1,416	0,903	0,294	28,118

4.4.2. Optimum Koşullar

Protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polidatin, kumarin, resveratrol, ellajik asit, kuersetin olmak üzere on bileşiğin eş zamanlı tayini için yeni bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiştir. A mobil fazı yüzde fosforik asit oranı, akış hızı ve kolon sıcaklığı optimize edilmiştir. Çalışmada SUPELCOSIL LC-18 (25cm x 4,6mm, 5µm) kolonu kullanılmıştır. Gradient program uygulanan çalışmada A mobil fazı %0,5 fosforik asit-deiyonize su karışımı, B mobil fazı metanol olarak belirlenmiştir. Kromatografik ayrım 1,2 mL/dk akış hızında, 25°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Standart bileşiklerin 20 µL hacmindeki enjeksiyonları yapılmış ve enjeksiyon süresi 35 dk olarak belirlenmiştir. Fenolik asit ve flavonoidlerin eş zamanlı ayrımı yaklaşık 22 dk'da gerçekleştirilmiştir. Metot optimizasyonu, metot validasyonu ve çalışılan bileşiklerin kantitatif analizinde iç standart tekniği kullanılmıştır. Tüm bileşikler için veriler en yüksek absorbans yaptıkları ortak dalga boyu olan 240 nm'de elde edilmiştir. Optimum koşullardaki standart bileşiklere ait karışım kromatogramı Şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13: 1. Protokateşik asit, 2. Kateşin, 3. Gentisik asit, 4. Kafeik asit, 5. p-Kumarik asit, 6. Polidatin, 7. Kumarin, 8. Resveratrol, 9. Ellajik asit 10. Kuersetin, 11. Diklofenak (I.S.) bileşiklerinin optimum koşullardaki standart karışım kromatogramı.

4.4.3. Metot Validasyonu

Geliştirilen ve optimize edilen metodun geçerliğininin, uygunluğunun ve güvenirliliğinin saptanması amacıyla validasyon çalışmaları yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında sistem uygunluk parametreleri, doğrusallık, tayin limiti (LOD), kantitatif tayin limiti (LOQ), kesinlik ve doğruluk parametreleri araştırılmıştır. Metodun yüksek duyarlılık ve kesinliğinin istatiksel olarak ispatı amaçlanmıştır.

4.4.3.1. Sistem Uygunluk Testleri

Kromatografik tekniklerde sistem uygunluk testleri (SUT), geliştirilen yöntemin uygunluğunu araştırmak amacıyla yapılan testlerdir. Bileşiklerin standart karışımındaki alıkonma zamanı (dk), kapasite faktörü (k), seçicilik (α), kuyruklanma faktörü (T_f), tabaka sayısı (N), ayırma gücü (R_s) ve alıkonma zamanının yüzde relatif standart sapması verilerinin önerilen değerlere uygunlukları araştırılmıştır. Çalışılan bileşiklerin kapasite faktörlerinin hesaplanmasında urasil t_0 olarak kullanılmıştır. Metot validasyonunda, optimum koşullarda standart çözeltilerden hesaplanan sistem uygunluk testleri verileri ve önerilen değerler Tablo 4.10'da verilmiştir. Hesaplanan değerlerin sistem uygunluk testleri için önerilen değerlere uygun olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.10: Sistem uygunluk testi sonuçları.

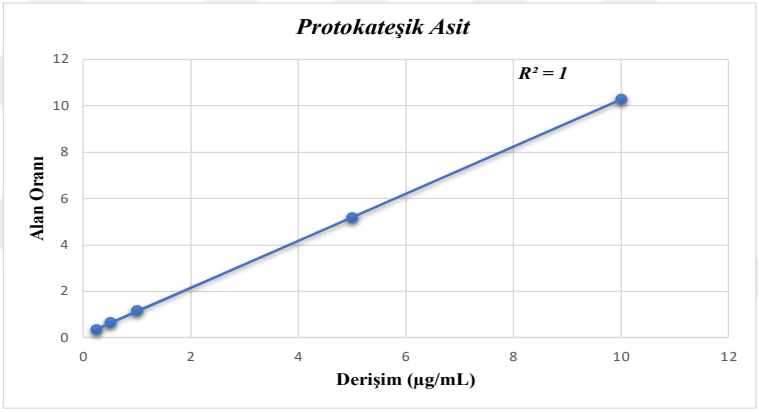
	Alıkonma Zamanı (dk)	Kapasite Faktörü (k)	Seçicilik (α)	Kuyruklanma Faktörü (T_f)	Tabaka Sayısı (N)	Ayırma Gücü (R_s)	%RSD (dk)
Önerilen Değer	-	1-10	≥ 1,15	≤ 2	> 2000	≥ 1,5	≤ 1
Protokateşik Asit	5,676	1,100	-	1,602	5989	-	0,113
Kateşin	7,197	1,666	1,515	1,470	7682	4,656	0,077
Gentisik Asit	8,256	2,058	1,235	1,612	9611	3,134	0,093
Kafeik Asit	9,476	2,508	1,219	1,574	13773	3,776	0,117
p-Kumarik Asit	12,134	3,494	1,393	1,489	18407	7,432	0,105
Polidatin	13,312	3,930	1,125	1,593	20972	3,203	0,125
Kumarin	15,014	4,561	1,161	1,571	24522	4,462	0,098
Resveratrol	17,466	5,469	1,199	1,642	44972	7,437	0,094
Ellajik Asit	18,793	5,960	1,090	1,869	43755	3,715	0,108
Kuersetin	21,346	6,906	1,159	1,759	62997	7,513	0,081
Diklofenak (I.S.)	27,772	9,286	1,345	1,711	168404	23,809	0,023

4.4.3.2. Doğrusallık

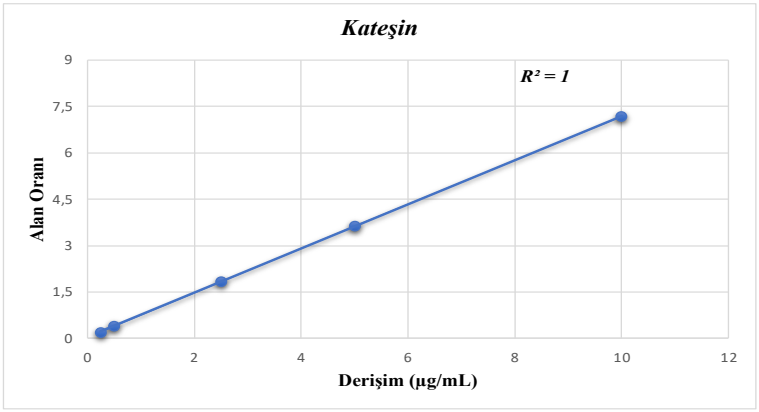
Geliştirilen yöntemin doğrusallığı, çalışma aralığındaki farklı derişimlerde alınan sonuçların derişimlerle doğru orantılı olması ile ifade edilir. Doğrusallık analizlerinde iç standart tekniği kullanılmıştır. İç standart bileşiği numune ve kalibrasyon standartlarına sabit derişimde ilave edilerek analiz sürecinde süre gelen hataların en aza indirgenmesi amaçlanmaktadır. Tez çalışması kapsamında iç standart olarak diklofenak kullanılmıştır. Diklofenak bileşiğinin seçiminde alıkonma zamanı, pik simetrisi, ayırma gücü gibi parametreler göz önünde bulundurulmuştur. Tüm bileşikler için 0,25 ppm ile 10 ppm derişim aralığında beş noktalı kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafikleri, bileşiğin derişimine karşılık bileşiğin alanın iç standardın alanına oranı işaretlenerek çizilmiştir. Bileşiklere ait kalibrasyon verileri Tablo 4.11'de, kalibrasyon grafikleri ise Şekil 4.14-4.23'te verilmiştir. Tüm bileşikler için korelasyon katsayıları (R^2) 0,9999 ve 1 değerlerinde bulunarak yüksek doğrusallık elde edilmiştir.

Tablo 4.11: Bileşiklere ait doğrusal kalibrasyon verileri.

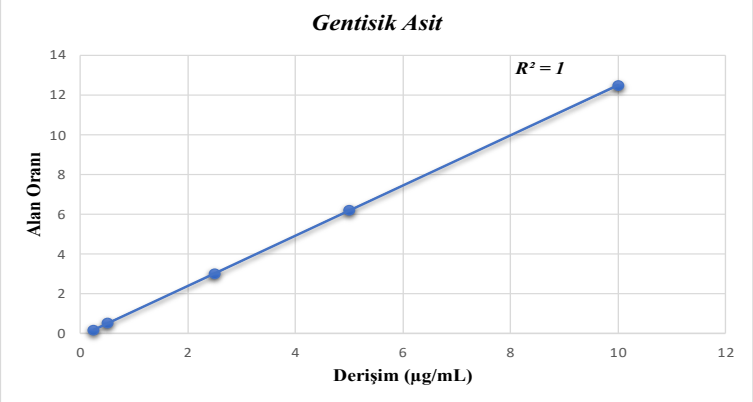
Bileşikler	Kalibrasyon aralığı (µg/mL)	Eğim	Kesim	Korelasyon katsayısı (R^2)	Eğimin standart hatası	Kesimin standart hatası
Protokateşik Asit	0,25-10	1,014	0,131	1	0,004	0,019
Kateşin	0,25-10	0,715	0,036	1	0,002	0,009
Gentisik Asit	0,25-10	1,260	-0,119	1	0,003	0,013
Kafeik Asit	0,25-10	2,080	0,206	1	0,004	0,020
p-Kumarik Asit	0,25-10	1,035	-0,143	1	0,005	0,013
Polidatin	0,25-10	1,372	0,114	1	0,002	0,012
Kumarin	0,25-10	0,732	-0,011	1	0,001	0,008
Resveratrol	0,25-2,5	1,632	0,044	0,9999	0,012	0,016
Ellajik Asit	0,25-10	3,699	-0,089	1	0,006	0,035
Kuersetin	0,25-10	1,835	-0,359	0,9999	0,013	0,058



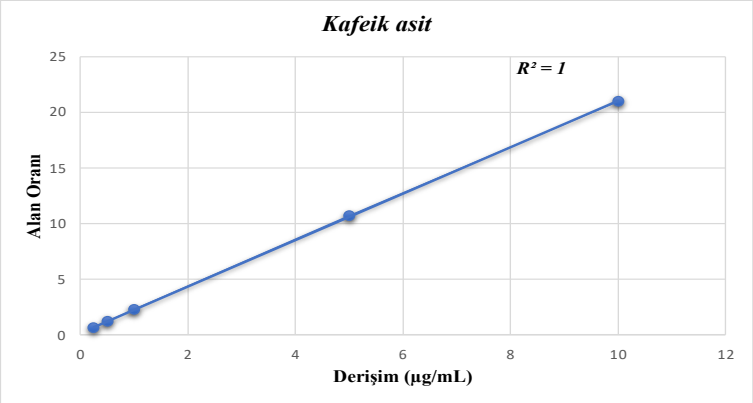
Şekil 4.14: Protokateşik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



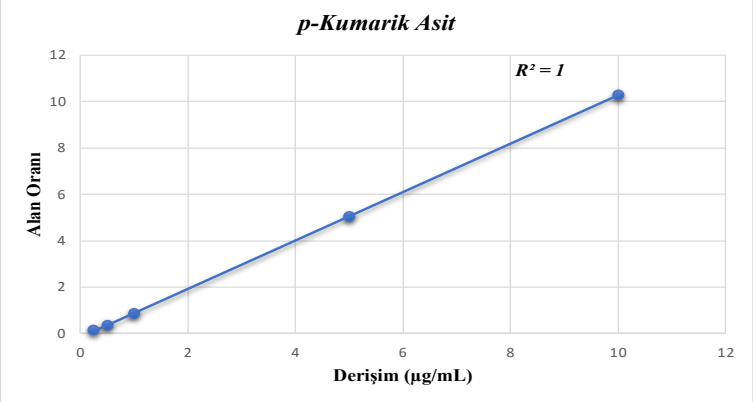
Şekil 4.15: Kateşin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



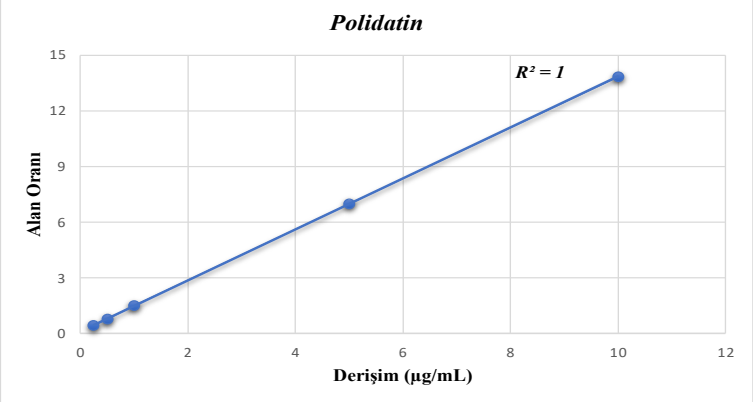
Şekil 4.16: Gentisik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



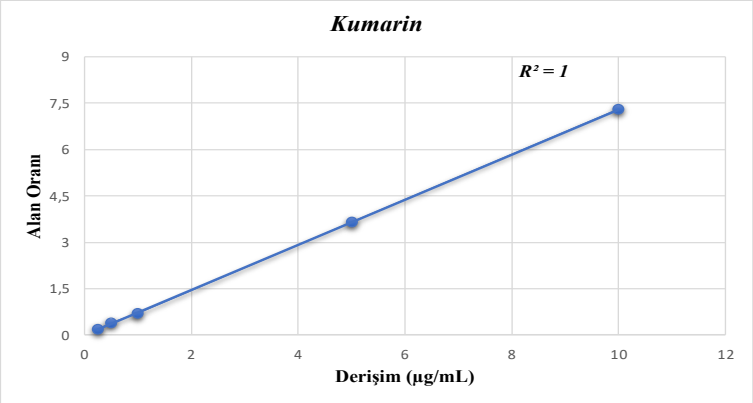
Şekil 4.17: Kafeik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



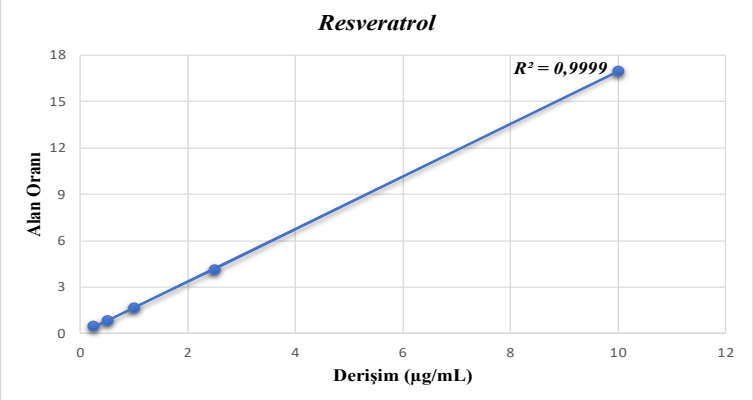
Şekil 4.18: p-Kumarik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



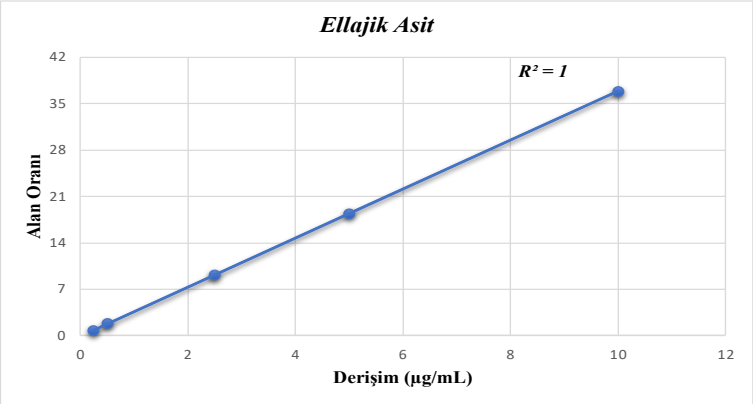
Şekil 4.19: Polidatin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



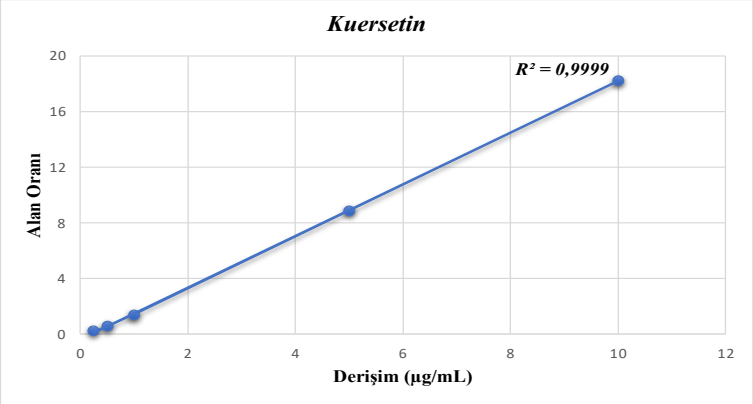
Şekil 4.20: Kumarin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.21: Resveratrol bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.22: Ellajik asit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.23: Kuersetin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.

4.4.3.3. LOD-LOQ

Tayin Limiti (LOD) bileşik analizinin yapıldığı ancak kalibrasyon aralığında bulunmayan en düşük derişimin ifadesidir. Kantitatif tayin limiti (LOQ) ise bileşiğin kantitatif tayininin kesin ve doğru olarak yapılabileceği, kalibrasyon aralığında bulunmayan ya da kalibrasyon aralığının en düşük derişiminin ifadesidir (Civelek, 2021). Geliştirilen ve optimize edilen metot ile her bir bileşik için bulunan tayin limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) değerleri Tablo 4.12'de verilmiştir. Elde edilen veriler doğrusallık verileri ile karşılaştırıldığında, geliştirilen yöntemin çalışılan fenolik asit ve flavonoid bileşiklerinin kantitatif tayini için uygun olduğu saptanmıştır. LOD ve LOQ değerleri denklem 4.1 ve denklem 4.2'ye göre hesaplanarak bulunmuştur (Bardakci ve diğ. 2019; Kavitapu ve diğ. 2021).

$$LOD = \frac{3\ x\ SD}{m} \quad (4.1)$$

$$LOQ = \frac{10\ x\ SD}{m} \quad (4.2)$$

SD: Kesimin standart hatası
m: kalibrasyon eğrisine ait eğim

Tablo 4.12: Bileşiklere ait LOD-LOQ verileri.

Bileşikler	**LOD (µg/mL)**	**LOQ (µg/mL)**
Protokateşik Asit	0,113	0,376
Kateşin	0,075	0,249
Gentisik Asit	0,070	0,232
Kafeik Asit	0,056	0,188
p-Kumarik Asit	0,075	0,251
Polidatin	0,051	0,169
Kumarin	0,068	0,227
Resveratrol	0,059	0,197
Ellajik Asit	0,056	0,188
Kuersetin	0,188	0,628

4.4.3.4. Kesinlik

Geliştirilen metodun kesinliği, yakın zaman aralıklarında yapılan deneylerden elde edilen sonuçların tekrar edilebilirliğinin ifadesidir. Metodun kesinliğinin kanıtlanması için sonuçların birbirleriyle uyum içerisinde olması gerekmektedir. Metot kesinliği, gün içi ve günler arası çalışmalar ile değerlendirilmiştir.

Gün içi kesinlik (Tekrar edilebilirlik)

Gün içi kesinliği, tüm bileşikler için aynı kromatografik koşullar altında kalibrasyon aralığında bulunan iki derişim referans alınarak çalışılmıştır. Standart çözeltilerin aynı gün içerisinde üç farklı zaman aralığında dokuz tekrarlı enjeksiyonları yapılmış ve elde edilen sonuç Tablo 4.13'te gösterilmiştir. % RSD değerleri 0,090-0,652 aralığında saptanmıştır.

Tablo 4.13: Gün içi kesinlik verileri.

Bileşikler	Derişim (µg/mL)	Geri Kazanım (%) ± SD	RSD (%)
Protokateşik Asit	0,5	100,138 ± 0,121	0,121
	5	100,024 ± 0,100	0,100
Kateşin	0,5	99,586 ± 0,560	0,562
	5	100,208 ± 0,356	0,355
Gentisik Asit	0,5	100,023 ± 0,090	0,090
	5	99,361 ± 0,430	0,433
Kafeik Asit	0,5	99,846 ± 0,205	0,205
	5	100,571 ± 0,420	0,418
p-Kumarik Asit	0,5	99,990 ± 0,639	0,639
	5	100,840 ± 0,345	0,342
Polidatin	0,5	99,940 ± 0,275	0,275
	5	100,033 ± 0,105	0,105
Kumarin	0,5	99,940 ± 0,405	0,405
	5	100,004 ± 0,646	0,646
Resveratrol	0,5	99,825 ± 0,650	0,652
	5	100,662 ± 0,250	0,248
Ellajik Asit	0,5	100,792 ± 0,296	0,294
	5	101,032 ± 0,121	0,119
Kuersetin	0,5	99,273 ± 0,206	0,207
	5	100,335 ± 0,176	0,175

Günler arası kesinlik (Orta-kesinlik)

Günler arası kesinliği, tüm bileşikler için aynı kromatografik koşullar altında kalibrasyon aralığında bulunan iki derişim referans alınarak çalışılmıştır. Standart çözeltilerin üç farklı gün içerisinde üçer tekrarlı enjeksiyonları yapılmış ve elde edilen sonuç Tablo 4.14'te verilmiştir. % RSD değerleri 0,059-0,697 aralığında saptanmıştır.,

Tablo 4.14: Günler arası kesinlik verileri.

Bileşikler	Derişim (µg/mL)	Geri Kazanım (%) ± SD	RSD (%)
Protokateşik Asit	0,5	99,620 ± 0,175	0,176
	5	99,211 ± 0,285	0,287
Kateşin	0,5	99,017 ± 0,280	0,283
	5	99,394 ± 0,150	0,151
Gentisik Asit	0,5	100,355 ± 0,200	0,199
	5	101,224 ± 0,280	0,277
Kafeik Asit	0,5	99,729 ± 0,170	0,170
	5	101,173 ± 0,705	0,697
p-Kumarik Asit	0,5	99,639 ± 0,402	0,404
	5	100,915 ± 0,120	0,119

Tablo 4.14 (devam): Günler arası kesinlik verileri.

Polidatin	0,5	99,384 ± 0,058	0,059
	5	100,087 ± 0,380	0,380
Kumarin	0,5	100,094 ± 0,334	0,334
	5	99,111 ± 0,130	0,131
Resveratrol	0,5	100,558 ± 0,198	0,197
	5	100,668 ± 0,357	0,355
Ellajik Asit	0,5	100,997 ± 0,320	0,317
	5	101,983 ± 0,465	0,456
Kuersetin	0,5	99,239 ± 0,450	0,454
	5	100,198 ± 0,234	0,233

Gün içi RT

Gün içi RT, aynı kromatografik koşullar altında standart çözeltilerin aynı gün içerisinde üç farklı zaman aralığında dokuz tekrarlı enjeksiyonları yapılarak hesaplanmış ve elde edilen sonuç Tablo 4.15'te gösterilmiştir. % RSD değerleri 0,068-0,670 aralığında saptanmıştır.

Tablo 4.15: Gün içi RT verileri.

Bileşikler	**Derişim (µg/mL)**	**RT ± SD**	**RSD (%)**
Protokateşik Asit	0,5	5,629 ± 0,016	0,278
	5	5,649 ± 0,016	0,279
Kateşin	0,5	7,141 ± 0,019	0,267
	5	7,169 ± 0,018	0,251
Gentisik Asit	0,5	8,155 ± 0,055	0,670
	5	8,233 ± 0,045	0,545
Kafeik Asit	0,5	9,394 ± 0,022	0,234
	5	9,426 ± 0,013	0,139
p-Kumarik Asit	0,5	12,025 ± 0,031	0,261
	5	12,065 ± 0,019	0,158
Polidatin	0,5	13,228 ± 0,031	0,237
	5	13,265 ± 0,023	0,176
Kumarin	0,5	14,889 ± 0,025	0,169
	5	14,918 ± 0,031	0,206
Resveratrol	0,5	17,389 ± 0,031	0,180
	5	17,425 ± 0,021	0,122
Ellajik Asit	0,5	18,791 ± 0.027	0,145
	5	18,815 ± 0,026	0,137
Kuersetin	0,5	21,288 ± 0,025	0,119
	5	21,327 ± 0,015	0,068

Günler arası RT

Günler arası RT, aynı kromatografik koşullar altında standart çözeltilerin üç farklı gün içerisinde üçer tekrarlı enjeksiyonları yapılarak hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.16'da gösterilmiştir. % RSD değerleri 0,133-0,500 aralığında saptanmıştır.

Tablo 4.16: Günler arası RT verileri.

Bileşikler	Derişim (µg/mL)	RT ± SD	RSD (%)
Protokateşik Asit	0,5	5,630 ± 0,014	0,249
	5	5,645 ± 0,019	0,341
Kateşin	0,5	7,144 ± 0,025	0,346
	5	7,177 ± 0,023	0,323
Gentisik Asit	0,5	8,152 ± 0,041	0,500
	5	8,197 ± 0,028	0,337
Kafeik Asit	0,5	9,400 ± 0,026	0,280
	5	9,437 ± 0,026	0,271
p-Kumarik Asit	0,5	12,028 ± 0,037	0,311
	5	12,079 ± 0,032	0,262
Polidatin	0,5	13,231 ± 0,042	0,315
	5	13,280 ± 0,029	0,218
Kumarin	0,5	14,902 ± 0,044	0,296
	5	14,945 ± 0,030	0,204
Resveratrol	0,5	17,395 ± 0,037	0,214
	5	17,431 ± 0,026	0,147
Ellajik Asit	0,5	18,805 ± 0,040	0,214
	5	18,815 ± 0,032	0,172
Kuersetin	0,5	21,297 ± 0,028	0,133
	5	21,327 ± 0,029	0,134

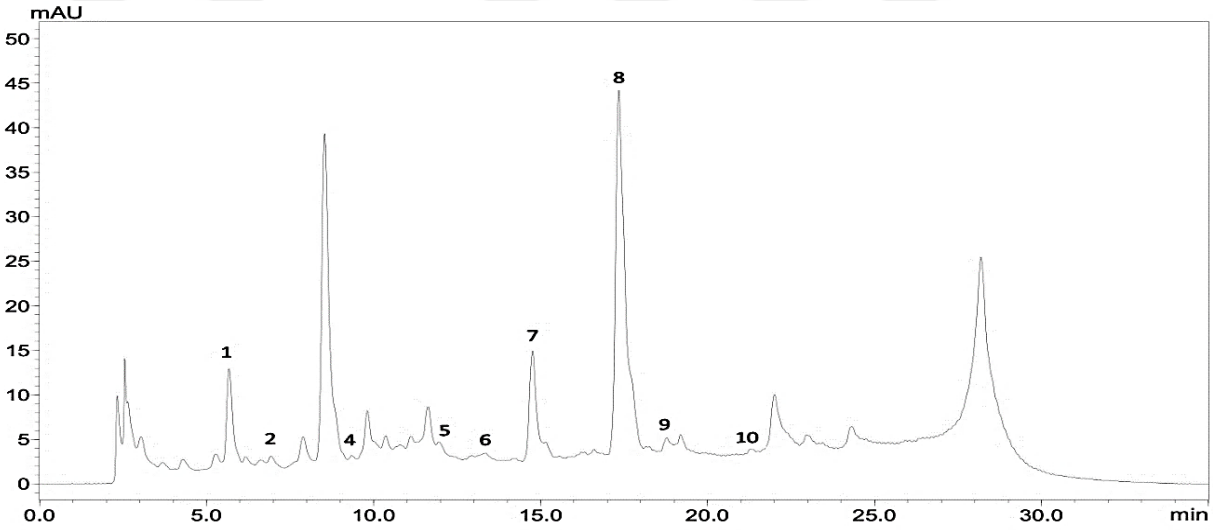
4.4.4. Madımak Bitkisindeki Fenolik Asit ve Flavonoidlerin Kantitatif Tayini

İki farklı şehir, iki farklı bölge ve iki farklı zamanda toplanan madımak bitki ekstraktlarında bulunan fenolik asit ve flavonoidlerin kantitatif analizi, geliştirilen ve valide edilen HPLC-DAD yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bitki ekstraktlarında bulunan fenolik asit ve flavonoidlerin miktarları, her bir bileşik için bileşiğe ait kalibrasyon grafiğinden elde edilen regresyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Madımak bitki ekstraktlarında bulunan bileşiklerin miktarları Tablo 4.17, Şekil 4.25 ve Şekil 4.27'te; bitki ekstraklarına ait kromatogramlar Şekil 4.24 ve Şekil 4.26'da verilmiştir. Her iki bitki ekstraktında da gentisik asit bileşiğine rastlanmamıştır.

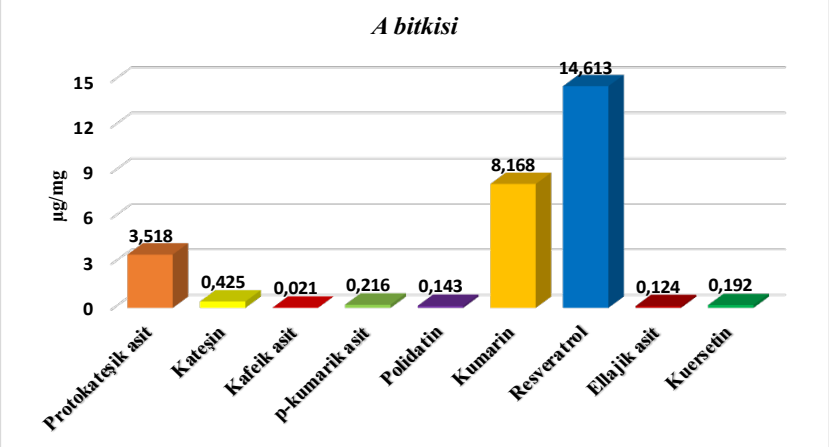
Tablo 4.17: Madımak bitki ekstraktlarında bulunan bileşik miktarları (µg/mg).

Bileşikler	**A bitkisi ± SD**	**B bitkisi ± SD**
Protokateşik Asit	3,518 ± 0,003	2,619 ± 0,002
Kateşin	0,425 ± 0,002	0,750 ± 0,003
Gentisik Asit	TE*	TE*
Kafeik Asit	0,021 ± 0,001	0,023 ± 0,001
p-Kumarik Asit	0,216 ± 0,001	0,166 ± 0,004
Polidatin	0,143 ± 0,003	0,136 ± 0,003
Kumarin	8,168 ± 0,005	4,845 ± 0,002
Resveratrol	14,613 ± 0,004	23,202 ± 0,006
Ellajik Asit	0,124 ± 0,002	0,106 ± 0,001
Kuersetin	0,192 ± 0,001	0,311 ± 0,001

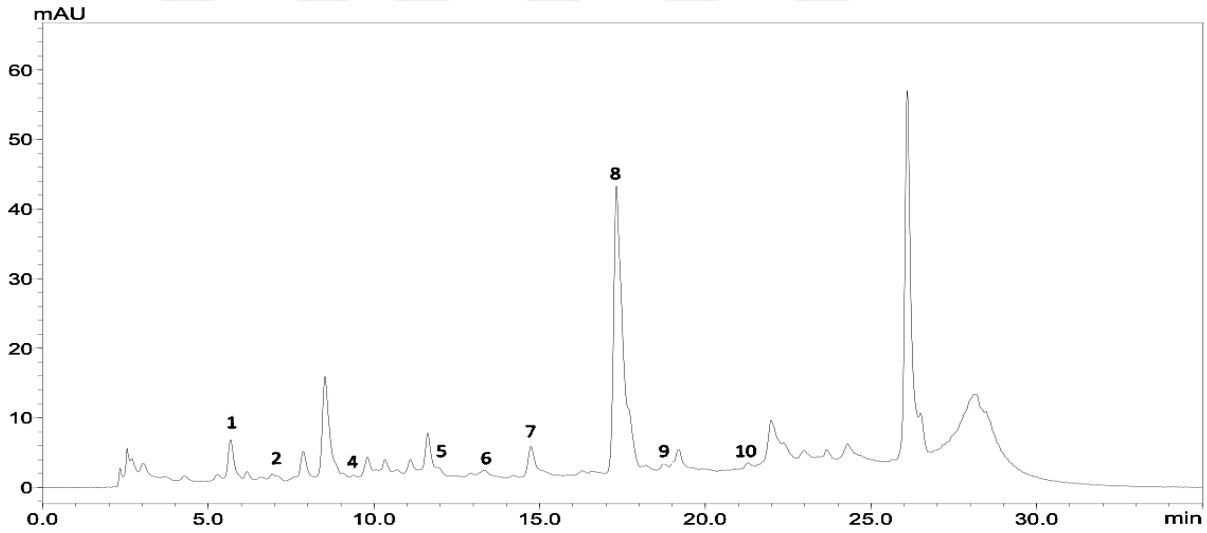
*TE: tespit edilemedi.



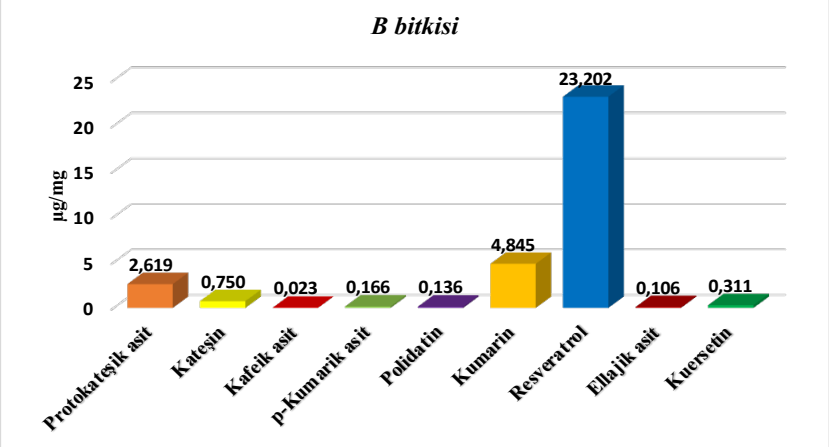
Şekil 4.24: A bitki ekstraktına ait kromatogram (1. Protokateşik asit, 2. Kateşin, 4. Kafeik asit, 5. p-Kumarik asit, 6. Polidatin, 7. Kumarin, 8. Resveratrol, 9. Ellajik asit 10. Kuersetin).



Şekil 4.25: A bitki ekstraktında bulunan bileşik miktarları (µg/mg).



Şekil 4.26: B bitki ekstraktına ait kromatogram (1. Protokateşik asit, 2. Kateşin, 4. Kafeik asit, 5. p-Kumarik asit, 6. Polidatin, 7. Kumarin, 8. Resveratrol, 9. Ellajik asit 10. Kuersetin).



Şekil 4.27: B bitki ekstraktında bulunan bileşik miktarları (µg/mg).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler birçok hastalığa karşı yüz yıllardır iyileştirici ve tedavi edici amaçla kullanılmaktadır (Al-Obaidi, 2021). Aromatik bitkiler, son yıllarda gerek dünya çapında gerekse ülkemizde tedavi edilmesi güç hastalıklar için alternatif bir yol oluşturmaktadır. Bitkilerin kullanım alanları zamanla genişlemiş ve eskiye nazaran bitkilerin hastalıklara karşı kullanımında göze çarpan bir artış meydana gelmiştir. Bu artışa bitki içeriklerinin ve bitkilerin farmakolojik aktivitelerinin aydınlatılmasına yönelik çalışmaların çoğalmasının bir etkisi olduğu bilinmektedir. Dünya çapında yaklaşık 360.000 tıbbi bitki bulunurken, ülkemizde 650 civarında tıbbi bitki tespit edilmiştir (Şekeroğlu ve Gezici, 2021).

Dünyanın dört bir yanında olduğu gibi ülkemizde şifalı bitkiler bakımından her bölgesinde farklı iklim, flora ve fauna özelliklere sahip olması nedeniyle, geniş bir bitkisel potansiyele sahiptir. Anadolu epidemik ve endemik bitkiler bakımından zengin bir floraya ev sahipliği yapar. Bu bitkiler, zamanla yetiştikleri doğal habitat ortamında kazandıkları özellikler sayesinde uzun yıllardır besin kaynağı, alternatif tıp ve sağlık uygulamaları gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Demirtaş ve Demirtaş, 2021). Anadolu'da yetişen 9000'den fazla bitkiden 3000 tanesinin sadece ülkemizde bulunduğu yani florada bulunan bitki türlerinin %30'unun endemik olduğu saptanmıştır (Önde ve Vurdu, 1988). Bu çeşitliliğe rağmen endemik türlere ait kapsayıcı çalışmalar çok azdır. Ülkemizdeki bitki potansiyelinin değerlendirilmesi, içeriklerinin aydınlatılması, bitki gen kaynakları ve biyoçeşitlilik açısından doğal bir müze haline getirilmesi gerekmektedir (Yılmaz ve Karahan, 1999).

Ülkemizde yetişen *Polygonum cognatum* Meissn. halk arasında bilinen ismiyle madımak bitkisi *Polygonacea* ailesine ait çok yıllık bitkidir (Eruygur ve diğ. 2020). Bitki, pembe çiçekli, yaprak kını gövdeyi saran, zarımsıdır ve gövde toprak üstüne yatık haldedir. Yol ve tarla kenarlarında sıkça rastlanan yabani bir bitkidir (Demir, 2006). Yabani bitkilerin insan sağlığı üzerinde olumlu etkisi bulunmaktadır ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip bileşikler içermektedirler (Saraç ve diğ. 2018). Madımak bitkisinin fenolik madde bakımından zengin bir bitki olduğu bilinmektedir (Macar ve Kalefetoğlu Macar, 2018). Yabani ve endemik bir tür olan madımak, halk tarafından idrar söktürücü, yara iyileştirici, ağrı kesici ve şeker hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Ulusoy ve diğ. 2018).

Tez çalışması kapsamında Sivas ve Ordu illerinden hasat edilen A ve B madımak bitkilerinin *in vitro* antioksidan aktivitesi DPPH yöntemiyle araştırılmıştır. DPPH yöntemi, DPPH radikalinin antioksidan bileşikler tarafından redoks tepkimesi ile süpürülmesi ilkesine dayanır. DPPH• radikali, koyu menekşe renkli organik azot bileşiklerindendir (Büyüktuncel, 2013). UV absorbsiyonu 515-525 nm aralığındadır. DPPH çözeltisi hidrojen atomu verdiğinde radikal indirgenir ve renkte değişim meydana gelir (Marangoz, 2020). DPPH yöntemi bitki ekstrelerinin radikali süpürme aktivitesinin tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır (Albayrak ve diğ. 2010).

Çalışmamızda, A ve B madımak bitki ekstraktlarının altı farklı derişimdeki DPPH radikal süpürme aktivitesi araştırılmıştır. 5 mg/mL ve 2,5 mg/mL bitki ekstresi derişimlerinde %95'in üzerinde; pozitif kontrol olan L-Askorbik asitin aktivitesi 100 µg/mL derişiminde %92'nin üzerinde aktivite bulunmuştur. Madımak bitki ekstraktlarının birbirine yakın aktivite gösterdiği ve 2,5 mg/mL derişiminden itibaren derişim arttıkça % DPPH radikal süpürme aktivitesinin, yaklaşık olarak sabit kaldığı gözlemlenmiştir. A ve B bitki ekstraktının IC_{50} değerleri sırasıyla 0,781 mg/mL ve 0,657 mg/mL olarak bulunmuştur. IC_{50} değerlerine göre analiz edilen A ve B bitki ekstraktlarının L-Askorbik aside göre anlamlı bir antioksidan aktivitesinin olmadığı saptanmıştır.

Çoban ve diğ. (2021) Erzurum'un altı farklı bölgesinden toplanan madımak bitkilerinin antioksidan aktivitelerini DPPH yöntemiyle araştırarak IC_{50} değerlerini 0,033- 0,140 mg/mL aralığında saptamışlardır. Bir başka çalışmada (Pekdemir ve diğ. 2020) Elazığ ilinden toplanan madımakların farklı çözücülerdeki aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Etanol, metanol, hekzan ve aseton çözücülerinde hazırlanan madımak ekstraklarının antioksidan aktivitesinin pozitif kontrol olarak kullanılan C vitaminine (Askorbik asit) daha düşük aktivite gösterdiğini, çözücüler arasında en yüksek aktivitenin metanol; en düşük aktivitenin hekzan çözücüsüne ait olduğunu belirlenmiştir. Eruygur ve diğ. (2020) Sivas ilinden hasat edilen madımak bitkisinin etanol ekstraktında % DPPH radikali süpürme aktivitesini Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ile karşılaştırarak yorumlamışlardır. Madımak bitkisi diğer çalışmalarda olduğu gibi pozitif kontrole göre daha düşük aktivite göstermiştir. Murathan (2018), Ardahan ilinden toplanan madımak bitkisinin metanol ekstraktının aktivitesini %46,2 olarak bulmuştur. Literatür taramasında, Madımak bitkisinin kullanılan çözücüye göre farklı aktivite gösterdiği ve çalışmalarda konsantrasyon arttıkça DPPH radikali süpürme aktivitesinin arttığı bulunmuştur.

Çalışmada elde edilen sonuçların literatüre göre yakın ya da daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bunun nedeninin hasat yeri, hasat zamanı veya ekstraksiyon yönteminden ileri geldiği düşünülmektedir.

Madımak bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi nokta damlatma ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylucoccus epidermidis* (ATCC 1228) ile hastane enfeksiyonuna sebebiyet veren Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591) ve Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) (ATCC 51299) Gram pozitif bakterilerine, *Acinetobacter baumanii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922*), Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Salmonella typhii* (ATCC 14028) Gram negatif bakterilerine *ve Candida albicans* (ATCC 10231) mantarına karşı araştırılmıştır.

Nokta damlatma-ekim yönteminde madımak bitkisi ham ekstraktının mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bitkinin metanol ekstraktı en güçlü antibakteriyel aktiviteyi 23 mm inhibisyon zonu ile Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli* bakterisine; 20 mm inhibisyon zonu ile Gram pozitif bakterilerden hastane enfeksiyonuna sebebiyet veren Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) bakterisine karşı göstermiştir. Madımak bitkisi metanol ekstraktının *Acinetobacter baumanii, Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae,* Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhii, Staphylococcus aureus ve Staphylucoccus epidermidis* bakterilerine orta derecede etki ettiği, en düşük aktiviteyi 13 mm'lik inhibisyon zon çapı ile *Bacillus cereus*'a karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı oluşan inhibisyon zon çaplarının ortalamaları alındığında, madımak bitkisine ait metanol ekstraktın Gram negatif bakterilerde daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Nokta damlatma yöntemi ile yapılan aktivite araştırmasında madımak bitki ekstraktının antifungal aktivitesinin antibakteriyel aktivitesinden daha yüksek olduğu; test organizmaları içerisinde en güçlü antimikrobiyal aktiviteyi 25 mm ile inhibisyon zonu ile *Candida albicans* mantarına karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Pekdemir ve diğ. (2020), madımak bitkisinin etanol, metanol, hekzan, aseton ekstraklarının *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5 bakteri suşları ve *Candida albicans* FMC 1 mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitelerini disk difüzyon yöntemiyle araştırmış, bitki ekstraktlarının çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı etkili olduğunu saptamışlardır. En yüksek inhibisyon zonları,

aseton ekstraktında *E. coli ve B. subtilis*; hekzan ekstraktında ise sadece *B. subtilis* e karşı (10 mm) oluşmuştur. Metanol ekstraktında ise zon çapları 7-8 mm aralığında ölçülmüştür. Çalışmamızda, Pekdemir ve diğ. (2020) kıyasla metanol ekstraktında mikroorganizmalara karşı daha yüksek inhibisyon zon çapları elde edilmiştir. Yıldırım ve diğ. (2003) Sivas ilinden toplanan madımak bitkilerinin eter, etanol ve su ile ekstraksiyonları gerçekleştirmiş ve ekstrakların *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)*, Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 60193) *ve Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145)'a karşı etkisini disk difüzyon yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz ham ekstrakt sonuçlarına benzer şekilde, su ekstresinde antimikrobiyal etkiye rastlamamışlardır. Eter ekstraktlarında inhibisyon zon çapları *S. aureus* (ATCC 25923)'a karşı 17 mm, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)'e karşı 16 mm olarak ölçülürken; etanol ekstraktlarında inhibisyon zon çapları *S. aureus* (ATCC 25923)'a karşı 10 mm hesaplanırken, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)'e karşı 8 mm olarak ölçmüşlerdir. Diğer mikroorganizmalara karşı inhibisyon zonu saptamamışlardır. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların farklı düzeyde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu anlaşılmış ve elde edilen veriler literatür ile karşılaştırıldığında çalışmamızda daha güçlü antimikrobiyal aktivite verileri elde edildiği saptanmıştır.

Mikroorganizma üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) olarak tanımlanmaktadır. Bitki ekstraktlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ile *Candida albicans*'a karşı MİK değerleri araştırılmıştır. Ham ekstraktın tüm dozlarında üreme görülmüş, inhibe edici doz saptanamamıştır. Metanol ekstraktının MİK değerleri çalışılan tüm mikroorganizmalarda 4,75 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Literatürde Eruygur ve diğ. (2020) Sivas ilinden hasat edilen madımak bitkisinin etanol ekstraktında MİK değerlerini *E. coli* (ATCC 25922)'de 0,625 mg/mL; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)'da 0,312 mg/mL; *S. aureus* (ATCC 29213)'da 0,156 mg/mL; *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)'da >2,5 mg/mL, ; *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) 'da >2,5 mg/mL ve *Candida albicans* (ATCC 10231)'da 2,5 mg/mL bularak çeşitli mikroorganizmalara karşı farklı değerleri elde etmişlerdir. Pekdemir ve diğ. (2020) metanol ve etanol ekstraktlarının tüm mikroorganizmalara karşı MİK değerlerini 0,625 mg/mL; aseton ekstraktının, *E. coli*, *B.*subtilis'a karşı MİK değerlerini 0.312 mg/mL ve *K. pneumoniae*, *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı MİK değerlerini 0,625 mg/mL; hekzan ekstraktının *B. subtilis*'a karşı MİK değerini 0,312 mg/mL olarak bulunurken diğer mikroorganizmalara karşı 0,625 mg/mL olarak bulmuşlardır.

Farklı çözücü ekstraktlarının farklı düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiği göz önünde bulundurularak, metanol ekstraktı için elde edilen sonuçların literatürde ortaya konulan sonuçlara göre daha düşük aktivite gösterdiği ancak Pekdemir ve diğ. (2020) bulduğu gibi madımak bitkisinin metanol ekstraktının MİK değerlerinin tüm mikroorganizmalarda eşit olduğu saptanmıştır.

Bakterilerin ölümüne sebebiyet veren konsantrasyon MBK (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon); mantarların ölümüne sebebiyet veren konsantrasyon MFK (Minimal Fungisidal Konsantrasyon) olarak tanımlanmaktadır. MİK değerlerinin hesaplanmasının ardından *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylucoccus epidermidis* ile hastane enfeksiyonuna sebebiyet veren Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* (VRE), *Acinetobacter baumanii, Escherichia coli* (ATCC 25922*), Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhii'*a karşı MBK ve *Candida albicans* (ATCC 10231)'a karşı MFK değerleri hesaplanmıştır. Hastane enfeksiyonuna yol açan Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) bakterisi hariç tüm bakteriler için MBK değeri ve *Candida albicans* için MFK değeri 4,75 mg/mL olarak ölçülerek MİK değerleri ile aynı bulunmuştur. Vankomisin dirençli *Enterococcus faecium* (VRE) bakterisi için MBK değeri 5,00 mg/mL olarak belirlenmiştir. Literatürde madımak bitkisinin MBK ve MFK değerlerine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda madımak ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi farklı yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Literatürde madımak bitkisiyle ilgili rapor edilen çalışmalar, her yöntem kapsamında ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Daha önce bildirilen sonuçlar ile deney sonuçları kıyaslandığında veriler arasındaki farklılığın, madımak bitkisinin yetiştiği toprak yapısı, iklim koşulları, maruz kaldığı stres seviyesi gibi çevresel koşullardan kaynaklı olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca farklılıkların, çalışılan mikroorganizma türleri, ekstraksiyon çözücüleri, ekstraksiyon yöntemleri ve inkübasyon koşullarından ileri geldiği düşünülmektedir. Bitkilerin çevresel kaynaklı farklı kimyasal profiller sergilediği bilinmektedir ve bitki ekstrelerinin aynı mikroorganizma suşları üzerinde dahi gösterdiği farklılıklar, bu aktif bileşenlerin farklılığı ile açıklanabilir.

MTT yöntemi, ilk kez 1983 yılında Tim Mosmann tarafından hücre canlılığını tespit etmek için kullanılmıştır. Hücre canlılığının saptanmasında kullanılan ve MTS, XTT ve WST-1 gibi tetrazolyum bileşiklerinden birisi olan MTT, ökaryotik hücrelerde canlı hücrelerin

mitokondriyal aktivitesinin ölçümünde kullanılır. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromürün (MTT) yöntemi kolorimetrik bir yöntemdir (Roy ve diğ. 2021).

Madımak bitkisinin *in vitro* sitotoksik aktivitesi, MTT yöntemi kullanılarak bitki ekstraktlarının L929 ve SAOS-2 hücre hatlarına uygulanmasıyla araştırılmıştır. % Hücre canlılığı, negatif kontrol %100 canlı kabul edilerek hesaplanmıştır. 24. saatte, L929 hücre hattında A bitkisinin % hücre canlılık oranı %160,182-%121,992; B bitkisinin % hücre canlılık oranı %156,997-%135,546 aralığında bulunmasına karşın pozitif kontrolde bu oran %7,958'dir. Madımak bitkisinin normal hücre hattında sitotoksik aktiviteye sahip olmadığı, sağlıklı hücrelerde canlılığın artışına neden olduğu saptanmıştır. L929 hücre hattına uygulanan A ve B bitki ekstraktlarının negatif kontrole göre proliferatif etkisi gözlemlenmiştir.

SAOS-2 kanser hücre hattında ise % hücre canlılığı A bitkisininde %111,341- %63,492; B bitkisinde %137,141- %99,483 aralığındayken pozitif kontrol %6,817 olarak bulunmuştur. SAOS-2 hücre hattına 8 ve 10 mg/mL dozlarınında uygulanan A bitki ekstraktının negatif kontrole göre antiproliferatif etkisi gözlemlenirken; B bitki ekstraktında ise sadece 10 mg/mL dozunda antiproliferatif etki gözlemlenmiştir. Uygulanan tüm bitki dozlarında en yüksek sitotoksik etkiye %63,492 hücre canlılık oranı ile A bitkisi 10 mg/mL dozunun sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, SAOS-2'ye karşı A bitkisi B bitkisine göre daha güçlü bir sitotoksik etki göstermiştir.

Eruygur ve diğ. (2020) madımak bitkisi etanol ekstraktının MDA-MB-231 ve L929 hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesini XTT yöntemiyle araştırmışlardır. Hücre hatlarını, farklı derişimlerdeki (0,0625-1 mg/mL) bitki ekstrakları ile 24 saat inkübe etmişler ve negatif kontrol olarak %0,5 DMSO içeren DMEM kullanmışlardır. Sonuçlar, madımak bitkisinin konsantrasyona bağlı olarak antikanser aktivite göstermiştir ($p < 0,05$). MDA-MB-231 hücre hattında IC_{50} değerleri 0,053 mg/mL olarak hesaplanmış ve bizim çalışmamızda olduğu gibi bitki ekstraktının çalışılan dozlarında L929 hücre hattı üzerinde önemli bir sitotoksik etkiye rastlamamışlardır.

Pekdemir ve diğ. (2020) yaptıkları çalışmada etanol, metanol, aseton ve hekzan madımak ekstraktlarının *in vitro* antikanserojen aktivitesini, insan mide kanseri (MKN-45), insan prostat kanseri (PC3) ve insan meme kanseri (MCF-7) hücre hatları üzerinde WST-1 testi uygulamışlardır. Hücre canlılığını, hücre hatları 1, 10, 100 ve 1000 µg/mL bitki ekstraktları ile

muamele edilerek 24-48 saatlik saatlik inkübasyonun ardından WST- 1 yöntemiyle belirlemişlerdir. Negatif kontrol olarak %0,5 DMSO içeren DMEM kullanmışlardır. MCF-7 kanser hücre hattında etanol ekstraktı hariç tüm ekstraktlarda hücre canlılık oranında anlamlı bir azalma görmüşlerdir ($p < 0,05$). En yüksek sitotoksik aktivite metanol ve hekzan ekstraktlarının 1000 µg/mL, aseton ekstraktının ise 100 µg/mLve 1000 µg/mL derişimlerinde saptanmıştır. IC_{50} değerleri göz önüne alındığında, en yüksek sitotoksik etki aseton ekstraktında hesaplanmıştır. PC3 kanser hücre hattında en yüksek sitotoksik aktivite aseton ekstraktında bulunurken; 1 µg/mL aseton, metanol ve etanol ekstraktı haricinde doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma ve IC_{50} değerine (20,26 µg/mL) göre sadece metanol ekstraktında dikkate değer sitotoksik etki gözlemlenmiştir. MKN-45 hücre hattında ise çalışılan tüm dozlarda hücre canlılığının kontrole göre doza bağlı olarak azaldığı ($p < 0,05$) ve IC_{50} değerlerine göre başta hekzan ekstraktı olmak üzere tüm bitki ekstraktların etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Saraç ve diğ. (2018) XTT yöntemi kullanarak madımak bitkisinin MCF-7 ve HUVEC hücre hatlarına etkisini belirlemişlerdir. Yedi farklı derişimde (1, 10, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL) bitki ekstraktını 24 saat süresince kültürlere uygulamışlardır. Su ektraktı için insan sağlıklı epitelyal hücreleri (HUVEC) üzerinde sadece 1000 µg/mL dozunda zayıf gözlenirken, kontrol grubuna göre bu etkinin MCF-7 hücre hattında doza bağlı olarak azaldığı dolayısıyla sitotoksik etkisi olduğu saptamıştır ($p < 0,05$). Madımak bitkisinin 100 µg/mL dozunun üzerindeki tüm dozlarının MCF-7 hücre hattına muamelesinin, hücre canlılığını dikkate değer derecede azalttığı ve iki hücre hattında 1 ve 10 µg/mL dozları dışındaki tüm muamalelerin anlamlı derecede ($p < 0,05$) farklılığa sahip olduğu bulunmuştur. Bitki ekstraktının MCF-7 hücre hattında IC_{50} değeri 400 µg/mL'dir.

Tüm araştırmalar doğrultusunda, A bitkisinin SAOS-2 hücre hattı üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. A bitkisinin diğer hücre hatları üzerinde farklı derişimlerde ve farklı inkübasyon sürelerinde (24, 48 ve 72 saat) çalışılması düşünülmektedir.

Fenolik bileşik ve flavonoid içeren bitkilerin antioksidan, antikanserojen, antiinflamatuar ve serbest radikal temizleme aktiviteleri gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları çalışmalar ile gösterilmiştir (Bhuvaneswari Santharam ve diğ. 2015). Bu nedenle bitkilerde bulunan fenolik asit ve flavonoidlerin saptanması ilerleyen çalışmalar için önem arz etmektedir. Fenolik asit ve flavonoidlerin tayininde ince tabaka kromatografisi, gaz-sıvı kromatografisi, gaz

kromatografisi-kütle spektrometrisi veya kapiler elektroforez dahil olmak üzere birçok analitik yöntem kullanılmaktadır (Mattila ve Kumpulainen, 2002). Fenolik asit ve flavonoidlerin tayininde kullanılan yöntemlerden bir tanesi de Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)'dir (Mattila ve Kumpulainen, 2002; Mesquita ve Monteiro, 2018). HPLC fen bilimlerinin birçok alanında kullanılan bir kromatografi yöntemidir (Bengü, 2021).

Bu çalışmada protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polidatin, kumarin, resveratrol, ellajik asit ve kuersetin bileşiklerinin eş zamanlı kalitatif ve kantitatif tayini için yeni bir HPLC-DAD yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Analiz SUPELCOSIL LC-18 (25cm x 4,6mm, 5µm) kolonuyla gerçekleştirilmiş, gradient programda enjeksiyon hacmi 20 µL ve dalga boyu 240 nm olarak belirlenmiştir. Bileşiklerin ayrımını sağlayacak en iyi koşulların belirlenmesi amacıyla, A mobil fazı yüzde fosforik asit oranı, akış hızı ve kolon sıcaklığı optimizasyonu yapılmıştır.

Optimum ayırma koşullarının belirlenmesinde kapasite faktörü (k) değerinin 1'den büyük, seçicilik faktörünün (α) 1,15'ten büyük ve ayırma gücü (Rs) değerlerinin 1,5'ten büyük olması gibi kriterler dikkate alınmıştır. A mobil fazı yüzde fosforik asit oranı optimizasyonunda beş farklı yüzde fosforik asit oranı (%0,0-%0,01- %0,1- %0,5- %1,0) çalışılmış, en iyi ayırma %0,5 fosforik asit-deiyonize su karışımında elde edilmiştir. Akış hızı enjeksiyon süresini en çok etkileyen parametredir. Çalışılan dört farklı akış hızında (0,8 mL/dk, 1,0 mL/dk, 1,2 mL/dk, 1,5 mL/dk) elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış, optimum akış hızı 1,2 mL/dk olarak belirlenmiştir. Metot optimizasyonu çalışmasının son aşaması en uygun kolon sıcaklığının belirlenmesidir. Kolon sıcaklığının biyolojik numuneler üzerindeki etkisi, numunenin yapısında değişime neden olması açısından önemlidir. Optimum kolon sıcaklığının saptanması amacıyla dört farklı kolon sıcaklığı (20°C, 25°C, 30°C, 35°C) uygulanmış ve pik simetrisi, ayırma gücü gibi parametreler değerlendirilerek kolon sıcaklığı olarak 25°C seçilmiştir. Kalitatif ve kantitatif tayinler optimum ayırma koşulu olarak belirlenen %0,5 fosforik asit-deiyonize su ortamında, 1,2 mL/dk akış hızı ve 25°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Metot validasyonunda, öncelikle geliştirilen yöntemin uygunluğu araştırılmıştır. Sistem uygunluk testlerinde (SUT) kapasite faktörü (k), seçicilik (α), kuyruklanma faktörü (T_f), tabaka sayısı (N), ayırma gücü (R_s) ve alıkonma zamanının yüzde relatif standart sapması referans değerler ile karşılaştırılmış, metot değerlerinin referans değerlere uygunluğu saptanmıştır. Çalışmanın doğrusal olduğu aralığın saptanması amacıyla iç standart kaşibrasyon tekniği

kullanılmıştır. Tüm bileşikler için kalibrasyon grafikleri 0,25-10 ppm aralığında doğrusal olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayıları (R^2) 0,9999 ile 1 aralığında bulunarak yüksek doğrusallık elde edilmiştir. Korelasyon katsayıları literatür ile karşılaştırıldığında, elde edilen R^2 değerleri literatüre yakın ya da literatürden daha yüksek olduğu görülmektedir (An ve diğ. 2013; Hsu ve diğ. 2017; Kuppusamy ve diğ. 2018; Yu ve diğ. 2021; Zhang ve diğ. 2019). Tayin limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ) değerleri geliştirilen metodun tayin sınırlarını belirlemektedir. Doğrusallık verilerinden hesaplanan LOD ve LOQ değerleri sırasıyla, 0,051-0,188 µg/mL ve 0,169- 0,628 µg/mL aralığında saptanmıştır. Elde edilen verilerin bileşiklerin kesin ve doğru tayinine olanak verdiği görülmüştür. Bileşiklerin LOD değerlerinin literatüre yakın hatta literatüre kıyasla daha düşük değerler olduğu görülmektedir (Kuppusamy ve diğ. 2018). Metodun kesinliği, sonuçların tekrar edilebilmesini ifade eder. Kesinlik çalışmalarında gün içi (tekrar edilebilirlik) ve günler arası (orta-kesinlik) analizler yapılarak % geri kazanım ve % RSD verileri değerlendirilmiştir. Gün içi analizlerde % geri kazanım 99,273-101,032, % RSD 0,090-0,652; günler arası analizlerde % geri kazanım 99,017-101,983, % RSD 0,059-0,697 aralığında tespit edilmiştir. % RSD değerinin %2'den az olması yöntemin tekrar edilebilir ve orta-kesin olduğunun bir ifadesidir. Literatürde, bileşiklerin gün içi ve günler arası % RSD değerlerini incelendiğinde, literatüre yakın hatta literatüre kıyasla daha düşük % RSD değerleri elde edilmiştir. An ve diğ. (2013) gün içi ve günler arası kesinlik % RSD değerlerini sırasıyla, kafeik asit için %0,41 ve %1,23; kuersetin için %0,75 ve %0,93 olarak saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise gün içi ve günler arası kesinlik % RSD değerleri, gentisik asit için %4,8 ve %3,7; kafeik asit için %4,1 ve %3,9; p-kumarik asit için %1,6 ve %2,4 olarak belirlenmiştir (Zhang ve diğ. 2019). RT değerleri gün içi ve günler arası analizlerle % RSD verileri üzerinden değerlendirilmiştir. Gün içi analizlerde % RSD 0,068-0,670; günler arası analizlerde % RSD 0,133-0,500 aralığında tespit edilmiştir.

A ve B bitkisinin kantitatif tayini geliştirilen HPLC-DAD yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Madımak bitkisi içerisindeki protokateşik asit, kateşin, gentisik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, polidatin, kumarin, resveratrol, ellajik asit ve kuersetin bileşiklerinin miktarları tespit edilmiştir. A bitkisinde en düşük miktarda tayin edilen bileşik 0,021 µg/mg ile kafeik asit, en yüksek miktarda tayin edilen bileşik 14,613 µg/mg ile resveratroldür. B bitkisinde de A bitkisinde olduğu gibi en düşük miktarda tayin edilen bileşik 0,023 µg/mg ile kafeik asit, en yüksek miktarda tayin edilen bileşik 23,202 µg/mg ile resveratrol olarak bulunmuştur. Her iki bitki örneğinde de gentisik asit bileşiği tespit edilmemiştir. İki bitki örneği arasında bulunan bileşik

miktarlarındaki farklılık bitkinin hasat yeri, hasat zamanı, yetişme ortamı gibi durumlardan kaynaklanmaktadır. A ve B bitkisinde tespit edilen fenolik asit ve flavonoid bileşiklerinin bitkinin antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Agić, D., Abramić, M., Rastija, V., Vuković, R., 2018, *Polyphenolic Flavonoids and Metalloprotease Inhibition: Applications to Health and Disease*, Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease, In: R. R. Watson, V. R. Preedy, S. Zibadi (ed.), Chapter 4, Academic Press, ISBN: 978-0-12-813006-3, 33-40.

Akyüz, O., Ağırbaş, E., 2020, HPLC Pigment Analizinde Kullanılan Kromatografik Ayırma Parametreleri ve Güneydoğu Karadeniz Pigment Dinamiği, *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi,* 5(4), 570-580.

Al Jitan, S., Alkhoori, S. A., Yousef, L. F., 2018, *Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health*, Studies in Natural Products Chemistry, In: R. Atta ur (ed.), Chapter 13, Elsevier, ISBN: 1572-5995, 389-417.

Al-Obaidi, J. R., 2021, *Proteomics research in aromatic plants and its contribution to the nutraceuticals and pharmaceutical outcomes,* Medicinal and Aromatic Plants, In: T. Aftab, T. and Hakeem, K. R. (ed.), Chapter 10, Academic Press, ISBN: 978-0-12-819590-1, 223-239.

Alan Xu, Q., 2013, Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications.

Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., 2010, Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi,* 26(4), 401-409.

Altanlar, N., 1999, Vulvovajinal *Candıdıasıs* Olgularından İzole Edilen *Candidaların* Türlere Göre Dağılımı, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28(1), 61-70.

An, H., Wang, H., Lan, Y., Hashi, Y., Chen, S., 2013, Simultaneous qualitative and quantitative analysis of phenolic acids and flavonoids for the quality control of *Apocynum venetum* L. leaves by HPLC–DAD–ESI–IT–TOF–MS and HPLC–DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 85, 295-304.

Ankaralıgil, P., Aydeniz-Güneşer, B., 2021, Fonksiyonel Gıda Bileşenlerinin Tespit Edilmesinde Enstrümental Analiz Tekniklerinin Önemi, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi,* 28, 251-258.

Anonim, 2013, *Principles of herbal pharmacology*, Principles and Practice of Phytotherapy, In: Bone, K., Mills and S. (ed.), Chapter 2, Churchill Livingstone, Saint Louis, ISBN: 978-0-443-06992-5, 17-82.

Antony Muthu Prabhu, A., Fatiha, M., Sivaraman, B., Yáñez-Gascón, M. J., Pérez-Sánchez, H., 2018, Effect of natural and modified cyclodextrins on the excited state proton transfer of 7-hydroxy-4-methylcoumarin, *Journal of Molecular Liquids*, 268, 911-924.

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capa-

bility in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

Arı, F., Karakaş, D., Cevatemrea, B., Debreli Coşkun, M., Ulukaya, E., 2012, Bitki Ekstraktlarında Kullanılan MTT Metodu Ne Kadar Güvenilir?, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 03–07 Eylül 2012 İzmir, 72-73.

Atak, E., Uslu, M. E., 2018, Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri. *M C B Ü Soma Meslek Yüksekokulu*, 27(3).

Atınç, M., Kalkan, İ., 2018, Flavonoidler ve Sağlık Üzerine Etkileri, *Aydın Gastronomy*, 2(1), 31-38.

Avcı, M., 2012, Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü, *Coğrafya Dergisi,* (13).

Avşar, C., Keskin, H., Berber, İ., 2016, Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen Mikroorganizmalara Karşı Bazı Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi, *International Journal of Pure and Applied Sciences*, 2(1), 22-29.

Ayaz Seyhan, S., 2019, DPPH· Antioksidan Analizinin Yeniden Değerlendirilmesi, *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 9(2), 125-135.

Badr, M., 2012, *The ribosome-inactivating protein gelonin and parts thereof to be employed for a potential treatment of cancer,* Thesis (PhD), Technical University Kaiserslautern.

Barba, F. J., Esteve, M. J., Frígola, A., 2014, *Bioactive Components from Leaf Vegetable Products*, Studies in Natural Products Chemistry, In: Atta ur, R. (ed.), Chapter 11, Elsevier, ISBN: 1572-5995, 321-346.

Bardakci, H., Acar, E. T., Kırmızıbekmez, H., 2019, Simultaneous quantification of six flavonoids in four *Scutellaria* taxa by HPLC-DAD method, *Revista Brasileira de Farmacognosia,* 29(1), 17-23.

Barile, F. A., 1997, *Continuous Cell Lines as a Model for Drug Toxicity Assessment*, İn Vitro Methods in Pharmaceutical Research, In: Castell, José V., Gómez-Lechón, María José (ed.), Chapter 3, Academic Press, San Diego, ISBN: 978-0-12-163390-5, 33-54.

Bayraç, C. ve Camızcı, G., 2020, HPLC Metodu İle Patulin Tayininde Tek Laboratuvar Metot Validasyon Çalışması, *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi,* 9(1), 285-296.

Benek, A., Şenturan, M., Şimşek, Ö., Canlı, K., Altuner, E. M., 2021, Bazı Karayosunu ve Ciğerotu Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi, A*nadolu Briyoloji Dergisi,* 7(1), 1-7.

Bengü, A. Ş., 2021, HPLC Tekniği ve Kullanım Alanları, *Bingöl Üniversitesi Sağlık Dergisi (BUSAD)*, 2(1), 64-69.

Bhuvaneswari Santharam, Ganesh P., Soranam R., V., Divya V., J., Packia Lekshmi N. C., 2015, Evaluation of invitro free radical scavenging potential of various extracts of whole plant of *Calycopteris floribunda* (Lam.), *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 860-864.

Boyraz, M. Ü., Shekhany, B., Süzergöz, F., 2021, Cellular Imaging Analysis of MTT Assay Based on Tetrazolium Reduction, *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 18(1), 95-99.

Bozorg-Haddad, O., Delpasand, M., Loáiciga, H. A.,2021, *Water quality, hygiene, and health.,* Economical, Political, and Social Issues in Water Resources, In: Bozorg-Haddad, O. (ed.), Chapter 10, Elsevier, ISBN: 978-0-323-90567-1, 217-257.

Bushra, R., 2018, *Functionalized Nanomaterials for Chromatography*, Nanomaterials in Chromatography, In: Hussain, C. M., Chapter 15, Elsevier, ISBN: 978-0-12-812792-6, 403-414.

Büyüktuncel, E., 2013, Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanilan baslica spektrofotometrik yöntemler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2(17), 93-103.

Cai, X., Qi, J., Xu, Z., Huang, L., Li, Y., Ren, X., Kong, Q., 2022, Three stilbenes make difference to the antifungal effects on ochratoxin A and its precursor production of *Aspergillus carbonarius*, *Food Microbiology*, 103, 103967.

Cakilcioglu, U., Turkoglu, I., 2010, An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 165-175.

Chandrasekara, A., 2019, *Phenolic Acids*, Encyclopedia of Food Chemistry, In: Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P. (ed.), Academic Press, Oxford, ISBN: 978-0-12-814045-1, 535-545.

Civelek, Z., 2021, *Antifungal etkili naftifin hidroklorür'ün spektrofotometrik ve HPLC yöntemleriyle kantitatif analizi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.

Coskun, O., 2016, Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, 3(2), 156–160.

Crowley, T. E., 2020, *High-performance liquid chromatography*, Purification and Characterization of Secondary Metabolites, In: Crowley, T. E. (ed.), Chapter 5, Academic Press, ISBN: 978-0-12-813942-4, 49-58.

Çağlar, M. Y., Demirci, M., 2017, Üzümsü Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler ve Beslenmedeki Önemi, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(11), 18-26.

Çelik Onar, H., Hasdemir, B., Yaşa, H., Alevli, B., 2010, Bazı Kumarinlerin Sentezleri ve Yapılarının Aydınlatılması, *24. Ulusal Kimya Kongresi*, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak.

Çoban, F., Tosun, M., Özer, H., Güneş, A., Öztürk, A., Atsan, E., Polat, T., 2021, Antioxidant activity and mineral nutrient composition of *Polygonum cognatum*- a potential wild edible plant, *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 20(1), 221-229.

Dally, J. E., Monck, M. A., 2020, *Biotechnology products: validation of analytical methods*, Specification of Drug Substances and Products, In: Riley, C. M., Rosanske, T. W., Reid, G. (ed.), Chapter 22, Elsevier, ISBN: 978-0-08-102824-7, 587-603.

Demir, H., 2006, Erzurum'da Yetişen Madımak, Yemlik ve Kızamık Bitkilerinin Bazı Kimyasal Bileşimi, *Bahçe*, 35(1-2), 55-63.

Demirtaş, N., Demirtaş, M. H., 2021, Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Ekoturizm Açısından Değerlendirilmesi: Çakşır (*Ferula meifolia*) Örneği, *Turizm Çalışmaları Dergisi* 3(1), 31-42.

Duran, N., Gülbol Duran, G., Öztaş, H., Özcan, B., 2010, Adana Propolis Örneklerinin Antibakteriyel ve Antifungal Etkisinin Araştırılması, *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1(1), 07-14.

Eldin, A. B., 2011, Validation of an Analytical Procedure. In Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, 17-24, *Sigma Pharmaceutical Corp.*

Erkekoğlu, P., Baydar, T., 2021, Güncel *In Vitro* Sitotoksisite Testleri, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.

Eruygur, N., Ucar, E., Ataş, M., Ergul, M., Ergul, M., Sozmen, F., 2020, Determination of biological activity of *Tragopogon porrifolius* and *Polygonum cognatum* consumed intensively by people in Sivas, *Toxicology Reports*, 7, 59-66.

Eser, B., Sepici Dinçel, A., 2018, Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları, *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51-57.

Fanali, C., Dugo, P., Mondello, L., D'Orazio, G., Fanali, S., 2012, R*ecent Developments in High-Performance Liquid Chromatography*, Food Analysis by HPLC, In: Nollet L. M. L., Toldrá, F. (ed.).

Fotakis, G., Timbrell, J. A., 2006, *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters,* 160(2), 171-177.

Freeberg, M. A. T., Kallenbach, J. G., Awad, H. A., 2019, *Assessment of Cellular Responses of Tissue Constructs in vitro in Regenerative Engineering*, Encyclopedia of Biomedical Engineering, In: Narayan, R. (ed.), Elsevier, Oxford, ISBN: 978-0-12-805144-3, 414-426.

Gidemen, M., 2021, *Ceviz (Juglans regia L.) sütünün çeşitli kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğinin antimikrobiyal, antioksidan ve prebiyotik aktivite ile birlikte değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hitit Üniversitesi.

Goel, A., Sahil Sharma, S., 2019, A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Journal of Scientific Computing*, 8(8), 1-9.

Gökçen, İ. S., Keskin, N., Kunter, B., Cantürk, S., Karadoğan, B., 2017, Üzüm Fitokimyasalları ve Türkiye'de Yetiştirilen Üzüm Çeşitleri Üzerindeki Araştırmalar, *Turkish Journal of Forest Science*, 1(1), 93-111.

Güleşci, N., Aygül, İ., 2016, Beslenmede Yer Alan Antioksidan ve Fenolik Madde İçerikli Çerezler, *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 109-129.

Günal, N., 2013, Türkiye'de İklimin Doğal Bitki Örtüsü Üzerindeki Etkileri, *Çevrimiçi Tematik Türkoloji Dergisi*, 1, 1-22.

Güneş, E., Zengin, G., Uysal, A., Aktümsek, A., Durak, Y., 2014, *Hyoscyamus retıculatus*'un Hekzan ve Su Özütlerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Bir Çalışma, *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 39, 21-29.

Gürağaç Dereli, F. T., Ilhan, M., Kozan, E., Küpeli Akkol, E., 2019, Effective eradication of pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) with *Polygonum cognatum* Meissn., *Experimental Parasitology*, 196, 63-67.

Herrero, M., Castro-Puyana, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., 2013, *Compositional Analysis of Foods,* Liquid Chromatography, In: Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., Schoenmakers, P., Lloyd, D. (ed.), Chapter 11, Elsevier, Amsterdam, ISBN: 978-0-12-415806-1, 295-317.

Hışıl, Y., 1985, Kromatografide İç Standart Tekniği, *Gıda,* 10(2), 105-110.

Hsu, B. Y., Lin, S. W., Inbaraj, B. S., Chen, B. H., 2017, Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz. (djulis) by HPLC-DAD-ESI–MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 132, 109-116.

Huang D., Ou B., Prior, R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agriculture Food Chemistry,* 53, 4303- 4310.

ICH, 1995, Note For Guıdance On Valıdatıon Of Analytıcal Procedures: Text And Methodology, *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, London,1-15.

Jiang, W., Akagi, T., Suzuki, H., Takimoto, A., Nagai, H., 2016, A new diatom growth inhibition assay using the XTT colorimetric method, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 185-186, 13-19.

Kahraman, A., Serteser, M., Köken, T., 2002, Flavonoidler, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3, 01-08.

Karabacak, Ç., Tilki, T., Cengiz, M., 2010, Heterojen Katalizörlerin Kullanılmasıyla 7-hidroksi-4-metil kumarinin Mikrodalga Yöntemiyle Sentezi, *24. Ulusal Kimya Kongresi*, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak.

Karabulut, G., Yemiş, O., 2019, Fenolik Bileşiklerin Bağlı Formları ve Biyoyararlılığı, *Akademik Gıda*, 17(4), 526-537.

Karabulut, H., Gülay, M. Ş., 2016, Antioksidanlar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1), 65-76.

Karakaya, S., El, S. N., 1997, Flavonoidler ve Sağlık, *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 26(2), 54-60.

Kavitapu, D., Maruthapillai, A., Mahapatra, S., Arockia Selvi, J., 2021, New stability indicating RP-HPLC method for the determination of Abiraterone acetate, its related substances and degradation products in bulk and dosage form, *Materials Today: Proceedings*, 34, 469-478.

Konak, Ü. İ., Turhan, İ., Certel, M., 2014, Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması, *Akademik Gıda*, 12(2), 79-87.

Körkoca, H., Gökçeoğlu, E., Dicle, Y., Özçelik, Z., Yurtdaş, D., Dinler, Ö., 2013, Hastane Kökenli Klinik Olmayan *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Araştırılması, *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(1), 7-16.

Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., Sivas, H., 2017, *Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables*, Medicinal Spices and Vegetables from Africa, In: Kuete, V. (ed.), Chapter 10, Academic Press, ISBN: 978-0-12-809286-6, 271-297.

Kumar, N., Goel, N., 2019, Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications, *Biotechnology Reports*, 24, e00370.

Kumari, P., Gupta, A, 2021, *Assays to assess the proliferative behavior of cancer cells,* Protocol Handbook for Cancer Biology*,* In: Misra, G., Rajawat, J. (ed.), Chapter 3, Academic Press, ISBN: 978-0-323-90006-5, 23-41.

Kuppusamy, P., Lee, K. D., Song, C. E., Ilavenil, S., Srigopalram, S., Arasu, M. V., Choi, K. C., 2018, Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop Lolium multiflorum using HPLC-DAD, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(3), 282-288.

Lenehan, C. E., 2013, *Chromatography: Basic Principles*. Encyclopedia of Forensic Sciences, In: Siegel, J. A., Saukko, P. J., Houck, M. M. (ed.), Academic Press, Waltham, 573-578.

Lister, A. S., 2005, *Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis*. Separation Science and Technology, In: Ahuja, S., Dong, M. W. (ed.), Chapter 7, Academic Press, ISBN: 1877-1718, 191-217.

Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., Segura-Carretero, A., 2018, *Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC),* Modern Techniques for Food Authentication, In: Sun, D-W. (ed.), Chapter 13, Academic Press, ISBN: 978-0-12-814264-6, 459-526.

Luna-Guevara, M. L., Luna-Guevara, J. J., Hernández-Carranza, P., Ruíz-Espinosa, H., Ochoa-Velasco, C. E., 2018, *Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic*

Degenerative Diseases, Studies in Natural Products Chemistry, In: Atta ur, R. (ed.), Chapter 3, Elsevier, ISBN: 1572-5995, 79-108.

Macar, O., Kalefetoğlu Macar, T., 2018, Altitude Triggers Some Biochemical Adaptations of Polygonum cognatum Meissn. Plants, *Cumhuriyet Science Journal*, 39(3), 621-627.

Machmudah, S., Wahyudiono, Kanda, H., Goto, M., 2017, *Hydrolysis of Biopolymers in Near-Critical and Subcritical Water*, Water Extraction of Bioactive Compounds, In: Dominguez González, H., González Muñoz, M. J. (ed.), Chapter 3, Elsevier, ISBN: 978-0-12-809380-1, 69-107.

Marangoz, N., 2020, *Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Temin Edilen Madımak Örneklerinin Bazı Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi,* Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.

Masuoka, N., 2021, Stilbene compounds are specific inhibitors of the superoxide anion generation catalyzed by xanthine oxidase, *Food Chemistry*: X, 12, 100146.

Mattila, P., Kumpulainen, J., 2002, Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3660-3667.

Meral, R., Doğan, İ. S., Kanberoğlu, G. S., 2012, Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 2(2), 45-50.

Mesquita, E., Monteiro, M., 2018, Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Pêra-Rio orange juice, *Food Research International*, 106, 54-63.

Meyer, V. R., 2013, *CHROMATOGRAPHY | Principles,* Encyclopedia of Analytical Science, In: Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., Miró, M. (ed.), Academic Press, Oxford, ISBN: 978-0-08-101984-9, 105-112.

Modena, M. G., 2014, *Hypertension, Menopause and Natural Antioxidants in Foods and the Diet*, Aging, In: Preedy, V. R. (ed.), Chapter 22, Academic Press, San Diego, ISBN: 978-0-12-405933-7, 225-231.

Moldoveanu, S. C., David, V., 2013, *Parameters that Characterize HPLC Analysis*, Essentials in Modern HPLC Separations, In: Moldoveanu, S. C., David, V. (ed.), Chapter 2, Elsevier, ISBN: 978-0-12-385013-3, 53-83.

Murathan, Z. T., 2018, Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi ekolojik koşullarında yetişen bazı tıbbi bitkilerin biyokimyasal içeriği ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 51- 60.

Nie, Q., Nie, S., 2019, *High-performance liquid chromatography for food quality evaluation*, Evaluation Technologies for Food Quality, In: Zhong, J., Wang, X. (ed.), Chapter 13, Woodhead Publishing, ISBN: 978-0-12-814217-2, 267-299.

Okan, O. T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ., 2013, Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler, *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 13(1), 48-59.

Okcu, Z., Kaplan, B., 2018, Doğu Anadolu Bölgesinde Gıda Olarak Kullanılan Yabani Bitkiler, *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(3), 260-265.

Onat, K. A., Sezer Kürkçü, M., Çöl, B., 2021, Fenolik Bileşiklerden Sinnamik Asit, Kafeik Asit ve p-kumarik Asit'in Bazı Biyolojik Aktiviteleri, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(4), 2587-2598.

Orhun, F. G., 1968, Gaz Kromatografisi, Taşıyıcı Gazın Akış Hızının Tesirleri Üzerinde Tecrübi Araştırmalar ve Metodun Türkiye'deki Bazı Tabiî Gazların Hidrokarbon Analizlerine Tatbiki, *Maden Tetkik ve Arama Dergisi*, 70(70), 106-141.

Önde, S., Vurdu, H., 1988, Bitki Çeşitliliği ve Unutulan Gen Kaynakları, Tabiat ve İnsan, *Ankara*, 22(2), 27-31.

Önen, H., Altuntaş, E., Özgöz, E., Bayram, M., Özcan, S., 2014, Moisture Effect on Physical Properties of Knotweed (*Polygonum cognatum* Meissn.) seeds, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31(2), 15-24.

Özdural, A. R., 2017, *Modeling Chromatographic Separation*, Comprehensive Biotechnology, In: Moo-Young, M. (ed.), Chapter 2.51, Pergamon, Oxford, ISBN: 978-0-444-64047-5, 754-772.

Özer, Z., Önen, H., Tursun, N., Uygur, F. N., 1999, *Türkiye'nin bazı önemli yabancı otları (Tanımları ve kimyasal savaşımları),* Tokat.

Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R., 2016, Flavonoids: An Overview, *Journal of Nutritional Science*, 5, 1-15.

Pekdemir, S., Çiftci, M., Karatepe, M., 2020, Elazığ'da Yetişen *Polygonum cognatum* Meissn (Madımak) Bitki Ekstraktlarının In vitro Biyolojik Aktiviteleri ve Bazı Fitokimyasal Bileşenlerinin Belirlenmesi, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi,* 18, 368-378.

Polat, E., 2020, Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemlerine Güncel Yaklaşımlar, *Namık Kemal Tıp Dergisi,* 8(1), 84- 92.

Robards, K., Haddad, P. R., Jackson, P. E., 2004, *Qualitative and Quantitative Analysis*, Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods, In: Robards, K., Haddad, P. R., Jackson, P. E. (ed.), Chapter 9, Academic Press, Boston, ISBN: 978-0-08-057178-2, 457-490.

Roleira, F. M. F., Varela, C. L., Costa, S. C., Tavares-da-Silva, E. J., 2018, *Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity*, Studies in Natural Products Chemistry, In: Atta ur, R. (ed.), Chapter 4, Elsevier, ISBN: 1572-5995, 115-156.

Roy, S., Chakraborty, P., Das, S. K., Chakraborty, S., 2021, *Cytotoxicity and biocompatibility of bionanocomposites*, Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, In: Ahmed, S., Annu (ed.), Chapter 30, Woodhead Publishing, ISBN: 978-0-12-821280-6, 565-586.

Sadiq, N. W., Beauchemin, D., 2020, *Liquid chromatography*, Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES, In: Beauchemin, D. (ed.), Chapter 4, Elsevier, Amsterdam, ISBN: 978-0-444-59482-2, 213-254.

Salas-Tovar, J. A., Sepulveda, D. R., 2022, *Liquid Chromatography*, Encyclopedia of Dairy Sciences, In: McSweeney, P. L. H., McNamara, J. P. (ed.), Academic Press, Oxford, ISBN: 978-0-12-818767-8, 430-437.

Saraç, H., Daştan, T., Demirbaş, A., Durna Daştan, S., Karaköy, T., Durukan, H., 2018, Madımak (*Polygonum cognatum* Meissn.) Bitki Özütlerinin Besin Elementleri ve In Vitro Antikanserojen Aktiviteleri Yönünden Değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, *Ziraat Fakültesi Dergisi-1. Uluslararası Tarımsal Yapılar ve Sulama Kongresi Özel Sayısı,* 340-347.

Scalzo, R. L., 2008, Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid, *Food Chemistry,* 107, 40-43.

Shen, B.-B., Yang, Y.-P., Yasamin, S., Liang, N., Su, W., Chen, S.-H., Wang, X.-J., Wang, W., 2018, Analysis of the Phytochemistry and Bioactivity of the Genus Polygonum of Polygonaceae, *Digital Chinese Medicine*, 1(1), 19-36.

Shrivastava, A., 2011, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21-25.

Singh, R., 2013, HPLC method development and validation- an overview, *Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 4(1), 26-33.

Şahin, A. R., Doğruer, D., Nazik, S., Aktemur, A., Öksüz, H., Aral, M., Ateş, S., 2019, Hastane Kökenli Patojenlerde Artan Antimikrobiyal Direnç Sorunu: *Acinetobacter baumannii*. *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi,* 4(2), 156-169.

Şekeroğlu, N., Gezici, S., 2021, Türkiye'nin Virüs Savar Bitkisi Laden (*Cistus spp.)* Türleri: Geleneksel Kullanımları, Biyoaktif Kimyasal Bileşenleri ve Farmakolojik Aktiviteleri, *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi* 11(2), 258-268.

Şen, N., Kalaycı, G., 2016, Altın Otu Bitkisinden (*Helichrysum arenarium*) Tanen ve Kumarinin Kimyasal Kompozisyonu, *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 42(2), 226-231.

Tokur, O., Aksoy, A., 2017, In Vitro Sitotoksisite Testleri, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* 6(1), 112-118.

Tonny, T. S., Sultana, S., Siddika, F., 2017, Study on medicinal uses of Persicaria and Rumex species of polygonaceae family. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 587-589.

Uddin, K., Rahman, A. H. M. M., & A.K.M.R., I., 2014, Taxonomy and Traditional Medicine Practices of Polygonaceae (Smartweed) Family at Rajshahi, Bangladesh, *International Journal of Advanced Research,* 2(11), 459-469.

Ulubelen, A., Tan, N., Üçer, M., 1992, Flavonoids From *Polygonum cognatum*. *Fitoterapia* 63(1), 87.

Ulusoy, S., Erdoğan, S., Gökşın Karaslan, M., Ateş, B., Ulusoy, H. İ., Erdemoğlu, S., 2018, Optimization Of Extraction Parameters For Folic Acid And Antioxidant Compounds From An Edible Plant (*Polygonum cognatum* Meissn) Using Pressurized Liquid Extraction (PLE) System, *Cumhuriyet Science Journal*, 39(4), 1069-1080.

Üçer, M., 2010, Sivas yöresinde yerel bitkilerden yapılan ilaçlar, *Bitkilerle Tedavi Sempozyumu*, 5-6 Haziran 2010, İstanbul.

Yetkin, A., Şenturan, M., Benek, A., Efe, E., Canlı, K., 2017, *Pterigynandrum filiforme* Hedw. Türünün Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi, *Anadolu Briyoloji Dergisi*, 3(1), 43-47.

Yıldırım Baştemur, G., 2019, Penisilin Grubu Antibiyotiklerin Ayrımı ve Penisilin V'nin Farmasötik ve İdrar Numunelerinde Analizi İçin Miseller Sıvı Kromatografi Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu, *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi,* 17, 703-710.

Yıldırım, A., Mavi, A., Kara, A. A., 2003, Antioxidant and antimicrobial activities of *Polygonum cognatum* Meissn extracts, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 64–69.

Yılmaz, H., Karahan, F., 1999, Alpin Bitkilerin Korunması ve Yararlanma Olanakları, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(1).

Yu, M., Chen, T.-T., Zhang, T., Jia, H.-M., Li, J.-J., Zhang, H.-W., Zou, Z.-M., 2021, Anti-inflammatory constituents in the root and rhizome of Polygonum cuspidatum by UPLC-PDA-QTOF/MS and lipopolysaccharide-activated RAW264.7 macrophages, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 195, 113839.

Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., Wang, M., Song, H., Liu, X., Lu, B., 2019, Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China, *Food Chemistry*, 276, 538-546.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Reyhan AKPINAR
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü
Mezuniyet Yılı	17.06.2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler

Yıldırım Baştemur, G., Akpınar, R., Perçin Özkorucuklu, S., Kır, E., 2021, Optimization of a Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Method for Simultaneous Separation of Aloe-Emodin, Rhein, Emodin, Chrysophanol and Physcion. *European Journal of Science and Technology*, (27), 972-984.

Yıldırım Baştemur G., Akpınar R., Perçin Özkorucuklu S., 2020, Method optimization for the simultaneous determination of flavonoids and anthraquinones in Polygonum cognatum Meissn plant by HPLC-DAD method, *3rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences*, 19- 20 Mart 2020 Ankara, Türkiye, 273.